



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



**Desenvolvimento e Caracterização de Filmes Simples e Compostos a  
base de Gelatina, Ácidos Graxos e Breu Branco.**

**LARISSA CANHADAS BERTAN**

Farmacêutica

**CARLOS RAIMUNDO FERREIRA GROSSO**

Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição

**Campinas-2003**

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

Bertan, Larissa Canhadas  
B461d Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e compostos a base de gelatina, ácidos graxos e breu branco / Larissa Canhadas Bertan. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Carlos Raimundo Ferreira Grosso  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Biofilmes. 2.Gelatina. 3.Ácidos graxos. I.Grosso, Carlos Raimundo Ferreira. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso  
Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP  
(orientador)

---

Prof. Dr.Theo Guenter Kieckbusch  
Faculdade de Engenharia Química-UNICAMP  
(membro)

---

Prof. Dr. Fábio Yamashita  
Centro de Ciências Agrárias-UEL  
(membro)

---

Profa. Dra. Florência Menegalli  
Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP  
(membro)

“...muitas pessoas tropeçam pela vida até a beira do abismo sem saber onde estão indo. As vezes, isso acontece porque aqueles cuja vocação é dar expressão cultural aos seus pensamentos deixam de examinar a verdade, preferindo o sucesso rápido ao esforço da indagação paciente sobre o que torna a vida digna de ser vivida”

Papa João Paulo II

“Muitas pessoas temem o caminho do auto conhecimento por acharem que seus abismos possam tragá-las. Sabem os cristãos - ainda que muitas vezes de modo apenas teórico - que Cristo viveu todos os abismos humanos e caminha conosco se tentarmos uma luta honesta dentro de nós mesmos. E pelo fato de Deus nos amar sem condições- inclusive nossos abismos e lados escuros - não precisamos fugir de nós mesmos.”

Richard Rohr

## DEDICATÓRIA

A minha mãe, **Tereza**, por toda confiança, orgulho e principalmente por todo amor que recebi durante todos os minutos da minha vida. Merecedora da minha admiração e respeito, será para sempre meu maior exemplo de inteligência, competência e dignidade. Levarei em minha vida sua frase “Educação é conversão”, conversão interior que se traduz em atos.

Ao meu pai, **Levino**, meu referencial de força, fé, coragem e determinação. Meu êxito é fruto do seu esforço, através do seu incentivo constante reuni forças para vencer todas as dificuldades. Obrigada pela lição de amor que me ensina por toda a vida.

Ao meu irmão, **Helder**, um dos alicerces da minha vida. Agradecer é admitir que houve momento em que se precisou de alguém, é reconhecer que o ser humano jamais poderá lograr para si o dom de ser auto suficiente. Ninguém nasce e cresce sozinho, sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor. A você, meu irmão amado, também dedico minha vitória. Obrigada por tudo!!!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida e pelo amor incondicional. Por me mostrar uma força que eu mesma não sabia que possuía, pois contigo ao meu lado eu vou mais longe.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso, pela orientação, por acreditar em mim e me esperar durante seis meses para iniciar o mestrado, por compartilhar sua experiência de pesquisador e por me mostrar essa área maravilhosa dos biofilmes. Obrigada por tudo!!

A todos do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Far- Manguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, Mônica Freiman, Carlos Alberto Rodrigues e especialmente ao Prof. Dr. Antonio Carlos Siani pela gentileza no fornecimento, caracterização e sugestões com o breu branco.

Aos professores Theo Guenter Kieckbusch, Fábio Yamashita e Flôrcia Menegalli, pelas sugestões apresentadas para redação final deste trabalho.

A Profa. Dra. Flávia Maria Netto por todo auxílio dado a mim e ao trabalho.

A todos do laboratório de Controle de Qualidade: Izabela, Renata, Ana Sílvia, Gustavo, Rodney, pela amizade, pela ajuda na parte prática e de formatação da tese e por tornar os dias de trabalho muito mais alegres. A Juliana por estar sempre comigo, apoiando-me em todos os momentos e dando-me força para vencer todos os obstáculos do dia a dia. A Patrícia pela amizade, pelo carinho e disponibilidade a mim dispensada em vários momentos.

A Fara, uma grande amiga que ganhei durante esta trajetória, por sua bondade, por dividir seus conhecimentos sem pedir nada em troca, pela força em todos os momentos, por acreditar em mim, pois “quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mais aquele que vai acompanhado com certeza chegará mais longe....”

A todos os funcionários do DEPAN: Cidinha, Graça, André, Fátima, Suzana, Chico, Eliana, Dona Nice, Lia e Dona Magna, pela amizade e colaboração.

Ao meus amigos do DEPAN: Dudinha, Leonice, Sônia, Janai, Helenice, Noemi, Suzi, Fábio, Aline, Paulo Sérgio, Vera, Adriane, Luciano e Carol, pelo companheirismo e preciosos momentos de descontração.

A todos meus queridos amigos da FEA: Lu Fleuri, Gabizinha, Fabinho e Fer Ventura pela amizade e os bons momentos compartilhados.

A Rose, por todas as dicas nas análises térmicas. Ao Rodolfo (FEQ), pela ajuda na realização das análises térmicas e pelas conversas divertidas. Ao Prof. Dr. Massao Ionashiro e Prof. Dr. Fernando Fertoni, da UNESP (Araraquara) pela contribuição e sugestões na interpretação das análises térmicas.

A Eriquinha (FEQ), pela amizade, pela alegria e por estar sempre disposta a ajudar.

A todos da secretária de Pós-graduação, em especial ao Cosme pela paciência e dedicação.

A minha grande amiga Jane por toda força e conselhos e especialmente para minha amiga-irmã Renata (ruivete) que mesmo longe sempre esteve presente em tudo e para tudo. A minha cunhada Andréa por sua bondade, alegria e sempre torcer por mim. A Luciana Esper por sua amizade, doçura e por sempre me mostrar o lado positivo das coisas.

Muito Obrigada!!!

Lara

## SUMÁRIO

|   |              |
|---|--------------|
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>                                | <b>XVII</b>  |
| <b>INDICE DE TABELAS.....</b>                                 | <b>XXI</b>   |
| <b>RESUMO.....</b>  | <b>XXIII</b> |
| <b>SUMMARY .....</b>  | <b>XXV</b>   |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                    | <b>1</b>     |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                         | <b>3</b>     |
| 2.1 FILMES E COBERTURAS COMESTÍVEIS E/OU BIODEGRADÁVEIS ..... | 3            |
| 2.2 FILMES EMULSIONADOS.....                                  | 9            |
| 2.3 CARACTERÍSTICAS DO FILMES.....                            | 10           |
| 2.3.1 ESPESSURA .....   | 10           |
| 2.3.2 TEXTURA.....  | 11           |
| 2.3.3 SABOR E AROMA.....                                      | 11           |
| 2.3.4 COR E OPACIDADE .....                                   | 12           |
| 2.4 PROPRIEDADES DOS FILMES .....                             | 12           |
| 2.4.1 PROPRIEDADES DE BARREIRA.....                           | 12           |
| 2.4.2 PROPRIEDADES MECÂNICAS.....                             | 16           |
| 2.5 SOLUBILIDADE EM ÁGUA.....                                 | 16           |
| 2.6 ISOTERMAS DE SORÇÃO .....                                 | 17           |
| 2.7 TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO VÍTREA (TG).....                 | 18           |
| 2.8 MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (MCLV) .....    | 20           |
| 2.9 GELATINA.....   | 22           |
| 2.10 ÁCIDOS GRAXOS .....                                      | 26           |
| 2.11 BREU BRANCO.....   | 27           |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                            | <b>31</b>    |
| 3.1 MATERIAIS .....   | 31           |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 3.2       | ENSAIOS PRELIMINARES .....  | 31        |
| 3.3       | ELABORAÇÃO DOS FILMES.....  | 31        |
| 3.3.1     | ELABORAÇÃO DOS FILMES À BASE DE GELATINA E TRIACETINA.....  | 31        |
| 3.3.2     | ELABORAÇÃO DE FILMES COMPOSTOS DE GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDO ESTEÁRICO OU PALMÍTICO .....                               | 32        |
| 3.3.3     | ELABORAÇÃO DE FILMES COMPOSTOS DE GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDO ESTEÁRICO E PALMÍTICO .....                                | 32        |
| 3.3.4     | ELABORAÇÃO DE FILMES COMPOSTOS DE GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDO ESTEÁRICO E PALMÍTICO E ÁCIDO LÁURICO OU BREU BRANCO ..... | 33        |
| 3.4       | CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES.....  | 33        |
| 3.4.1     | ASPECTO VISUAL .....  | 33        |
| 3.4.2     | ESPESSURA .....   | 33        |
| 3.5       | PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA .....   | 33        |
| 3.6       | SOLUBILIDADE EM ÁGUA .....  | 34        |
| 3.7       | PROPRIEDADES MECÂNICAS.....   | 35        |
| 3.8       | PERMEABILIDADE AO OXIGÊNIO .....  | 36        |
| 3.9       | OPACIDADE .....   | 37        |
| 3.10      | MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....  | 37        |
| 3.11      | MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (MCLV) .....  | 38        |
| 3.12      | ISOTERMAS DE SORÇÃO .....   | 38        |
| 3.13      | ANÁLISE DINÂMICA MECÂNICA (DMA).....  | 39        |
| 3.14      | ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA .....   | 40        |
| 3.15      | CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC).....  | 40        |
| 3.16      | ANÁLISE ESTATÍSTICA.....  | 41        |
| <b>4.</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>43</b> |
| 4.1       | ENSAIOS PRELIMINARES .....  | 43        |
| 4.2       | ASPECTO VISUAL .....  | 44        |
| 4.3       | ESPESSURA .....   | 44        |
| 4.4       | PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA .....   | 45        |
| 4.5       | SOLUBILIDADE .....  | 52        |

|                 |  |            |
|-----------------|--|------------|
| 4.6             | PROPRIEDADES MECÂNICAS.....  | 53         |
| 4.7             | PERMEABILIDADE A GASES .....                                       | 60         |
| 4.8             | OPACIDADE .....  | 63         |
| 4.9             | MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....                    | 65         |
| 4.10            | MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (MCLV) .....             | 75         |
| 4.11            | ISOTERMA DE SORÇÃO .....   | 91         |
| 4.12            | ANÁLISES TÉRMICAS .....  | 97         |
| 4.12.1          | ANÁLISES DINÂMICA MECÂNICA (DMA) .....                             | 97         |
| 4.12.2          | TERMOGRAVIMETRIA (TGA).....  | 109        |
| 4.12.3          | CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC) .....                  | 111        |
| <b>5.</b>       | <b>CONCLUSÕES.....</b>   | <b>119</b> |
| <b>6.</b>       | <b>SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS .....</b>                      | <b>121</b> |
| <b>7.</b>       | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                            | <b>123</b> |
| <b>ANEXO I</b>  | <b>.....</b>   | <b>139</b> |
|                 | CARACTERIZAÇÃO DO BREU BRANCO .....                                | 139        |
| <b>ANEXO II</b> | <b>.....</b>   | <b>149</b> |
|                 | CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA DOS FILMES INDIVIDUAIS ..... | 149        |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1. PROCESSO DE CRIAÇÃO DO ESTADO DE EXCITAÇÃO, COM A SUBSEQÜENTE EMISSÃO DA FLUORESCÊNCIA (SMAILI, 2001).....  | 20 |
| FIGURA 2. REAÇÃO ESQUEMÁTICA DE IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA COM CORANTE FITC. ....  | 22 |
| FIGURA 3. ESTRUTURA NILE RED.....   | 22 |
| FIGURA 4. ESTRUTURA DA CADEIA DE GELATINA (POPPE, 1987).....  | 25 |
| FIGURA 5. PEDRA DE BREU BRANCO BRUTA.....   | 27 |
| FIGURA 6. PEDRA DE BREU BRANCO PURIFICADA. ....   | 27 |
| FIGURA 7. $\alpha$ E $\beta$ AMIRINA, SENDO R= CH <sub>3</sub> E R <sub>1</sub> = H; R= H E R <sub>1</sub> = CH <sub>3</sub> , PARA $\alpha$ E $\beta$ AMIRINAS, RESPECTIVAMENTE. ....  | 29 |
| FIGURA 8. RELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁURICO (AL) E PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA. ....  | 49 |
| <b>FIGURA 9.</b> RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DE BREU BRANCO E PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA. ....  | 51 |
| FIGURA 10. RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁURICO E RESISTÊNCIA A TRAÇÃO ..... 57  | 57 |
| <b>FIGURA 11.</b> RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁURICO E ELONGAÇÃO(%). ....  | 58 |
| FIGURA 12. RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DE BREU BRANCO (%) E RESISTÊNCIA A TRAÇÃO... 60   | 60 |
| FIGURA 13. RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DE BREU BRANCO E ELONGAÇÃO (%).....   | 60 |
| FIGURA 14. OPACIDADE DOS FILMES .....   | 65 |
| FIGURA 15. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA VISUALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS FILMES POR MEV. ....   | 67 |
| FIGURA 16. IMAGENS FOTOGRÁFICAS OBTIDAS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA DE VARREDURA DO (A) FILME DE GELATINA E TRIACETINA (FA) (700X); (B) GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDO ESTEÁRICO (FA) (700X); (C) GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDO PALMÍTICO (FA) (700X) E (D) GELATINA, TRIACETINA E BLENDAS DE ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO (FA) (700X).....                        | 69 |
| FIGURA 17. IMAGENS FOTOGRÁFICAS OBTIDAS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA DE VARREDURA DO FILME DE (A) GELATINA, TRIACETINA E BLENDAS DE ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO E ÁCIDO LÁURICO 1% (FA) (700X); (B) GELATINA, TRIACETINA E BLENDAS DE ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO E ÁCIDO LÁURICO 1% (FP) (700X); (C) GELATINA, TRIACETINA E BLENDAS DE ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO |    |

|  |    |
|--|----|
| E ÁCIDO LÁURICO 10% (FA) (700X) E (D) GELATINA, TRIACETINA E BLENDAS DE ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO E ÁCIDO LÁURICO 10% (FP) (700X).....   | 71 |
| FIGURA 18. IMAGENS FOTOGRÁFICAS OBTIDAS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA DE VARREDURA DO FILME DE (A) GELATINA, TRIACETINA E BLENDAS DE ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO E BREU 1% (FA) (700X); (B) GELATINA, TRIACETINA E BLENDAS DE ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO E BREU 1% (FP) (700X); (C) GELATINA, TRIACETINA E BLENDAS DE ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO E BREU 10% (FA) (700X) E (D) GELATINA, TRIACETINA E BLENDAS DE ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO E BREU 10% (FP) (700X)..... | 73 |
| FIGURA 19. IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER DO FILME DE GELATINA (CORADA) E TRIACETINA. (A) DIC (CONTRASTE INTERFERENCIAL DIFERENCIAL DE FASE) (20X); (B) FITC (ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA- GELATINA CORADA) (20X) E (C) MERGE (SOBREPOSIÇÃO GELATINA-FITC E DIC) (20X).....   | 77 |
| FIGURA 20. IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER DO FILME DE GELATINA E TRIACETINA (CORADA). (A) DIC (CONTRASTE INTERFERENCIAL DIFERENCIAL DE FASE) (20X); (B) NILE RED (TRACETINA CORADA) (20X) E (C) MERGE (SOBREPOSIÇÃO TRIACETINA-NILE RED E DIC) (20X).<br>.....  | 79 |
| FIGURA 21. IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DO FILMES DE GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDO ESTEÁRICO. (A) FITC (ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA - GELATINA CORADA) (20X); (B) NILE RED (TRACETINA+ÁCIDO ESTEÁRICO - NILE RED) (20X) E (C) MERGE (SOBREPOSIÇÃO GELATINA-FITC E TRIACETINA+ÁCIDO ESTEÁRICO - NILE RED) (20X).....  | 81 |
| FIGURA 22. IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER DO FILME DE GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDO PALMÍTICO. (A) DIC (CONTRASTE INTERFERENCIAL DIFERENCIAL DE FASE) (20X). (B) FITC (ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA - GELATINA CORADA) (20X), (C) NILE RED (TRACETINA+ÁCIDO PALMÍTICO - NILE RED) (20X) E (D) MERGE (SOBREPOSIÇÃO GELATINA-FITC E TRIACETINA+ÁCIDO PALMÍTICO - NILE RED) (20X). ....  | 83 |
| FIGURA 23. IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER DO FILME DE GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO. (A) DIC (CONTRASTE INTERFERENCIAL DIFERENCIAL DE FASE) (20X); (B) FITC (ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA - GELATINA CORADA) (20X); (C) NILE RED (TRACETINA+ ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO - NILE RED) (20X) E (D) MERGE (SOBREPOSIÇÃO GELATINA-FITC E TRIACETINA+ ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO - NILE RED) (20X).....                                | 85 |

|   |     |
|---|-----|
| FIGURA 24. IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL DO FILME DE GELATINA, TRIACETINA, BLENDA DE ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO E BREU BRANCO 10%. (A) DIC (CONTRASTE INTERFERENCIAL DIFERENCIAL DE FASE) (20X); (B) FITC (ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA - GELATINA CORADA) (20X); (C) NILE RED (TRiacETINA+ BLENDA DE ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO E BREU BRANCO 10% - NILE RED) (20X) E (D) MERGE (SOBREPOSIÇÃO GELATINA-FITC E TRIACETINA+ BLENDA DE ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO E BREU BRANCO 10% - NILE RED) (20X).....     | 87  |
| FIGURA 25. IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL DO FILME DE GELATINA, TRIACETINA, BLENDA ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO E ÁCIDO LÁURICO 10%. (A) DIC (CONTRASTE INTERFERENCIAL DIFERENCIAL DE FASE) (20X); (B) FITC (ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA - GELATINA CORADA) (20X); (C) NILE RED (TRiacETINA+ BLENDA DE ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO E ÁCIDO LÁURICO 10% - NILE RED) (20X) E (D) MERGE (SOBREPOSIÇÃO GELATINA-FITC E TRIACETINA+ BLENDA DE ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO E ÁCIDO LÁURICO 10% - NILE RED) (20X). .... | 89  |
| FIGURA 26. ISOTERMA DE ADSORÇÃO DOS FILMES DE GELATINA COM E SEM ÁCIDO GRAXO, AJUSTADAS PELA EQUAÇÃO DE GAB, NAS TEMPERATURAS DE 25°C. ....   | 95  |
| FIGURA 27. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DOS FILMES GE GELATINA COM BREU E ÁCIDO LÁURICO, AJUSTADO PELA EQUAÇÃO DE GAB, NA TEMPERATURA DE 25°C.....   | 95  |
| FIGURA 28. ANÁLISE TERMODINÂMICA DO FILME DE GELATINA UTILIZANDO DMA.....   | 98  |
| FIGURA 29. ANÁLISE TERMODINÂMICA DO FILME DE GELATINA/TRIACETINA, UTILIZANDO DMA. ....  | 99  |
| FIGURA 30. ANÁLISE TERMOMECÂNICA DO FILME DE GELATINA/TRIACETINA/ÁCIDO PALMÍTICO, UTILIZANDO DMA.....   | 102 |
| FIGURA 31. ANÁLISE TERMOMECÂNICA DO FILME DE GELATINA/TRIACETINA/ÁCIDO ESTEÁRICO, UTILIZANDO DMA.....   | 102 |
| FIGURA 32. ANÁLISE TERMOMECÂNICA DOS FILMES DE GELATINA/TRIACETINA/BLENDA ESTEÁRICO-PALMÍTICO UTILIZANDO DMA.....   | 103 |
| FIGURA 33. ANÁLISE TERMOMECÂNICA DOS FILMES DE GELATINA/TRIACETINA/BLENDA DE ESTEÁRICO-PALMÍTICO/ÁCIDO LÁURICO 1%, UTILIZANDO DMA.....  | 104 |
| FIGURA 34. ANÁLISE TERMOMECÂNICA DO FILME DE GELATINA/TRIACETINA/BLENDA ESTEÁRICO-PALMÍTICO/ÁCIDO LÁURICO 10%, UTILIZANDO DMA. ....   | 105 |
| FIGURA 35. ANÁLISE TERMOMECÂNICA DO FILME DE GELATINA/TRIACETINA/BLENDA ESTEÁRICO-PALMÍTICO/BREU 1%, UTILIZANDO DMA.....  | 107 |

|  |     |
|--|-----|
| FIGURA 36. ANÁLISE TERMOMECAÂNICA DO FILME GELATINA/TRIACETINA/BLENDA ESTEÁRICO-PALMÍTICO/BREU 10%, UTILIZANDO DMA.....  | 107 |
| FIGURA 37. CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA DE DEGRADAÇÃO DO FILME DE GELATINA.....   | 110 |
| FIGURA 38. CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA DA GELATINA EM PÓ PREVIAMENTE SECA.....   | 111 |
| FIGURA 39. TERMOGRAMAS DE DSC DOS FILMES DE GELATINA (A), GELATINA/TRIACETINA (B).113  |     |
| FIGURA 40. TERMOGRAMAS DE DSC DOS FILMES DE GELATINA/TRIACETINA/ÁCIDO ESTEÁRICO (C), GELATINA/TRIACETINA/ÁCIDO PALMÍTICO (D) E GALATINA/TRIACETINA/BLENDA ESTEÁRICO-PALMÍTICO (E).....   | 114 |
| FIGURA 41. TERMOGRAMAS DE DSC DOS FILMES DE GELATINA/TRIACETINA/BLENDA ESTEÁRICO-PALMÍTICO (A), GELATINA/TRIACETINA/BLENDA ESTEÁRICO-PALMÍTICO/ÁCIDO LAÚRICO 1% (B), GELATINA/TRIACETINA/BLENDA ESTEÁRICO-PALMÍTICO/BREU 1% (C), GELATINA/TRIACETINA/BLENDA ESTEÁRICO-PALMÍTICO/ÁCIDO LÁURICO 10% (D) E GELATINA/TRIACETINA/BLENDA ESTEÁRICO-PALMÍTICO/BREU 10% (E)..... | 116 |
| FIGURA 42. CROMATOGRAMA DO BREU BRANCO. ....   | 141 |
| FIGURA 43. ESPECTRO COMPLETO BREU BRANCO.....  | 143 |
| FIGURA 44. EXPANSÃO DO ESPECTRO NA REGIÃO 185-130 PPM. ....  | 145 |
| FIGURA 45. EXPANSÃO DO ESPECTRO NA REGIÃO 140-115 PPM. ....  | 147 |
| FIGURA 46. TERMOGRAMA DE DSC DOS FILMES DE (A) GELATINA E (B) GELATINA E TRIACETINA. ....  | 149 |
| FIGURA 47. TERMOGRAMA DE DSC DOS FILMES DE (A) GELATINA/TRIACETINA/ÁCIDO ESTEÁRICO E (B) GELATINA/TRIACETINA/ÁCIDO PALMÍTICO.....  | 151 |
| FIGURA 48. TERMOGRAMAS DE DSC DOS FILMES (A) GELATINA/TRIACETINA/BLENDA ESTEÁRICO-PALMÍTICO E (B) GELATINA/TRIACETINA/BLENDA ESTEÁRICO-PALMÍTICO/ÁCIDO LAÚRICO 1%... 153   |     |
| FIGURA 49. TERMOGRAMAS DE DSC DOS FILMES DE (A) GELATINA/TRIACETINA/BLENDA ESTEÁRICO-PALMÍTICO/ÁCIDO LAÚRICO 10% E (B) GELATINA/TRIACETINA/BLENDA ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO/BREU BRANCO 1%.....  | 155 |
| FIGURA 50. TERMOGRAMA DE DSC DO FILME DE GELATINA/TRIACETINA/BLENDA ESTEÁRICO-PALMÍTICO/BREU BRANCO 10%. ....  | 157 |

## INDICE DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| TABELA 1. POSSIBILIDADE DE USO DE FILMES E COBERTURAS.....  | 6  |
| TABELA 2. ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS ENCONTRADOS EM ALIMENTOS. ....  | 26 |
| TABELA 3. UMIDADE RELATIVA DAS SOLUÇÕES SALINAS SATURADAS A 25°C.....   | 39 |
| TABELA 4. PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA (PVA, 25°C) DOS FILMES DE GELATINA E TRICETINA (GEL/TRI), GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDO PALMÍTICO (GEL/TRI/AP); GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDO ESTEÁRICO (GEL/TRI/AE) E GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO ESTEÁRICO E PALMÍTICO..... | 47 |
| TABELA 5. PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA (PVA, 25°C) DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO ESTEÁRICO E PALMÍTICO (GEL/AC/TRI), GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO ESTEÁRICO E PALMÍTICO E ÁCIDO LÁURICO (GEL/AC/TRI/AL).....  | 48 |
| TABELA 6. PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA (PVA, 25°C) DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO ESTEÁRICO E PALMÍTICO (GEL/AC/TRI), GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO ESTEÁRICO E PALMÍTICO E BREU BRANCO (GEL/AC/TRI/BREU). ....   | 50 |
| TABELA 7. SOLUBILIDADE EM ÁGUA DOS FILMES DE GELATINA/TRIACETINA, GELATINA/TRIACETINA/ÁCIDOS GRAXOS (ESTEÁRICO, PALMÍTICO E BLENDAS DE ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO), GELATINA/TRIACETINA/BLENDAS DE ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO/BREU BRANCO OU ÁCIDO LÁURICO. ....        | 53 |
| TABELA 8. PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS FILMES DE GELATINA E TRICETINA; GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDOS GRAXOS (PALMÍTICO, ESTEÁRICO E BLENDAS DE AMBOS OS ÁCIDOS) (25°C). 56  |    |
| TABELA 9. PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA, BLENDAS DE ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO E ÁCIDO LÁURICO (25°C).....   | 57 |
| TABELA 10. PROPRIEDADE MECÂNICA DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA, BLENDAS DE ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO E BREU BRANCO (25°C). ....   | 59 |
| TABELA 11. PERMEABILIDADE AO OXIGÊNIO DOS FILMES DE GELATINA E TRIACETINA; GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDOS (ESTEÁRICO, PALMÍTICO E BLENDAS DE ESTEÁRICO-PALMÍTICO) E GELATINA, TRIACETINA, BLENDAS DE ÁCIDO ESTEÁRICO-PALMÍTICO E BREU OU ÁCIDO LÁURICO (1 E 10%).....  | 62 |
| TABELA 12. CONSTANTES E COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO ( $R^2$ ) DE CADA MODELO DE ISOTERMA DE ADSORÇÃO A 25°C.....   | 93 |

|  |     |
|--|-----|
| TABELA 13. CONSTANTES E COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO ( $R^2$ ) DE CADA MODELO DE ISOTERMA DE ADSORÇÃO PARA OS FILMES A 25°C. ....   | 94  |
| TABELA 14. TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO VÍTREA E UMIDADE DOS FILMES DE GELATINA SIMPLES E COMPOSTO. ....   | 108 |
| TABELA 15. VALORES DE TEMPERATURA DE FUSÃO ( $T_m$ ) E ENTALPIA DE FUSÃO DOS FILMES SIMPLES E COMPOSTOS DE GELATINA. ....  | 117 |
| TABELA 166. PORCENTAGENS DOS CONSTITUINTES DA FRAÇÃO FIXA DO BREU, COM BASE NAS ÁREAS RELATIVAS DOS PICOS CORRESPONDENTES, NO CROMATOGRAMA, ASSIM COMO OS SINAIS DIAGNÓSTICOS DO ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO 13 (RMN- $^{13}C$ ): ..... | 140 |

## RESUMO

Pesquisas sobre filmes comestíveis à base de polímeros surgiram nos últimos tempos devido ao impacto ambiental aliado a necessidade de reduzir os resíduos sólidos. Estudo com proteínas animais, como gelatina, demonstraram a capacidade de formar filmes, além de possuir grande produção e baixo custo no Brasil. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar filmes simples e compostos feitos de gelatina, triacetina, ácidos graxos (esteárico, palmítico e láurico) e breu branco. Filmes de gelatina simples e compostos foram produzidos e caracterizados quanto às propriedades de barreira ao vapor de água, oxigênio, solubilidade, propriedades mecânicas (resistência à tração e alongação), opacidade e isoterma de sorção (25°C). Posteriormente foram realizadas análises microestruturais, através da microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal a laser de varredura, temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>) obtida por análise térmica mecânica dinâmica (DMTA) e temperatura de fusão por calorimetria diferencial de varredura (DSC). A adição de substâncias hidrofóbicas (ácidos graxos e breu branco) produziu filmes menos permeáveis ao vapor de água e menor resistência a tração comparando ao filme simples. Os filmes compostos causaram aumento da alongação, da opacidade, e da permeabilidade ao oxigênio. Os resultados da microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal a laser, indicaram boa distribuição das substâncias hidrofóbicas e alterações na morfologia da matriz polimérica. O aparecimento de duas a três transições e temperaturas de fusão sugere heterogeneidade dos biofilmes compostos.

Palavras-chaves: Biofilmes, Gelatina, ácidos graxos, Breu branco, triacetina.

## SUMMARY

Recently, many researches have been developed on biodegradable and edible films based on biopolymers due to environmental considerations allied to the necessity of reduction residues. Studies involving animal proteins, such gelatin demonstrated the capacity to form films, besides large production with low cost in Brazil. So that, the objective of this work was the development and characterization of the simple and composite films produced from gelatin, triacetin, fatty acids (stearic, palmitic, blend of both and blend more lauric acid) and elemi resin. Simple and composite gelatin films were produced and characterized with respect to the water vapor (Wvp) and oxygen permeabilities, solubility, mechanical properties (tensile strenght and elongation), opacity and sorption isotherm determination (25°C). Morphological analysis were effected, by scanning electronic microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM), glass transition temperature (Tg) obtained by dynamic mechanical analysis (DMTA), and temperature of melting by differential scanning calorimeter (DSC) The addition of hidrofobic substances (fatty acid and elemi resin) decreased the WVP and mechanical resistance comparing to the simple film. The composite film increased on elongation, opacity and oxygen permeability. The results SEM and confocal laser scanning microscopy (CLSM) indicated good distribution of hidrofobic substances and alterations in the morphology of the polimeric matrix. The appearance of two Tg's and temperature of melting suggests the heterogeneity of composites biofilms.

Key word: Edible film, gelatin, fatty acid, elemi resin and triacetin .

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, em virtude do impacto ambiental, tem crescido o interesse em substituir os polímeros sintéticos, que hoje são muito utilizados como material de embalagem, por materiais biodegradáveis. O consumidor tem buscado, cada vez mais, alimentos com maior qualidade e com vida de prateleira prolongada, sem desconsiderar os efeitos tóxicos ou prejudiciais do produto no meio ambiente.

Inúmeras são as técnicas utilizadas na conservação dos alimentos, destacando-se dentre os processos químicos o uso de aditivos químicos, a salga e a defumação e dentre os principais processos físicos a pasteurização, a refrigeração, o congelamento, entre outros. De uma maneira geral empregam-se métodos combinados, sendo necessária uma proteção física através de uma embalagem adequada (SOBRAL et al., 1997).

De uma maneira geral, utilizam-se embalagens rígidas, como latas metálicas ou recipientes de vidro, que possuem excelentes propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água e gases, garantindo uma proteção estrutural (mecânica). É comum também a utilização de filmes (plásticos) flexíveis, geralmente sintéticos. Apesar de garantirem uma proteção desejada para diversos tipos de produtos, essas embalagens acarretam sérios problemas ambientais (SOBRAL et al., 1997). Dessa forma, esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis, para serem utilizados em embalagens ou diretamente sobre os produtos, como cobertura (KESTER; FENNEMA, 1986)

As vantagens dos filmes comestíveis e/ou biodegradáveis tem despertado interesse em função de suas possibilidades: controlar a migração de vapor d'água; permeabilidade ao oxigênio, dióxido de carbono e migração lipídica de um sistema alimentício. Além disso, podem ser introduzidos aditivos ao filme, tais como: antioxidantes, aromas e agentes antimicrobianos, melhorando com isso a integridade do produto (KESTER; FENNEMA, 1986):

Entre os diversos materiais pesquisados para a produção de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis, a gelatina merece atenção. A gelatina, é uma proteína de origem animal obtida do colágeno por hidrólise ácida ou básica, e amplamente utilizada em indústria alimentícia e farmacêutica. Além disso, a gelatina no Brasil, é produzida em abundância, a baixo custo e com propriedades funcionais adequadas para a fabricação de biofilmes (CARVALHO, 1997).

A utilização dos filmes como embalagens em alimentos exige que os mesmos possuam adequada barreira a umidade e gases, propriedades mecânicas que garantam a proteção e integridade do produto durante o manuseio, transporte e consumo. Filmes à base de gelatina são altamente permeáveis ao vapor de água devido a natureza hidrofílica da proteína, favorecendo desta forma a ligação com a água. A adição de um composto hidrofóbico, pode reduzir a difusividade de moléculas de água provendo melhores propriedades de barreira. Dessa forma, muitas coberturas e filmes atualmente são produzidos através da combinação dos mesmos (BALDWIN et. al., 1997).

Este trabalho teve por objetivo desenvolver filmes simples e compostos feitos de gelatina, triacetina, ácidos graxos (esteárico, láurico e palmítico) e breu branco, e caracteriza-los quanto à permeabilidade ao vapor de água e oxigênio, solubilidade em água, resistência mecânica, morfologia de superfície (microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser), isoterma de sorção e análises térmicas (análise mecânico dinâmica, termogravimetria e calorimetria diferencial de varredura).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Filmes e coberturas comestíveis e/ou biodegradáveis**

A questão do impacto ambiental ocasionado pelo acúmulo das embalagens sintéticas tem promovido, de modo geral, as pesquisas sobre materiais biodegradáveis e, particularmente sobre biofilmes (GONTARD; GUILBERT, 1996).

Coberturas são finas camadas de material aplicado e formado diretamente na superfície do produto, enquanto que filmes são materiais aplicados ao produto após serem formados separadamente (DEBEAUFORT; QUEZADA-GALLO; VOILLEY, 1995; KROCHTA; MULDER-JOHNSTON, 1997). Eles podem ser classificados em comestíveis e/ou biodegradáveis, dependendo dos constituintes utilizados para sua produção e da quantidade das substâncias empregadas (SHIN, 1996).

Coberturas e filmes comestíveis não pretendem, e nem sempre podem, substituir uma embalagem sintética não comestível para prolongar a estocagem dos alimentos. Sua utilização está relacionada com a capacidade de agir como um adjunto para promover maior qualidade, estendendo a vida de prateleira, possibilitando a economia com materiais de embalagem (KESTER; FENNEMA, 1986). Por atuarem tanto como embalagens quanto como componentes do alimento, as coberturas e filmes devem cumprir alguns requisitos específicos para seu uso, tais como: boa qualidade sensorial, propriedades de barreiras e mecânicas eficientes, estabilidade bioquímica, físico-química e microbiológica, ser inócua, não poluente e de processamento simples e de baixo custo (DEBEAUFORT; QUEZADA-GALLO; VOILLEY, 1995).

A utilização de coberturas não é recente. Nos séculos XII e XIII, os chineses aplicavam revestimentos à base de ceras em laranjas e limões com o intuito de retardar a desidratação (HANDERBURG, 1967 apud KESTER; FENNEMA, 1986). No século XVI, os europeus protegiam a carne da perda de umidade através da aplicação de gordura animal (LABUZA; CONTERAS, 1981).

Atualmente, filmes e coberturas são usados numa variedade de aplicações, incluindo revestimento para lingüiça, coberturas de chocolate para nozes e frutas, e coberturas de ceras para frutas e vegetais. Entretanto, as informações técnicas envolvidas estão longe da adequada, deixando os cientistas de alimentos com a tarefa de desenvolver filmes e revestimentos específicos para cada tipo de alimento (DONHOWE; FENNEMA, 1994).

As vantagens dos filmes comestíveis e/ou biodegradáveis podem ser justificadas com base nas possibilidades funcionais das mesmas (KESTER; FENNEMA, 1986): controlar a migração de vapor d'água; permeabilidade ao oxigênio, dióxido de carbono e migração lipídica de um sistema alimentício. Além disso, podem ser introduzidos aditivos ao filme, tais como: antioxidantes, aromas e agentes antimicrobianos, melhorando com isso a integridade do produto.

A elaboração de biofilmes envolve a utilização de diversos componentes, cada qual com sua finalidade específica. Tais formulações são constituídas de pelo menos um agente formador de filme (macromoléculas), solvente (água, etanol, água/etanol, entre outros), plastificante (glicerol, sorbitol, etc), agente ajustador de pH (ácido acético,  $\text{NH}_4\text{OH}$ , etc).

Para formação de filmes e coberturas é necessária a utilização de pelo menos um constituinte capaz de formar uma matriz contínua e de coesão adequada, sendo este uma macromolécula (GUILBERT; CUQ; GONTARD, 1997). Entre eles, os principais grupos utilizados são proteínas (caseína, proteínas do soro do leite, proteína do milho (zeína), proteína do trigo (glúten), colágeno e gelatina), polissacarídeos e seus derivados (derivados da celulose, quitosana, amido, alginatos, pectinas e gomas) e lipídios (monoglicérides, ácidos graxos, ceras naturais, etc) (GUILBERT, 1986).

Os filmes elaborados a partir de polissacarídeos (celulose e derivados, carboidratos e derivados, gomas, entre outros) ou proteínas (gelatina, zeína, farinha de glúten, entre outras) possuem excelentes propriedades mecânicas e ópticas, porém são sensíveis à umidade e apresentam alto coeficiente de permeabilidade ao vapor d'água.

Ao contrário, os filmes compostos de lipídios (ceras, lipídios e derivados, entre outros) apresentam boas propriedades de barreiras ao vapor d'água, mas são opacos e pouco flexíveis (GUILBERT; 1986; GALLO et. al., 2000).

Cada grupo desses materiais utilizados na formulação dos filmes tem suas vantagens e desvantagens. Dessa forma, muitas coberturas e filmes atualmente são produzidos através da combinação dos mesmos (BALDWIN et al., 1997). A combinação de proteínas ou polissacarídeos com lipídios é vantajosa podendo promover melhores propriedades aos filmes (McHUGH, 1996). Afinal, as propriedades desejáveis de diferentes materiais são combinadas para formar filmes compostos, proteínas e polissacarídeos formam uma rede contínua e coesa, responsável pelas propriedades mecânicas, mas não são boas barreiras ao vapor de água em virtude da sua natureza hidrofílica. Com isso, limitam sua aplicação em produtos que requerem barreiras à umidade. Ao contrário, lipídios formam filmes com boa propriedade de barreira ao vapor de água, devido ao caráter hidrofóbico. Porém, filmes elaborados apenas com lipídeos são muito quebradiços (CALLEGARIN et. al., 1997).

Entre os materiais lipídicos estudados, as ceras, ácidos graxos saturados de cadeia longa e álcool graxo foram os mais efetivos em promover propriedades de barreira à umidade em filmes de hidrocolóides (YANG; PAULSON, 2000b). Lipídios podem ser incorporados na formulação de filmes protéicos na forma de filmes emulsionados ou bicamada (o lipídio é aplicado sobre a camada de filme protéico) (GALLO et. al., 2000).

Devido a isso, para a escolha do filme e/ou cobertura, é necessário conhecer primeiramente as características do produto. Na Tabela I encontram-se os tipos de filmes e coberturas e a justificativa para sua utilização:

**Tabela 1.** Possibilidade de uso de filmes e coberturas

| <b>Tipo de filme/cobertura apropriado</b> | <b>Uso</b>  |
|---|---|
| Lipídeos e compostos*                     | Retardar a migração de umidade                                |
| Hidrocolóides, lipídios e compostos*      | Retardar a migração de gases                                  |
| Hidrocolóides                             | Retardar da migração de óleos e gorduras                      |
| Hidrocolóides, lipídios e compostos*      | Retardar a migração de solutos                                |
| Hidrocolóides, lipídios e compostos*      | Promover a integridade estrutural ou propriedades de manuseio |
| Hidrocolóides, lipídios e compostos*      | Reteter componentes voláteis do sabor                         |
| Hidrocolóides, lipídios e compostos       | Transportador de aditivos                                     |

\*Filmes compostos constituem-se em formulações onde são combinados lipídios e hidrocolóides para formar um bicamada e emulsionados

Fonte: DONHOWE; FENNEMA, 1994.

O processo de produção dos filmes a partir de solução filme formadora envolve uma primeira etapa de solubilização da macromolécula em um solvente (água, etanol, solução de ácido acético e outros), ao qual podem ser incorporados diversos aditivos (plastificantes, agentes reticulantes, etc); na segunda etapa, a solução filme formadora é espalhada sobre um suporte e, usualmente, submetida à secagem (CUQ; GONTARD; GUILBERT, 1995).

A formação de filmes inicia-se com a formação do gel, envolvendo ligações inter e intramoleculares cruzadas entre cadeias de polímeros, formando uma matriz tridimensional semi-rígida que envolve e imobiliza o solvente utilizado (KESTER; FENNEMA, 1986). Segundo KINSELA (1984), a formação de filmes à base de proteínas está associado à interação entre as moléculas por via eletrostática, hidrofóbica, interação de Van der Waals, pontes de hidrogênio e ligações dissulfídicas, considerando ainda a influência direta das mesmas nas propriedades, sendo que os tipos de ligações variam quanto ao tipo de proteína e condições ambientais. O grau de coesão do filme depende da estrutura do polímero, processo e parâmetros de

fabricação (temperatura, tipo de solvente utilizado, técnica de aplicação e evaporação, entre outros), e da presença de agentes plastificantes (GUILBERT, 1986).

Um aumento na interação entre as cadeias de proteína resulta em filmes com maior rigidez. Por outro lado, apresentam-se menos permeáveis a gases, vapor d'água e líquidos (KESTER; FENNEMA, 1986). Para atenuar a alta rigidez é necessário adicionar ao filme um plastificante, o qual irá melhorar a flexibilidade do filme.

Os plastificantes são definidos como substâncias com alto ponto de fusão e baixa volatilidade. Quando adicionados a outro material provocam mudanças nas propriedades físicas, químicas e mecânicas dos mesmos (McHUGH; KROCHTA, 1994b). Além disso, em sua maioria, apresentam caráter hidrofílico, e, por serem normalmente moléculas pequenas, são facilmente acoplados entre as cadeias poliméricas devido à sua habilidade em reduzir a formação de pontes de hidrogênio entre as cadeias, causando um aumento do volume livre ou da mobilidade molecular do polímero (BODMEIER; PAERATAKUL, 1997). A incorporação de plastificante em biopolímeros modifica a organização molecular tridimensional da rede protéica, diminuindo as forças de atração intermoleculares e aumenta o volume livre do sistema. Conseqüentemente, a rede torna-se menos densa com o decréscimo das forças, melhorando a flexibilidade e extensibilidade dos filmes (SOTHORNVI; KROCHTA, 2000; CUQ et. al., 1996). Segundo DEBEAUFORT e VOLLEY (1997), o plastificante também pode agir como lubrificante da cadeia de biopolímeros, garantindo a flexibilidade do filme.

A escolha do plastificante a ser adicionado aos filmes deve ser realizada de acordo com a compatibilidade deste com o polímero e o solvente utilizados, isto é, deve ser miscível ao polímero e solvente, de forma a evitar a separação prematura no decorrer do processo de secagem, causando uma diminuição da flexibilidade do filme. Geralmente, a concentração de plastificante usado na elaboração de filmes varia de 10 a 60g/100g de matéria seca de polímero, dependendo da rigidez desejável no filme (GUILBERT, 1986).

Vários plastificantes vêm sendo utilizados na elaboração de filmes e coberturas. Entre eles, podem ser encontrados mono, di e oligossacarídeos (glicose, sacarose), polióis (glicerol, sorbitol, derivados da glicerina e glicerois), lipídios (ácidos graxos saturados, monoglicerídeos e derivados de éster, fosfolipídios e surfactantes) (GUILBERT, 1986) e triacetina (LIN; CHEN; RUN-CHU, 2000). Em se tratando de filmes de gelatina, os plastificantes mais comumente utilizados são o sorbitol (SAKANAKA, 2002; SOBRAL et. al., 2001; SARMENTO, 1999); glicerol (CARVALHO, 2002; YOSHIDA, 2002) e triacetina (FAKHOURI, 2002).

Os efeitos do tipo de plastificante, bem como a escolha de sua concentração, são processos complexos, pois o mesmo interfere diretamente nas características do filme a ser obtido, já que, com o aumento da mobilidade da cadeia, os coeficientes de difusão também aumentam, resultando em maior permeabilidade aos gases e ao vapor de água (FAIRLEY et. al., 1996).

Alguns lipídios (acetoglicerídeos, ácidos graxos, monoglicerídeos, fosfolipídios) são usados para aumentar a flexibilidade dos filmes poliméricos. Eles são considerados plastificantes, por enfraquecerem as forças intermoleculares entre as cadeias poliméricas adjacentes, influenciando, desta forma, as propriedades mecânicas dos filmes (CALLEGARIN et. al., 1997).

Os solventes utilizados na elaboração de filmes comestíveis normalmente são a água, etanol ou a combinação de ambos (KESTER; FENNEMA, 1986). A solubilidade da proteína está relacionada com a capacidade da mesma interagir com o solvente usado, sendo este um aspecto determinante na formação de filmes. A dispersão da proteína em água é possível devido ao grande número de resíduos de aminoácidos polares que interagem com o solvente. Essas interações podem ser melhoradas em função da constante dielétrica do solvente, que é inversamente proporcional à força de atração intermolecular (SGARBIERI, 1996). Solventes com alta constante dielétrica favorecem a solubilidade de proteínas, diminuindo a força de atração entre as moléculas.

Outro componente do filme é o agente ajustador de pH, que também influencia a solubilidade da proteína. O pH da solução afeta a natureza e a distribuição de cargas das proteínas, uma vez que os grupos polares são geralmente encontrados na região externa das proteínas, enquanto os apolares geralmente na região interna (WERTZ; SCHERAGA, 1978). Em geral, no ponto isoelétrico (pI) da proteína - quando uma molécula apresenta igual número de cargas positivas e negativas - é o pH de menor solubilidade (SGARBIERI, 1996). Nesse ponto, a interação proteína-proteína aumenta, devido às forças eletrostáticas das moléculas serem mínimas, provocando menor interação da água com as moléculas de proteína. Desta forma, propicia uma condição favorável para que as moléculas se aproximem e agreguem podendo ocorrer a precipitação (HALL, 1996). Em valores de pH acima ou abaixo do pI, as moléculas de proteínas possuem cargas positivas ou negativas em excesso, que interagem com as moléculas de água contribuindo para sua solubilização (SGARBIERI, 1996).

## **2.2 Filmes emulsionados**

Filmes emulsionados são caracterizados pela presença de lipídios na matriz contínua e obtidos através de uma homogeneização lipídica na solução protéica, formando uma emulsão (SHERWIN; SMITH; FULCHER, 1998). Essa separação estabelece um caminho mais tortuoso ou um aumento da distância para a difusão das moléculas quando comparadas com uma matriz composta apenas por substância hidrofílica (FAIRLEY; MONAHAN; GERMAN, 1997; KOELSCH, 1994). Os lipídios são utilizados devido ao seu caráter hidrofóbico e sua eficiência depende da estrutura química, grau de saturação, estado físico (sólido ou líquido), tamanho da cadeia, dimensão dos cristais e homogeneidade dos filmes, características que determinam a interação da partícula lipídica com outros componentes do filme, como proteínas e polissacarídeos. (GALLO et. al, 2000; McHUGH, 2000; CALLEGARIN, et al, 19997; GONTARD et al.;1994; PARK et al., 1994; MARTIN-POLO; MAUGUIN; VOILLEY, 1992).

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. Para estabilizar a emulsão é necessária a utilização de um agente emulsificante, que possui na mesma molécula partes hidrofílicas, que agem mutuamente com as moléculas de água, e partes hidrofóbicas, que interagem com a fase lipídica. Com isso, diminui a tensão superficial existente entre as duas fases, permitindo a formação da emulsão (SGARBIERI, 1996). Em filmes protéicos multicomponentes (proteína-lipídio), a proteína atua como um agente emulsificante. A estabilidade da emulsão é influenciada pela morfologia do filme, ou seja, pelas características da fase contínua (viscosidade, pH, força iônica, entre outras) e da fase dispersa (tamanho e densidade da partícula lipídica) (BALDWIN, 1997; CALLEGARIN et. al., 1997).

Vários autores vêm realizando pesquisas envolvendo filmes compostos, entre eles GALLO et al., (2000); McHUGH, (2000); CALLEGARIN, et. al., (19997); GONTARD et al. (1994); PARK et. al., (1994); MARTIN-POLO; MAUGUIN; VOLLEY (1992). KAMPER; FENNEMA, (1984a, 1984b).

De acordo com McHUGH (2000), filmes formados somente à base de lipídios promovem uma boa barreira à umidade, mas, para sua obtenção é freqüentemente necessária a utilização de solventes orgânicos ou altas temperaturas. Além disso, apresentam propriedades mecânicas pobres. GONTARD et. al., (1996) encontraram problemas na aplicação de filmes lipídios em alimentos, devido à baixa adesão, características heterogêneas e quebradiças, susceptibilidade à oxidação e propriedades sensoriais não aceitáveis.

## **2.3 Características do Filmes**

Diversas são as características envolvidas na produção dos filmes, entre as quais destacam-se a espessura, textura, sabor e aroma e cor e opacidade.

### **2.3.1 Espessura**

Segundo GENNADIOS, WELLER; TESTIN (1993b), o controle da espessura dos filmes é importante para sua uniformidade, repetitividade das medidas das propriedades e validade das comparações entre as propriedades dos biofilmes. A espessura deve ser

estabelecida levando-se em conta a utilização final do filme, que vai depender do alimento a ser embalado (SARMENTO, 1999).

Quando se controla a espessura, seja fixando-se a gramatura, seja fixando-se a espessura da solução no suporte, deve-se levar em consideração as características das formulações (SOBRAL, 1999). CUQ et al. (1996) observaram um aumento linear da resistência mecânica dos biofilmes com o aumento da espessura, o qual foi atribuído ao aumento da quantidade de matéria seca por superfície, implicando em um aumento superficial do número de cadeias de proteínas, e conseqüentemente aumento do número de interações intermoleculares. Segundo PARK e CHINNAN (1995), a permeabilidade ao vapor de água pode variar com a espessura dos filmes devido a mudanças estruturais causadas pelo inchamento da matriz hidrofóbica, o que afeta a estrutura dos filmes e provoca tensões internas que podem influenciar a permeação.

### **2.3.2 Textura**

De uma forma geral a textura está relacionada com a aparência do filme e pode ser avaliada por observações visuais e tácteis. O filme deve apresentar uma superfície contínua e homogênea, ou seja, não deve apresentar rupturas após o processo de secagem, nem partículas insolúveis, poros abertos, zonas de opacidade ou diferenças de coloração (CARVALHO, 1997).

### **2.3.3 Sabor e aroma**

Uma vez que os filmes e/ou coberturas comestíveis estarão em contato com os alimentos, é desejável que os mesmos apresentem características sensoriais neutras, de modo a não alterar as características dos alimentos. Filmes a base de hidrocolóides apresentam geralmente características sensoriais mais neutras que os formados de lipídios ou derivados, os quais podem apresentar sabor residual (GONTARD; GUILBERT, 1996).

### **2.3.4 Cor e opacidade**

Os filmes devem apresentar opacidade e coloração atrativas, e não deve sofrer alteração de cor com o tempo de armazenamento, para não prejudicar a aceitação do produto acondicionado. A transparência e a opacidade do polímero é consequência da morfologia ou estrutura química relacionada à massa molecular do material (CHEN, 1995). Quando a transparência é essencial para a aplicação de cobertura na superfície de um determinado produto, o uso de material lipídico, como cera de carnaúba ou cera de abelha deve ser limitado (GONTARD et. al., 1994). A adição de lipídios muda a aparência dos filmes de hidrocolóides, que se tornam mais opacos (KAMPER; FENNEMA, 1984b). GALLO et al. (2000) concluíram que filmes emulsionados de metilcelulose eram cinco vezes menos transparentes que o filme controle (sem lipídeos). YANG e PAULSON (2000b) observaram um aumento na opacidade de filmes de gelana proporcional à concentração de ácido esteárico-palmítico adicionada.

## **2.4 Propriedades dos filmes**

Os filmes comestíveis podem apresentar diferentes características e propriedades dependendo da formulação e do processo de fabricação.

### **2.4.1 Propriedades de Barreira**

#### **2.4.1.1 Propriedades de barreira ao vapor de água**

A proteção do alimento contra alterações provocadas pelo meio ambiente desde a sua obtenção até chegar ao consumidor é uma das preocupações mais importantes nos dias de hoje (MARTIN-POLO et. al., 1992). A migração de vapor de água é um dos principais fatores de alteração da qualidade sensorial e da estabilidade da estocagem (CHEN, 1995; GONTARD et. al. 1994, KAMPER; FENNEMA, 1984a). A cinética enzimática ou reações químicas nos alimentos, propriedades de textura e estabilidade microbiana e física em produtos alimentícios são fortemente influenciadas pelo conteúdo de umidade e podem mudar drasticamente as características do alimento durante o processamento e estocagem. Assim, muitas vezes é necessário limitar a

migração de umidade com substâncias capazes de prevenir a transferência da molécula de água, para maximizar a vida de prateleira (GONTARD et al., 1994, MARTIN-POLO, 1992). Estudos com filmes comestíveis e/ou biodegradáveis mostraram que os mesmos seriam uma efetiva barreira à umidade (GONTARD et. al., 1996; MARTIN-POLO; MAUGUIN; VOILLEY, 1992; MARTIN-POLO et. al., 1992; KAMPER; FENNEMA, 1984a).

O coeficiente de permeabilidade ao vapor de água é definido como a transferência do vapor permeante através de um material. A transferência de água em materiais poliméricos ocorre por difusão molecular. Esse processo envolve três etapas: (1) movimento do permeante para a superfície da estrutura do filme e sua adsorção dentro da matriz polimérica; (2) difusão através dos poros formados pelo movimento da cadeia polimérica do filme ou, na própria fabricação e (3) evaporação a partir da superfície do filme e sua conseqüente dispersão no ar (KESTER; FENNEMA, 1986).

O processo de difusão em sistema polímero/solvente depende do tamanho, natureza química, polaridade e configuração da molécula penetrante e do movimento molecular da cadeia do polímero na matriz do filme (KESTER; FENNEMA, 1986).

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) decresce com o aumento da hidrofobicidade na matriz. Portanto, a adição de substâncias hidrofóbicas (ácidos graxos, ceras, entre outras) na solução filmogênica melhora a propriedade de barreira nos filmes comestíveis e/ou biodegradáveis. Na solução filmogênica, as proteínas são parcialmente imobilizadas na interface pelas partículas lipídicas emulsionadas, fazendo com que os segmentos poliméricos apresentem uma menor mobilidade, reduzindo a difusividade da água através da proteína interfacial e diminuindo a permeabilidade ao vapor de água (McHUGHT; KROCHTA, 1994a).

AVENA-BUSTELLOS e KROCHTA (1993) desenvolveram filmes emulsionados à base de caseinato, contendo acetato de monoglicerídeos, cera de abelha e ácido esteárico e observaram que um aumento na concentração do material hidrofóbico nos filmes emulsionados resultou na diminuição dos valores de permeabilidade ao vapor de

água. KAMPER e FENNEMA (1984b) observaram que, aumentando a concentração de ácido esteárico nos filmes emulsionados, houve uma diminuição da permeabilidade ao vapor de água a 25°C e UR 85%. GONTARD et al. (1994), estudaram a adição de várias concentrações de lipídios a filmes comestíveis de glúten e observaram que os efeitos dessa adição nas propriedades de barreira a vapor de água dependeram das características dos lipídios e das suas interações com a matriz estrutural protéica.

A eficiência das propriedades de barreira dos filmes emulsionados depende da característica do componente lipídico, particularmente a hidrofobicidade, organização do complexo proteína-lipídio, interação entre esses dois componentes e distribuição uniforme das substâncias hidrofóbicas na matriz (GONTARD et al., 1994).

#### **2.4.1.2 Propriedades de barreira a gases**

A transferência de oxigênio do meio ambiente para o alimento tem grande importância na qualidade do mesmo e na sua vida de prateleira. O oxigênio causa deterioração do alimento, modificando as características sensoriais e nutricionais (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2000), e pode influenciar de forma significativa na sua estabilidade durante o armazenamento. A deterioração devido à permeabilidade ao oxigênio ocorre em muitos produtos alimentícios, envolvendo a oxidação de lipídios, vitaminas, compostos de sabor e pigmentos (KESTER; FENNEMA, 1989).

A deterioração dos alimentos promovida pela oxidação e respiração pode ser controlada através do uso de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis, estando diretamente relacionada à permeabilidade ao oxigênio e ao gás carbônico. Oxigênio e gás carbônico são dois gases, que estão diretamente relacionados com conservação de frutas frescas e vegetais bem como alimentos contendo lipídios (CHEN, 1995). O desenvolvimento de filmes e coberturas comestíveis com permeabilidade seletiva de gases é potencialmente interessante no controle da respiração, no efeito da atmosfera modificada, as quais promovem um aumento na preservação das frutas (GONTARD et al., 1996).

Muitas características devem ser consideradas na seleção de materiais para embalagens de atmosfera modificada para frutas e vegetais (GONTARD et al., 1996). Deve-se cuidar para que esse controle de gases seja benéfico ao produto, pois em frutas, quando muito rigoroso, pode provocar desordens fisiológicas, principalmente aquelas provenientes da deficiência de  $O_2$  e excesso de  $CO_2$ , além do aparecimento de sabor desagradável. Quando o controle de  $O_2$  é feito de maneira adequada, os principais benefícios são o retardamento dos processos ligados ao amadurecimento (CHITARRA; CHITARRA, 1990). Portanto, filmes e coberturas com uma propriedade de barreira a gases moderada são mais apropriados, para promover estabilidade do controle da respiração prolongando a preservação de frutas e vegetais (AYRANCI; TUNE, 2003).

Filmes à base de proteínas apresentam permeabilidade a gases ( $O_2$  e  $CO_2$ ) em baixos níveis (GENNADIOS; WELLER; TESTIN, 1993a). Segundo KROCHTA (1997), filmes protéicos ricos em pontes de hidrogênio, em ambiente com umidade relativa baixa ou média, assim como diversos filmes feitos de polímeros sintéticos, são excelentes barreiras ao oxigênio, característica que diminui conforme aumenta a umidade relativa. Segundo GONTARD et al. (1996) os filmes de glúten apresentaram uma permeabilidade ao oxigênio ( $PO_2$ ) muito baixa (1,24  $gmol/(m.s.Pa)$ ) a UR 0%, porém aumentando a UR ao redor de 20-40% a  $PO_2$  manteve-se relativamente constante (menor que 8  $gmol/(m.s.Pa)$ ) e quando a umidade foi aumentada para mais de 50% UR houve um aumento exponencial da  $PO_2$ . Isso se deve ao fato de a umidade ter um efeito plastificante o que causou um inchamento no polímero hidrofílico (proteína) resultando num aumento na permeabilidade aos gases (GENNADIOS; WELLER; TESTIN, 1993a).

A penetração de gases nos filmes depende de vários fatores, como: natureza do gás, estrutura do material, umidade relativa e temperatura (GONTARD et al., 1996). PARK et al. (1996) observaram um aumento na permeabilidade a gases nos filmes bicamadas de metilcelulose contendo ácidos graxos, conforme se aumentava a concentração e o tamanho da cadeia do ácido graxo adicionado. O mesmo

comportamento foi observado por FAKHOURI (2002), onde a adição de ácido láurico nos filmes de gelatina promoveu um aumento da permeabilidade ao oxigênio.

#### **2.4.2 Propriedades mecânicas**

As principais propriedades mecânicas dos filmes são a resistência à tração e a alongação. A resistência à tração é expressa pela tração máxima desenvolvida pelo filme em um teste de tração. A alongação é a habilidade do filme em se estender. Os filmes obtidos devem ser resistentes à ruptura e a abrasão, fazendo com que o alimento não perca sua integridade e proteção por manuseio e transporte. Além disso, ele deve possuir flexibilidade o suficiente para se adaptar a eventuais deformações no alimento sem dano mecânico (GONTARD et. al., 1994).

Filmes comestíveis preparados à base de polissacarídeos e hidrocoloídes são resistentes, enquanto os filmes de lipídios caracterizam-se por apresentarem baixa resistência mecânica. (KESTER; FENNEMA, 1986)

As propriedades mecânicas estão diretamente relacionadas com a natureza do material filmogênico utilizado e com a coesão da estrutura da matriz polimérica, que está relacionada com a distribuição e concentração inter e intramoleculares na estrutura filmogênica entre as cadeias de proteínas (CUQ; GONTARD; GUILBERT, 1998). Alguns lipídios, como acetoglicerídios, ácidos graxos, monoglicerídeos e fosfolipídios são utilizados para aumentar a flexibilidade dos filmes poliméricos, pois apresentam forças intermoleculares fracas entre as cadeias poliméricas adjacentes. A desvantagem é que a adição de material hidrofóbico aos filmes aumenta sua permeabilidade a gases (CALLEGARIN et al., 1997).

#### **2.5 Solubilidade em água**

A solubilidade em água é uma propriedade importante dos filmes comestíveis no que se refere ao seu emprego, pois algumas aplicações requerem insolubilidade em água para manter a integridade do produto (PÉREZ-GAGO; KROCHTA, 2001), como nos casos de utilização como proteção de alimentos onde a atividade de água é alta ou

onde o filme é submetido ao contato com água durante o processamento do alimento embalado (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992). Porém, em alguns casos, a solubilidade em água é requerida (PÉREZ-GAGO; KROCHTA, 2001), como nos casos em que os desidratados devam sofrer uma hidratação prévia ao consumo (sopas instantâneas, arroz semi-prontos, entre outros), dispensando o uso de embalagens (MONTERREY-QUINTERO, 1998).

## **2.6 Isotermas de sorção**

Isotermas de sorção interrelacionam o conteúdo de água de um alimento (g água/g de massa seca), com a atividade de água a uma temperatura constante (FENNEMA, 1996). Elas são úteis na determinação das condições de estocagem, secagem e na seleção da embalagem de diversos produtos, por fornecerem informações importantes das interações da água com o alimento ou do comportamento de constituintes específicos em sistemas alimentares diferentes (KINSELLA; FOX, 1986).

As isotermas de sorção são divididas em três regiões. A primeira região está localizada na faixa de atividade de água ( $a_w$ ) de 0 - 0,35 e representa a adsorção de água na monocamada; a segunda região com atividade de água entre 0,35 - 0,60, representa a adsorção nas demais camadas após a monocamada, e a terceira região, que corresponde a uma atividade de água superior a 0,60, representa a região onde a água é condensada no interior dos poros, causando a dissolução de materiais solúveis presentes (LOMAURO; BAKSHI; LABUZA, 1985).

Inúmeras equações são utilizadas para representar as curvas de sorção de alimentos, como GAB (Guggenheim-Anderson-De Boer) e BET (Brunauer-Emmett-Tetter). O modelo GAB abrange uma faixa de atividade de água entre 0,1 - 0,9, enquanto o modelo BET fornece um bom ajuste para uma variedade de alimentos na região de água entre 0,05 - 0,45 (RIZVI, 1995).

Os biofilmes à base de proteínas sofrem grande influência das condições ambientais, devido à característica hidrofílica das proteínas que possuem grupos

polares os quais podem adsorver água do ambiente e alterar as propriedades de barreira dos filmes. As isotermas de sorção dos biofilmes comestíveis produzidos a partir de proteína, como do amendoim, isolado de soja, zeína do milho e glúten de trigo, variam de acordo com sua natureza hidrofílica e propriedades de permeabilidade ao vapor de água. As isotermas de sorção obtidas de dados experimentais resultaram em uma estimativa do conteúdo de umidade de equilíbrio, que é necessário para prever as propriedades dos filmes em diferentes ambientes nas diferentes condições a que são submetidos (JANGCUHD; CHINNAN, 1999). Informações sobre a interação da água com o filme, ou seja, quanto ele pode ganhar ou perder, pode ser útil na determinação das condições ótimas de estocagem.

## **2.7 Temperatura de transição vítrea (Tg)**

Transição vítrea (Tg) refere-se à temperatura na qual ocorre uma mudança de fase de segunda ordem nos materiais amorfos (PEREZ, 1994). A determinação da temperatura tem despertado um grande interesse entre os cientistas de alimentos nos últimos anos, pois ajuda a explicar o comportamento químico e físico dos sistemas alimentícios (KUMAGAI; SUGIYAMA; IWAMOTO, 2000).

A transição vítrea é específica para cada material e corresponde a uma transição de ordem estrutural, levando a uma mudança da mobilidade e flexibilidade molecular (PEREZ, 1994). O valor da Tg é governado primeiramente pela composição química e pela presença de plastificantes e, secundariamente pelas características estruturais, como: ramificações da cadeia, ligações cruzadas e cristalinidade (ROGERS, 1985). Nessa temperatura o sistema passa de um estado vítreo para o estado gomoso. O estado vítreo é caracterizado por alta viscosidade, rigidez e estabilidade, dada por uma baixa mobilidade molecular, onde os movimentos moleculares estão restritos a movimentos rotacionais e movimentos de extremidade de fraca amplitude. Enquanto o estado gomoso a viscosidade diminui bruscamente e aumenta a mobilidade das cadeias de macromoléculas (SOBRAL, 1992 apud SOUZA, 2001). Desta maneira, a Tg pode resultar em um índice para o comportamento físico e físico-químico de um produto

alimentício, o que vêm despertado muita atenção devido às conseqüências no processamento e vida de prateleira dos mesmos (ROSS, 1995).

Em materiais parcialmente cristalinos, o aquecimento acima da  $T_g$  resulta no surgimento de um pico endotérmico na curva de fluxo de calor, correspondendo à temperatura de fusão ou *melting* ( $T_m$ ), sendo esta uma transição de primeira ordem (FERRY, 1980).

A  $T_g$  é dita uma transição termodinâmica de 2° ordem e a  $T_m$  (fusão) de 1° ordem. Ambas estão relacionadas a um movimento significativo das cadeias moleculares, isto é, uma relaxação primária (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

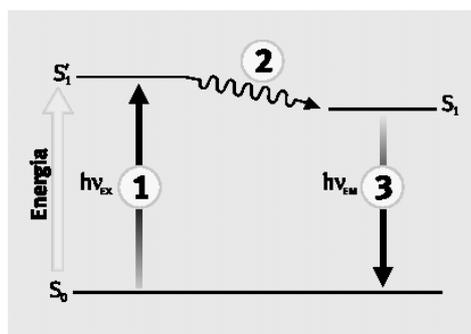
Os métodos dinâmicos mecânicos são muito sensíveis às transformações (ou movimentos) que ocorrem a nível molecular, sendo capazes de detectar não só movimentos significativos, como o caso da  $T_g$ , como também movimentos mais discretos conhecidos como relaxações secundárias (MENCZEL; JAFFE; BESSEY, 1997; LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001). As relaxações secundárias ocorrem na molécula principalmente a temperatura abaixo da  $T_g$ , e são representadas pelas letras gregas  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e outras, na ordem em que ocorrem, da mais alta para a mais baixa temperatura (MENCZEL; JAFFE; BESSEY, 1997).

As propriedades mecânicas e de barreira dos polímeros estão relacionadas com a  $T_g$ . Dessa forma, o conhecimento da temperatura de transição vítrea dos filmes comestíveis e/ou biodegradáveis ajuda na escolha das melhores condições de armazenamento, sendo esperado que a permeação a gases e ao vapor de água através dos filmes seja maior acima da  $T_g$ , onde as cadeias de polímeros estão em maior movimento (ROGERS, 1985).

Muitas técnicas são utilizadas para determinar a temperatura de transição vítrea, entre elas a calorimetria diferencial de varredura (DSC) e a análise mecânico-dinâmica (DMA), sendo esta última três vezes mais sensível (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002). Na determinação da temperatura de transição vítrea dos filmes de gelatina ambas as técnicas já foram utilizadas (CARVALHO, 2002; SAKANAKA, 2002).

## 2.8 Microscopia confocal de varredura a laser (MCLV)

Uma ferramenta importante na pesquisa de estruturas e organismos vivos é a microscopia digital de alta resolução, associada ao emprego de compostos químicos denominados fluoróforo (indicadores de fluorescência), como é o caso da microscopia confocal. Com a combinação dos princípios de fluorescência e da microscopia, pesquisadores de distintas áreas podem obter imagens em duas e três dimensões. A fluorescência desses compostos resulta de um processo que apresenta três estágios: excitação, tempo de vida do estado de excitação e emissão de luz (Figura 1).



**Figura 1.** Processo de criação do estado de excitação, com a subsequente emissão da fluorescência (SMALLI, 2001).

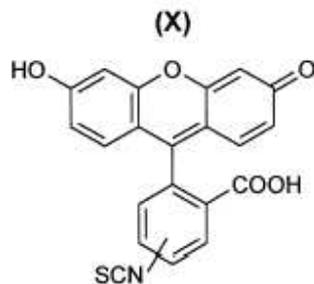
A excitação ocorre quando fótons de energia  $h\nu_{ex}$ , fornecidos por uma fonte de energia (feixe laser), são absorvidos por elétrons do fluoróforo. A absorção dos fótons faz com que os elétrons saltem para outro nível energético, atingindo assim um “estado excitado” ( $S_1'$ ), tendo um ‘tempo de vida’ finito (entre 1 e 10 milionésimos de segundo). Nesse intervalo, o fluoróforo passa por uma mudança em sua conformação e pode interagir com uma série de moléculas presentes no mesmo meio. Com isso, a energia do estado excitado ( $S_1'$ ) é parcialmente dissipada, e o fluoróforo alcança o ‘estado de emissão’ ( $S_1$ ), quando os elétrons emitem, em forma de luz (fluorescência), o excesso de energia que ainda contêm. Nem toda molécula excitada retorna ao estado de repouso ( $S_0$ ) ao emitir a fluorescência. Outros processos (apagamento, transferência de energia e cruzamentos) também podem contribuir para ‘esvaziar’  $S_1$  (SMALLI, 2001).

Na emissão, cada elétron (do fluoróforo) no estado  $S_1$  emite um fóton de energia  $h\nu_{em}$ , retornando ao estado de repouso inicial ( $S_0$ ). A energia desse fóton emitido é menor que a do fóton absorvido no início ( $h\nu_{ex}$ ), por causa da energia dissipada durante o tempo de vida de excitação. Essa diferença, expressa nos comprimentos de onda diferentes da luz absorvida e da luz emitida, é fundamental para a sensibilidade das técnicas de fluorescência, pois permite 'separar' os dois feixes luminosos, isolando a fluorescência. O processo de fluorescência é cíclico: a menos que um fluoróforo seja destruído durante a excitação, fenômeno conhecido como fotoapagamento (photobleaching), o mesmo composto pode ser repetidamente excitado e detectado. No caso de moléculas em solução, as energias  $HV_{ex}$  e  $HV_{em}$  formam espectros de excitação e de emissão, respectivamente, sendo o espectro de excitação distinto do de emissão, em função da perda de energia durante a excitação. Também há diferença entre os espectros de emissão de fluoróforos distintos, o que permite definir o fluoróforo a ser aplicado de acordo com que se deseja observar, em especial quando se utiliza mais de um, para medidas simultâneas. O conhecimento dos espectros de emissão e o comportamento do fluoróforo são essenciais para a escolha do equipamento apropriado e para seu uso para diferentes fins (SMAILI, 2001).

Uma gama muito grande de corantes com fluorescência é comercializada, o que permite investigar estruturas específicas, como é o caso do isotiocianato de fluoresceína (FITC) e Nile Red. O FITC é utilizado na identificação de camadas de proteínas, onde reage espontaneamente com aminas primárias neutras, formando produto colorido ligado, covalentemente a moléculas os grupos amino e visualizado em 485/530 nm, de acordo com a reação abaixo (LAMPRECHT; SCHAFFER; LEHR, 2000).

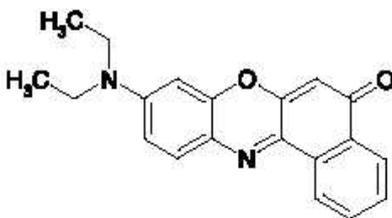


onde x corresponde a:



**Figura 2.** Reação esquemática de identificação de proteína com corante FITC.

Nile Red é um corante fluorescente utilizado na identificação de grupos hidrofóbicos. A fluorescência do corante mostra-se fortemente dependente da polaridade do meio, podendo variar de fortemente vermelho a azul, dependendo do solvente utilizado (BERTSCH; MAYBURD; KASSNER, 2003). O corante Nile Red fluoresce intensamente quando ligado a lipoproteínas, mas não à gelatina (SACKETT; WOLF, 1987). Tal corante é uma ferramenta útil na identificação de sítios hidrofóbicos em proteínas nativas (SACKETT; WOLF, 1987), sendo visualizado em 487-489 e 530-550 nm, dependendo do solvente (GREENSPAN; MAYER; FOWLER., 1985).



**Figura 3.** Estrutura Nile Red.

## 2.9 Gelatina

Entre os hidrocolóides disponíveis, a gelatina é a mais popular e utilizada largamente nas indústrias alimentícia e farmacêutica devido à suas propriedades funcionais interessantes, sendo produzida em grande escala e a preços relativamente baixos. A gelatina é uma proteína animal, solúvel em água e resultante da hidrólise ácida ou básica do colágeno (POPPE, 1987), cujas propriedades (distribuição de massa

molecular, estrutura e composição em sub-unidades) dependem do processo de obtenção e da matéria prima (BELL, 1989).

A gelatina é uma proteína de fácil digestão, contendo a maioria dos aminoácidos essenciais, com exceção do triptofano. É ainda o principal componente estrutural de tecidos conectivos brancos e está presente em órgãos e tecidos. Constitui quase 30% da proteína total em vertebrados e invertebrados e, ao microscópio, aparece como fibras brancas opacas, circundadas por outras proteínas e mucopolissacarídeos (POPPE, 1987).

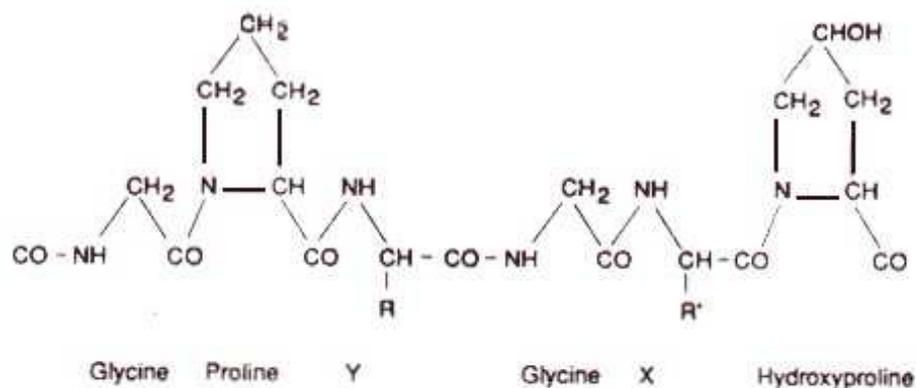
A obtenção da gelatina comercial pode ser dividida em duas etapas. Primeiramente, o colágeno é desnaturado a 40°C e posteriormente submetido à hidrólise (ácida ou básica) para quebra das ligações covalentes. Mediante o tipo de pré-tratamento utilizado para retirar as impurezas e iniciar o processo de hidrólise, a gelatina pode ser classificada em dois grupos: gelatina tipo A, quando o pré-tratamento é realizado por um ácido com ponto isoelétrico entre 7,0 e 9,0 e gelatina tipo B, obtido por pré-tratamento básico, com ponto isoelétrico situado entre 4,6 – 5,2 (GENNADIOS et al., 1994).

Comercialmente, a gelatina é encontrada na forma de cristais de coloração amarelo-palha (BIGI et al., 1998). A gelatina é insolúvel em água fria, porém, possui uma característica particular de inchamento, podendo absorver até dez vezes seu peso em água. Essa característica depende do tamanho da partícula, mais precisamente da sua área superficial por unidade de peso (PRIEBBENOW, 1991). A gelatina pode ser dissolvida indiretamente, quando suas partículas ficam em repouso até formar uma massa homogênea, sendo então levada ao aquecimento (50-60 °C) até a sua dissolução completa. A dissolução direta é obtida com a adição de água quente (60-80 °C) sob forte agitação. O método direto, devido à agitação, pode fazer com que a gelatina espume (JONSTON-BANKS, 1990), o que se torna inconveniente na elaboração de filmes comestíveis.

Do ponto de vista estrutural, a gelatina diferencia-se das demais proteínas pela considerável ausência de ordem interna e pela configuração aleatória das cadeias de polipeptídios em solução aquosa (GENNADIOS et. al., 1994). Do ponto de vista prático, as características mais marcantes da gelatina são a solubilidade em água e a capacidade de formar gel termo-reversível após ser aquecida, solubilizada e resfriada. O mecanismo de formação envolve interligações iônicas entre grupos amino e carboxil dos aminoácidos com a ajuda de pontes de hidrogênio (KESTER; FENNEMA, 1986).

A nível molecular, a formação de gel pela gelatina em solução envolve a renaturação de estrutura no estado desordenado para estruturas de tripla hélice características do colágeno no estado nativo. A renaturação da tripla hélice age como junções na formação da rede tridimensional. A estrutura da rede e as propriedades físicas do gel de gelatina são mantidas principalmente pelo nível de renaturação, os quais tem se demonstrado nas propriedades mecânicas (ACHET; HE, 1995).

Estruturalmente, as moléculas de gelatina contêm seqüência tripla repetidas de glicina-X-Y, onde X e Y são freqüentemente os aminoácidos prolina e hidroxiprolina. Essas seqüências são responsáveis pela estrutura de tripla hélice da gelatina e pela sua habilidade em formar géis, imobilizando a água nas regiões helicoidais formadas pelas cadeias protéicas de gelatina.



**Figura 4.** Estrutura da cadeia de gelatina (POPPE, 1987).

As proteínas são boas formadoras de filmes e muitas vezes são usadas em formulações de cobertura para frutas e vegetais frescos (ARVANITTOYANNIS; NAKAYAMA; AIBA, 1998). A gelatina tem sido mais utilizada na fabricação de coberturas comestíveis, como barreira à migração de oxigênio, umidade e óleo, ou ainda como meio de fixação de agentes antimicrobianos ou antioxidantes. A gelatina também é usada como encapsulador de ingredientes com baixo teor de umidade ou de fase óleo, na indústria farmacêutica (KROCHTA; MULDER-JOHNSTON, 1997). As características de barreira de umidade de filmes feitos com gelatina desidratada, caseína, albumina e ovalbumina podem ser melhoradas através das interligações dessas proteínas com ácido láctico ou tânico (KESTER; FENNEMA, 1986).

FAKHOURI (2002) recobriu goiabas brancas no estágio “verde maduro” com coberturas de gelatina, triacetina e ácido láurico, sendo as mesmas estocadas sob refrigeração a 12° C durante 20 dias, juntamente com frutas controle (sem cobertura). As coberturas mostraram se efetivas na extensão da vida útil das goiabas, aumentando sua vida de prateleira em 12 dias, em relação à fruta sem cobertura.

## 2.10 Ácidos graxos

São denominados ácidos graxos todos os ácidos monocarboxílicos alifáticos. No entanto, salvo algumas exceções, todos os ácidos encontrados na natureza são de alto peso molecular, em geral de cadeia linear (também denominados ácidos graxos normais); saturados e insaturados. Os principais ácidos graxos saturados são o láurico, o palmítico e esteárico (tabela II). Os insaturados são: oléico, linoleico e linolênico (BOBBIO; BOBBIO, 2003).

**Tabela 2.** Ácidos graxos saturados encontrados em alimentos.

| Nome                   | Fórmula                                    | Fonte   |
|------------------------|--|---|
| <b>Ácido Láurico</b>   | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$    | Óleo de semente de <i>Lauraceae</i> , gordura de leite                                  |
| <b>Ácido Palmítico</b> | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ | Óleo de semente de soja e algodão, oliva, abacate, amendoim e milho, manteiga de cacau. |
| <b>Ácido Esteárico</b> | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ | Gordura animal, plantas tropicais (manteiga de cacau)                                   |

Fonte: BOBBIO; BOBBIO, 2003, p. 146.

Os pontos de fusão e ebulição dos ácidos aumentam de maneira mais ou menos uniforme com o aumento da cadeia, sendo influenciados pelo comprimento da cadeia e pela presença de ramificações. Os ácidos láuricos, palmíticos e esteáricos possuem ponto de fusão de 44°C, 63°C e 69,3°C, respectivamente, e são insolúveis em água (BOBBIO e BOBBIO, 2003; MORRISON; BOYD, 1983).

Segundo WONG et al., (1992), a incorporação de ácidos graxos a filmes comestíveis pode promover uma redução na permeabilidade ao vapor de água. Vários autores pesquisaram os benefícios da adição de ácidos graxos a filmes comestíveis

(AYRANCI; TUNE, 2001; YANG; PAULSON, 2000b; RHIN et. al. 1999, GONTARD et. al. 1994).

### 2.11 Breu Branco

O breu branco (ou “elemi do Brasil”) é um dos nomes vulgares de uma resina de origem vegetal, que exsuda do caule de várias espécies da família botânica *Burseraceae*, gênero *Protium*, ocorrendo principalmente nas regiões tropicais do Novo Mundo. Essa família é representada principalmente pelas mais de cem espécies do gênero *Protium* (SUSUNAGA, 1996; SILVA, 1995). Para sua extração, fazem-se incisões nas cascas das árvores, renovadas periodicamente (COSTA, 1988), ou se colhem no solo as massas de resina produzidas pela copa das árvores, induzidas por agentes mecânicos ou biológicos.



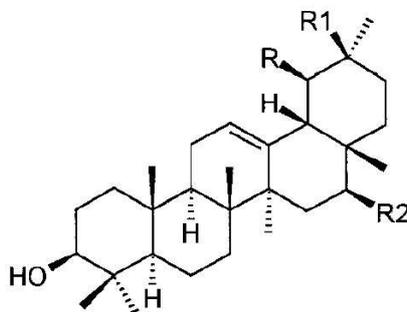
**Figura 5.** Pedra de breu branco bruta.



**Figura 6.** Pedra de breu branco purificada.

O breu branco classifica-se como óleo resina, pois é passível de dissolução em solventes apolares, devido a uma constituição altamente hidrofóbica. Naturalmente, apresenta-se como massa de consistência branda, de cor amarelo clara, adquirindo um aspecto resinoso após exposição ao ar. Possui cheiro próprio, agradável, sendo parcialmente solúvel em álcool frio e insolúvel em água (COSTA, 1988). Constitui-se basicamente de substâncias triterpenóides, numa mistura de elementos voláteis (monoterpenos) e fixos (triterpenos) (RAMOS et al., 2000).

Na fração fixa da resina, a ocorrência da mistura de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina é majoritária em relação aos outros triterpenóides. Outras substâncias usualmente encontradas são o maniladiol, a breína e os ácidos derivados do lanosterol, com variações nas estruturas pentacíclicas descritas para diferentes espécies (MAIA et. al., 2000; SUSUNAGA, 1996). Os triterpenóides ocorrem na natureza em frutas cítricas, raiz de alcaçuz e em soja (SIMÕES; SPITZER, 1999).



**Figura 7.**  $\alpha$  e  $\beta$ amirina, sendo R= CH<sub>3</sub> e R<sub>1</sub>= H; R= H e R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub>, para  $\alpha$  e  $\beta$  amirinas, respectivamente.

Os exsudados das espécies da família Burseraceae ocupam um lugar destacado na etnobotânica nas regiões onde ocorrem, pois são utilizados para as mais variadas finalidades, sendo uma fonte alternativa de produtos naturais, utilizada na forma de matéria-prima para a indústria (SILVA, 1995). A resina tem sido amplamente usada pela população na medicina caseira, principalmente no tratamento de feridas, mas também como analgésico e anti-séptico (SUSUNAGA, 1996; PERNET, 1972). A fumaça oriunda

da incineração da resina é utilizada para afugentar insetos. A alta viscosidade, associada à resistência e hidrofobicidade apresentada pelo breu, é apropriada para processos de calefatação de barcos, assim como fixação de pedras ornamentais e mármore, vidros; como aditivo para papel, destinado ao controle de absorção de água. A indústria de tintas, principalmente artísticas, utiliza o poder adesivo das resinas como fixador e como vernizes (ZOGHBI; MAIA; LUZ, 1995). Na indústria farmacêutica, é utilizada para preparar emplastos, esparadrapos e pomadas (SILVA, 1995). A fração volátil encontra uso na perfumaria e desinfecção de ambientes.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Materiais**

Gelatina Tipo A (bloom = 244, viscosidade 35 mps, umidade = 9,8% e diâmetro de partícula = 6 mesh,), gentilmente cedida pela indústria **LEINER DAVIS GELATIN**; triacetina cedida pela RHODIA, ácidos láuricos, palmítico e esteárico (Vetec) e breu branco fornecidos pela **Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)** do Rio de Janeiro.

#### **3.2 Ensaio preliminares**

Foram realizados ensaios preliminares com o objetivo de encontrar a melhor forma de incorporar o breu branco à solução de gelatina e determinar a concentração máxima possível de ser adicionada.

#### **3.3 Elaboração dos filmes**

##### **3.3.1 Elaboração dos filmes à base de gelatina e triacetina**

A solução filme formadora (SFF) foi obtida hidratando-se 10g de gelatina em 100ml de água destilada, por 1 hora, em temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi solubilizada a 90<sup>0</sup>C, em banho termostático, por 10 minutos. Após completa solubilização, foi adicionada a triacetina (15% em relação à massa seca de gelatina) previamente aquecida em chapa quente, sob agitação magnética, até a homogeneização da amostra. Em seguida a solução foi levada a outro banho-maria a 40-50 <sup>0</sup>C, por 30 minutos, sob agitação suave para evitar a formação de bolhas na amostra, sendo mantido o pH natural da solução. A solução foi aplicada sobre placas plaxiglass de 15 cm X 15cm. O controle da espessura foi efetuado através do volume de solução filmogênica aplicado no suporte e submetida à secagem em temperatura ambiente (aproximadamente 25-30<sup>0</sup> C) por 24 horas. Após a secagem, os filmes permaneceram em dessecadores mantidos a 25<sup>0</sup>C e 52 ± 2% de umidade relativa (URE), durante 48h antes do início das análises.

### **3.3.2 Elaboração de filmes compostos de gelatina, triacetina e ácido esteárico ou palmítico**

A solução filme formadora (SFF) foi obtida por processo idêntico ao utilizado em 3.3.1. Após esse período, a solução foi solubilizada a 90<sup>0</sup>C, em banho termostático, por 10 minutos (Solução A). Paralelamente, o ácido graxo (esteárico ou palmítico) na concentração de 10% (em relação à massa de gelatina) e a triacetina (15% em relação à massa seca de gelatina) foram aquecidos em chapa quente até completa solubilização do ácido (Solução B). Após completa solubilização da solução A foi adicionada a solução B, sob agitação magnética até a homogeneização. A solução foi então levada a outro banho-maria a 40-50 <sup>0</sup>C por 30 minutos, sob agitação suave para evitar a formação de bolhas na amostra, sendo mantido o pH natural da solução. A solução filme formadora foi aplicada sobre placas plaxiglass de 15 cm X15cm. O controle da espessura, secagem e armazenamento dos filmes foram efetuados da mesma maneira que na etapa anterior.

### **3.3.3 Elaboração de filmes compostos de gelatina, triacetina e ácido esteárico e palmítico**

A solução filme formadora (SFF) foi obtida da mesma forma que na etapa 3.3.2, diferindo-se apenas com relação à solução B, onde foram adicionados os ácidos graxos (1:1 ácido esteárico e palmítico em peso, perfazendo 2g) e a triacetina (15% em relação à massa seca de gelatina) e aquecidos em chapa quente até completa solubilização do ácido (Solução B). Após completa solubilização da solução A, foi adicionada a solução B, sob agitação magnética, até a homogeneização. A solução filme formadora foi levada a outro banho-maria a 40-50 <sup>0</sup>C por 30 minutos, sob agitação suave, sendo mantido o pH natural da solução. A solução foi enfim aplicada sobre placas plaxiglass e o controle da espessura, secagem e armazenamento foi realizado como na Etapa 3.3.1.

### **3.3.4 Elaboração de filmes compostos de gelatina, triacetina e ácido esteárico e palmítico e ácido láurico ou breu branco**

A solução filme formadora (SFF) foi obtida da mesma forma que na etapa 3.3.3, sendo acrescentada à solução B, o ácido láurico ou o breu branco (nas concentrações de 1, 2,5, 5 e 10% em relação à massa de gelatina). Após completa solubilização da solução A, foi adicionada a solução B, sob agitação magnética, até a homogeneização. A solução filme formadora foi levada a outro banho-maria a 40-50 °C por 30 minutos, também sob agitação suave, sendo mantido o pH natural da solução. A solução resultante foi aplicada sobre placas plaxiglass e o controle da espessura, secagem e armazenamento foram realizados como na Etapa 3.3.1.

## **3.4 Caracterização dos filmes**

### **3.4.1 Aspecto visual**

Para cada tipo de filme produzido foram realizadas análises visuais e táteis, visando utilizar apenas os filmes que fossem homogêneos (avaliação quanto à presença de partículas insolúveis e coloração uniforme), apresentassem continuidade (sem a presença de rupturas ou zonas quebradiças) e possibilitassem o manuseio (facilidade em retirar os filmes do suporte). Os filmes que não apresentaram tais características foram descartados.

### **3.4.2 Espessura**

A espessura dos filmes foi determinada utilizando-se um micrômetro digital (resolução 0,001mm), MITUTOYO. A espessura foi fixada como sendo a média aritmética de dez medidas aleatórias sobre a área do filme. Essa medida foi obtida após o período de acondicionamento dos filmes.

## **3.5 Permeabilidade ao vapor de água**

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes foi determinada gravimetricamente a 25° C, de acordo com o método padrão E-96-95 da ASTM (ASTM,

1995). O filme em forma de disco foi selado com parafina em células de permeação feitas de alumínio, contendo cloreto de cálcio. A selagem foi feita para garantir que toda a migração de umidade ocorresse através do filme. As células de permeação foram então acondicionadas em dessecadores com temperatura e umidade relativa controladas (através de uma solução de NaCl saturada, com umidade relativa correspondendo a 75%). O vapor de água transferido através do filme foi determinado pelo ganho de peso do cloreto de cálcio, medido a cada 24 horas por 7 dias. Os testes foram realizados em triplicata. A taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) foi calculada através da equação

$$TPVA = \frac{Mp \times espessura}{A \times Tempo \times \Delta p}$$

Onde:

Mp: corresponde à massa de umidade absorvida (g).

A: área da superfície exposta do filme (m<sup>2</sup>).

Δp: diferença de pressão parcial através do filme.

### 3.6 Solubilidade em água

A solubilidade em água dos filmes foi determinada segundo o método proposto por GONTARD et al. (1994). As amostras foram feitas em triplicata, sendo recortadas em discos de 2 cm de diâmetro. A massa seca inicial dos filmes foi obtida após secagem em estufa de circulação de ar à temperatura de 105°C, por 24h. Após a primeira pesagem, as amostras foram imersas em um recipiente contendo 50 ml de água destilada, e o sistema foi mantido sob lenta agitação mecânica por um período de 24h, a temperatura ambiente. Após esse período, as amostras solubilizadas foram submetidas novamente a secagem a 105°C por mais 24 h, para a obtenção da massa seca final. A solubilidade foi expressa de acordo com a equação:

$$Solubilidade = \frac{(M_i - M_f)}{M_i \times 100}$$

Onde:

$M_i$  = massa seca inicial.

$M_f$  = massa seca final (após solubilização).

### 3.7 Propriedades mecânicas

A resistência a tração e a porcentagem de alongação na ruptura (E) dos filmes foram determinadas utilizando-se um texturômetro TA-XT2 (SMS, Surrey, UK) de acordo com o método padrão ASTM D 882 (ASTM, 1995). As amostras foram cortadas, apresentando 100 mm de comprimento e 25mm de largura. A distância inicial de separação das garras e velocidade de realização do teste foram fixadas em 50mm e 1mm/s, respectivamente.

A resistência a tração foi calculada dividindo-se a força máxima no rompimento do filme, pela área de secção transversal. A alongação na ruptura foi determinada dividindo-se a distância final de separação da “probe” pela distância inicial de separação (50 mm), multiplicada por 100 (JANGCHUD; CHINNAN, 1999). A média das espessuras requeridas para o cálculo da área seccional foi determinada utilizando-se 5 medidas obtidas ao longo do filme.

$$RT = \frac{F_m}{A}$$

Onde:

RT: resistência a tração (Mpa).

$F_m$ : força máxima no momento da ruptura do filme (N)

A: área da secção transversal (m<sup>2</sup>)

$$E = \frac{d_r}{d_{inicial}} \times 100$$

Onde:

E: alongação (%)

$d_r$ : distância no momento da ruptura (cm) = diferença entre a distância de separação no momento da ruptura e a distância inicial (5 cm)

$d_{inicial}$ : distância inicial de separação (5 cm)

### 3.8 Permeabilidade ao oxigênio

A taxa de transmissão de oxigênio (TTO) foi determinada utilizando-se uma modificação do método padrão ASTM D 3985-81 com um aparelho OX-TRAN 2/20 (Mocon, Inc) a 25°C. A permeabilidade ao oxigênio ( $PO_2$ ) foi determinada, em duplicata, à temperatura de 25°C e calculada através da equação:

$$PO_2 = \frac{TTO \times e}{\Delta p}$$

Onde:

$PO_2$  = permeabilidade ao oxigênio ( $\text{cm}^3 \mu\text{m} / \text{m}^2 \text{ dkPa}$ )

TTO = taxa de transmissão de oxigênio ( $\text{ml} / \text{m}^2 \cdot \text{dia}$ ).

e = espessura

$\Delta p$  = diferença de pressão parcial entre os dois lados do filme (Kpa)

A diferença de pressão através do filme corresponde à pressão atmosférica (101,3 KPa), sendo as amostras do filme, sujeitas a 100% de gás oxigênio de um lado e de um gás de arraste contendo 98% de nitrogênio e 2% de hidrogênio do outro lado. As análises foram realizadas em duplicata nos filmes acondicionados à temperatura de 25

°C,  $52 \pm 2$  % de umidade relativa, durante 48 h. Para facilitar a fixação do filme foi utilizada uma máscara de alumínio (área exposta fixa = 8cm).

### 3.9 Opacidade

A opacidade dos filmes foi determinada utilizando-se colorímetro Hunterlab (Colorquest II, Faifax). As determinações foram feitas em triplicata após a calibração do colorímetro com um fundo padrão branco e um fundo padrão negro. A opacidade foi determinada através da equação (HUNTERLAB,1997):

$$Op = \left( \frac{Op_N}{Op_B} \right) \cdot 100$$

Onde:

$Op$  = opacidade do filme (%);

$Op_N$  = opacidade do filme sobreposto a um fundo negro e

$Op_B$  = opacidade do filme sobreposto a um fundo branco.

### 3.10 Microscopia eletrônica de varredura

A microestrutura dos filmes foi avaliada utilizando-se microscopia eletrônica de varredura (JEOL SCANNING MICROSCOPE -JMS-5800LV) a 5 kV. Os filmes foram equilibrados em dessecadores contendo sílica gel (25°C), por um período de sete dias, após os quais foram fraturados. As amostras de filme fraturados foram fixadas em suporte (“stubs”) de alumínio, com fita condutiva de cobre. Após esse período, as amostras foram recobertas com ouro (SPUTTER COATER BALZERS–SCD 050) a 25 °C e pressão de  $2 \times 10^{-5}$  Torr por 180s. As amostras recobertas foram observadas em microscópio de varredura eletrônica. Foram realizadas observações na superfície dos filmes.

### **3.11 Microscopia confocal de varredura a laser (MCLV)**

As microestruturas dos filmes foram analisadas utilizando-se microscopia de varredura laser confocal Olympus LSM-Fluoview versão 3.2 (Olympus, Tóquio, Japão). A gelatina solubilizada após hidratação foi corada com corante FITC (isotiocianato de fluoresceína) específico para proteína, segundo metodologia proposta por SCHREIBER; HAIMOVICH (1983) apud LAMPRECHT; SCHAFFER; LEHR (2000), com a concentração modificada (50µl/2,5g de proteína). Após a adição, a solução de proteína contendo o corante foi agitada com agitação magnética lenta sob aquecimento de 40°C por uma hora antes de ser utilizada. Em seguida a triacetina; triacetina e ácido graxo (ácido esteárico, palmítico e a blenda de ambos os ácidos); triacetina, blenda dos ácidos e breu ou ácido láurico (10%) foram corados com o corante "NILE RED" (1mg/30g de substância hidrofóbica), segundo a metodologia proposta por LAMPRECHT; SCHAFFER; LEHR (2000). Decorrido o tempo necessário para reação do corante FITC com a proteína, foram adicionadas as substâncias hidrofóbicas previamente coradas à solução de gelatina corada, sob agitação magnética até a homogeneização. As soluções filme formadoras com os corantes foram levadas a outro banho maria a 40-50 °C por 30 minutos, também sob agitação suave, sendo mantido o pH natural da solução. A solução filme formadora foi aplicada então sobre placas plaxiglass e o controle da espessura, secagem e armazenamento foram realizados como na Etapa 3.2.1.

### **3.12 Isotermas de sorção**

Os biofilmes foram cortados em pedaços pequenos (aproximadamente 2 x 2 cm), e pesados (mínimo de 0,5 gramas). As amostras foram, então, armazenadas em recipientes com soluções salinas e acondicionadas em câmaras de temperatura controlada (BOD TECNAL, MODELO TE-390) a 25°C. As soluções salinas foram escolhidas de modo a abranger uma ampla faixa de umidade relativa (0,114 a 0,904). Os sais utilizados e os respectivos valores de atividade de água encontram-se na Tabela 3 (LABUNZA; KANAME; CHEN, 1986). Uma vez alcançado o equilíbrio, num período de aproximadamente 20 dias, os filmes foram pesados para se obter o peso

final e calcular as isotermas de adsorção. Os testes de adsorção foram feitos em triplicata.

**Tabela 3. Umidade relativa das soluções salinas saturadas a 25°C**

| SAL                               | ATIVIDADE DE ÁGUA (T=25°C) |
|-----------------------------------|----------------------------|
| LiCl                              | 0,114                      |
| MgCl <sub>2</sub>                 | 0,329                      |
| K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>    | 0,443                      |
| Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 0,536                      |
| NaCl                              | 0,762                      |
| BaCl <sub>2</sub>                 | 0,904                      |

Fonte: Labuza; kanane; Chen, 1986.

### Modelos de isotermas de adsorção

Os modelos GAB (Guggenheim-Anderson-de Boer) e BET (Brunauer-Ermmett-Tetter) mostrados a seguir foram ajustados aos dados experimentais através do programa Water Analyzer Series – Isotherm/BET/GAB Program version 2.05p. (Macintosh) para estimar as constantes dos modelos.

$$\text{GAB} \quad X = \frac{xm.c.k.aw}{(1 - k.aw)(1 - k.aw + c.k.aw)}$$

$$\text{BET} \quad X = \frac{xm.c.aw}{1 + aw(c - 1)(1 - aw)}$$

### 3.13 Análise dinâmica mecânica (DMA)

A temperatura de transição vítrea (Tg) dos filmes foi determinada utilizando-se o equipamento DMA (Dynamic Mechanical Analysis DMA 2980, TA Instruments). Os filmes foram acondicionados a 25°C e 52% de umidade relativa por um período de 72

horas. As amostras foram cortadas em tiras e fixadas em um suporte apropriado. Foi aplicado um módulo de tensão sobre as amostras de filmes simultaneamente ao aquecimento. As medidas foram conduzidas utilizando-se a frequência de 1 Hz, amplitude de 20 $\mu$ m, força de 1N e corrida na faixa de -100 a 150 °C, com taxa de aquecimento de 2°C/min. As medidas de módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e ângulo de perda ( $\tan \delta$ ) foram registradas e plotadas contra a temperatura para a análise de transição térmica. A temperatura de transição vítrea foi determinada no ponto de inflexão da curva do parâmetro ângulo de perda ( $\tan \delta$ ) em função da temperatura (CHERIAN et al., 1995).

### **3.14 Análise termogravimétrica**

A determinação da curva de degradação/perda de massa foi realizada por análise termogravimétrica, utilizando TGA SDT 2960 da TA Instruments. O filme de gelatina foi acondicionado a 25°C e 52% de umidade relativa por um período de 7 dias, posteriormente cortado (20-25mg) e acondicionado em uma “panelinha” de platina. A análise foi realizada utilizando taxa de aquecimento de 10°C/min, entre 25-700°C, em ambiente inerte (nitrogênio ultra puro e seco), com fluxo de 100 cc/min. A referência foi sempre uma cápsula vazia. A mesma análise foi realizada na gelatina em pó previamente seca em estufa de circulação de ar a 105°C por 24 horas

### **3.15 Calorimetria Diferencial de varredura (DSC)**

A determinação da temperatura de fusão e da entalpia ( $\Delta H$ ) foi realizadas por análise calorimétrica de varredura, utilizando-se um DSC TA 2010, com módulo de resfriamento com nitrogênio líquido. As amostras (10,0 a 15,0 mg) foram acondicionadas em cápsulas herméticas de alumínio, em condições de umidade relativa controlada (52%) e temperatura ambiente (25°C) por um período de sete dias. As cápsulas foram fechadas anteriormente à análise. As análises foram realizadas em duplicada, utilizando taxa de aquecimento de 10°C/min (FAKIROV et al., 1997), entre 0 a 140°C, em ambiente inerte. A referência foi sempre uma cápsula vazia. O equipamento foi calibrado com amostra de indium.

### **3.16 Análise Estatística**

As análises estatísticas da variância (ANOVA) foram realizadas utilizando-se o programa Statistica® 5.5 (Stasoft, USA). As diferenças significativas entre as médias foram identificadas através do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Ensaio preliminares**

A partir dos dados obtidos em literatura sobre o breu branco, diversas formulações foram utilizadas com o objetivo de determinar a melhor composição.

Primeiramente, o breu branco foi adicionado diretamente à solução de gelatina solubilizada com plastificante. Pelo fato de o breu branco ser insolúvel em água, apresentou-se precipitado (insolubilizado) no filme após secagem. Verificada a inviabilidade de incorporar o breu diretamente à solução de gelatina, o breu foi previamente solubilizado em álcool levemente aquecido. Entretanto após a secagem, ainda era possível visualizar a presença de partículas de breu insolúveis sobre o filme. Foi então verificada a possibilidade de incorporar o breu branco adicionado de ácidos graxos (ácido láurico, palmítico, esteárico) à solução de gelatina. Foram utilizados dois procedimentos: (1) o breu foi adicionado à solução de gelatina hidratada e solubilizado juntamente com a mesma e (2) solubilizado separadamente e depois adicionado à solução de gelatina solubilizada. O procedimento 2 mostrou-se mais eficiente na incorporação, apresentando ainda presença reduzida de breu na superfície do filme após a secagem.

Verificada a melhora do aspecto dos filmes com a adição de ácidos graxos passou-se a utilizar esse procedimento com o propósito de promover a incorporação do breu. Foram testadas várias combinações (láurico/palmítico; láurico/esteárico; esteárico/palmítico) em três concentrações (2,5; 5 e 10% de cada ácido em relação à quantidade de gelatina). Das combinações estudadas, a blenda de ácido esteárico/palmítico na concentração de 10% de cada ácido foi a mais eficiente, não apresentando breu precipitado depois do filme seco. Fixada a blenda e a concentração de ácidos a máxima quantidade de breu possível de ser adicionada foi testada. Foram testadas diversas concentrações (1; 2,5; 5; 10; 15; 20%), sendo verificado que a incorporação foi mais eficiente até 10%. Em concentrações maiores houve uma leve precipitação do breu.

Fixando-se a faixa de concentração de breu a ser trabalhada, foi realizado um segundo banho-maria após a incorporação da blenda com o breu na solução de gelatina previamente solubilizada, verificando-se que os filmes apresentavam-se visualmente mais homogêneos. Terminado esse processo foram fixadas as formulações e realizados os testes de caracterização.

## **4.2 Aspecto visual**

Os filmes foram primeiramente caracterizados quanto aos aspectos visuais e táteis, ou seja, foi verificado se os mesmos apresentavam partículas insolúveis, presença de poros, presença de fraturas/rupturas e fragilidade. De um modo geral, os filmes elaborados com gelatina, triacetina, ácidos graxos (separadamente e em conjunto) e breu branco ou ácido láurico (em todas as concentrações) apresentavam-se manuseáveis e visivelmente homogêneos.

## **4.3 Espessura**

Foram utilizadas alíquotas de solução filmogênica diferentes para cada formulação com o objetivo de controlar as espessuras para a repetitividade das medidas e validade das comparações entre as propriedades analisadas. Para a escolha da alíquota utilizada para cada formulação, foram consideradas as características da mesma. Assim, foram utilizadas as seguintes alíquotas: filme de gelatina e triacetina (16 ml); gelatina, triacetina e ácidos graxos (ácido esteárico ou ácido palmítico) (15 ml); gelatina, triacetina e ácidos graxos (blenda de ácido esteárico e palmítico) (14ml), gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos e breu branco (1% e 2,5%) (13 ml) ou ácido láurico (1% e 2,5%) (13,5 ml); gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos e breu branco ou ácido láurico (5%) (12 ml), gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos e ácido láurico (10%) (11 ml) e gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos e breu branco (10ml). As espessuras variaram entre  $0,068 \text{ mm} \pm 0,005$  (gelatina e triacetina) a  $0,072 \text{ mm} \pm 0,005$  (gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos e breu branco 10%). Essa diferença deveu-se ao aumento da quantidade de matéria seca por superfície, depois da adição dos ácidos graxos. Comportamento semelhante foi observado por

FAKHOURI (2002) onde a adição de ácido graxos aos filmes de gelatina e triacetina causou um aumento na espessura (0,019 para 0,068 mm).

Depois de padronizada a alíquota utilizada para cada filme, foram realizados testes de permeabilidade ao vapor de água (PVA), solubilidade em água e resistência mecânica para todos os filmes obtidos. Os testes de permeabilidade ao oxigênio, microscopia eletrônica de varredura, microscopia confocal de varredura a laser (MCLV), isotermas de sorção, análise dinâmica mecânica (DMA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram realizados nos filmes de gelatina/triacetina, gelatina/triacetina/ácidos (separadamente e em conjunto); gelatina/triacetina/ácidos/breu branco ou ácido láurico (1% e 10%). Os testes de opacidade foram realizados para todos esses filmes, incluindo-se também filme de PVC.

#### **4.4 Permeabilidade ao vapor de água**

Os resultados de permeabilidade ao vapor de água dos biofilmes nas diferentes formulações foram apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6. Pode-se observar pela Tabela 4 que os filmes de gelatina e triacetina mostraram-se mais permeáveis ao vapor de água que os filmes compostos de gelatina e ácidos graxos. Isso se deve ao caráter hidrofílico da gelatina, que induz a interação com a água, aumentando desta forma a permeabilidade ao vapor de água. FAKHOURI (2002) encontrou valores menores de permeabilidade ao vapor de água (3,08 e 4,82 gmm/m<sup>2</sup> dKPa) para os filmes de gelatina e triacetina nas mesmas concentrações, possivelmente em decorrência da utilização de filmes menos espessos (0,018 e 0,035 mm). O aumento da permeabilidade ao vapor de água em função do aumento da espessura também foi observado por SOBRAL (1999), onde a PVA dos filmes de gelatina bovina e suína aumentaram linearmente com a espessura dos filmes. Segundo PARK e CHINNAM (1995) a permeabilidade ao vapor de água pode variar com a espessura dos filmes devido a mudanças estruturais causadas pelo inchamento da matriz hidrofílica, o que irá afetar a estrutura do filme e provocar tensões internas que influenciam na permeação.

Os efeitos da adição de ácidos graxos (esteárico, palmítico e blenda de ambos os ácidos) no filme de gelatina podem ser observados na Tabela 4. A adição de ácidos na formulação filmogênica provocou a redução da permeabilidade ao vapor de água, devido ao aumento da hidrofobicidade dos filmes. A adição de ácido esteárico causou maior redução na permeabilidade quando comparado com o filme com ácido palmítico. Resultado semelhante foi observado por AYRANCI e TUNE (2001) em um estudo da adição de diferentes tipos de ácidos graxos (láurico, palmítico e esteárico) a filmes de metilcelulose, sendo que o ácido esteárico apresentou melhores resultados. Esse comportamento foi explicado com base no aumento da hidrofobicidade dos ácidos graxos com o aumento da cadeia (na ordem: ácido láurico ( $C_{12}$ ), ácido palmítico ( $C_{16}$ ) e ácido esteárico ( $C_{18}$ )). Além disso, a mobilidade da cadeia dos ácidos, que colabora na transferência de vapor de água, diminui na mesma ordem. Portanto, pelo fato de o ácido esteárico possuir cadeia de hidrocarboneto mais longa que o ácido palmítico, é mais hidrofóbico que este último e possui menor mobilidade e permeabilidade. KOELSCH e LABUZA (1992) também verificaram melhores propriedades de barreira com a adição de ácido esteárico nos filmes de metilcelulose.

A adição da blenda de ácido esteárico-palmítico diminuiu significativamente a permeabilidade ao vapor de água do filme de gelatina sem lipídios e com ácido palmítico, porém de maneira muito discreta e não significativa quando comparado ao filme com ácido esteárico. KAMPER e FENNEMA (1984a, b) examinaram o efeito da adição de ácidos graxos na permeabilidade ao vapor de água dos filmes de hidroxipropil metilcelulose (HPMC) e indicaram que o ácido esteárico e a blenda esteárico-palmítico foram os mais efetivos na redução da permeabilidade. Os autores observaram que não houve diferença significativa entre os filmes compostos feitos com a blenda de ácido esteárico-palmítico e os filmes emulsionado apenas com ácido esteárico. Foi recomendado pelos autores o uso da blenda nos filmes hidrofílicos por apresentarem melhor manuseabilidade.

YANG e PAULSON (2000b) avaliaram o efeito da 1:1 blenda de ácido esteárico-palmítico, assim como da cera de abelha nas propriedades dos filmes de gelatina. O resultados revelaram que ambos, quando adicionados em concentração apropriada,

foram efetivos na redução da permeabilidade ao vapor de água, sendo a cera mais efetiva.

**Tabela 4.** Permeabilidade ao vapor de água (Pva, 25°C) dos filmes de gelatina e tricetina (gel/tri), gelatina, triacetina e ácido palmítico (Gel/tri/AP); gelatina, triacetina e ácido esteárico (gel/tri/Ae) e gelatina, triacetina, ácido esteárico e palmítico.

| Filmes*               | Espessura<br>(mm) | Permeabilidade ao vapor de água<br>(gmm/m <sup>2</sup> dKPa)** |
|-----------------------|-------------------|--|
| GEL/TRI (15%)         | 0,068 ± 0,005     | 7,05 ± 0,11 <sup>a</sup>                                       |
| GEL/ TRI (15%)/AP 10% | 0,070 ± 0,005     | 6,49 ± 0,28 <sup>b</sup>                                       |
| GEL/TRI (15%)/AE 10%  | 0,068 ± 0,005     | 6,18 ± 0,36 <sup>b c</sup>                                     |
| GEL/AC/TRI (15%)      | 0,069 ± 0,012     | 5,84 ± 0,31 <sup>c</sup>                                       |

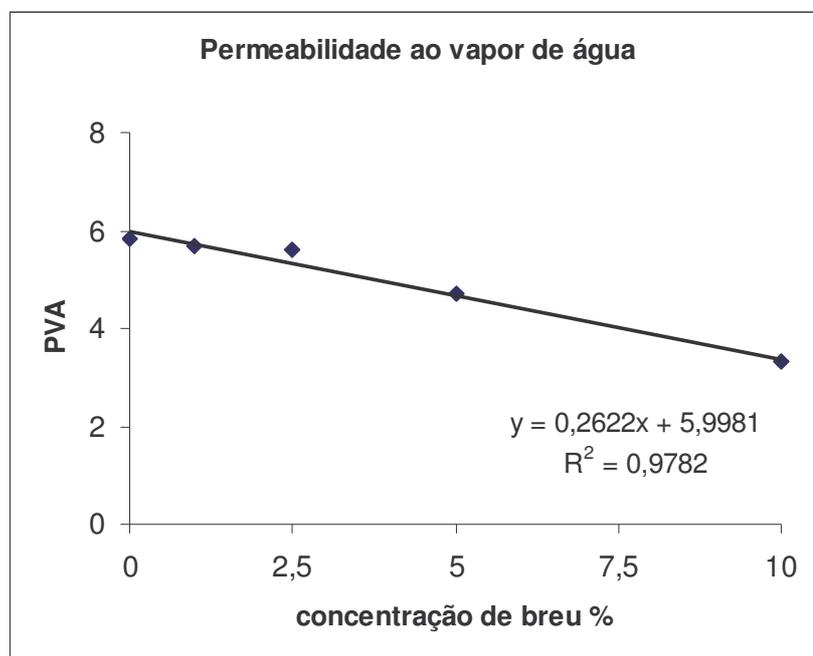
\* Gel: Gelatina, Tri: triacetina, ac: Acidos (1:1 esteárico e palmítico), AE: acido esteárico, AP: ácido palmítico \*\* Média e desvio das replicatas Nota: letras diferentes representam diferença significativa (p< 0,05) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

A adição crescente de ácido láurico à blenda de ácido esteárico e palmítico causou uma diminuição na permeabilidade ao vapor de água (Tabela 5). A adição de 2,5, 5 e 10% de ácido láurico foi suficiente para provocar diferença significativa na permeabilidade ao vapor de água dos filmes compostos de gelatina. Na concentração de 10%, a redução foi mais acentuada, indicando aumento da hidrofobicidade representada pela concentração de ácidos graxos. GONTARD et al. (1994) observaram que o aumento da concentração de ácidos graxos resultou numa diminuição considerável das características de permeabilidade ao vapor de água.

**Tabela 5.** Permeabilidade ao vapor de água (Pva, 25°C) dos filmes de gelatina, triacetina, ácido esteárico e palmítico (gel/ac/tri), gelatina, triacetina, ácido esteárico e palmítico e ácido láurico (gel/ac/tri/al).

| FILMES*                  | Espessura<br>(mm) | Permeabilidade ao vapor de água<br>(gmm/m <sup>2</sup> dKPa)** |
|--------------------------|-------------------|--|
| GEL/AC/TRI (15%)         | 0,069 ± 0,012     | 5,84 ± 0,31 <sup>a</sup>                                       |
| GEL/AC/TRI (15%)/AL 1%   | 0,070 ± 0,004     | 5,80 ± 0,16 <sup>a</sup>                                       |
| GEL/AC/TRI (15%)/AL 2,5% | 0,071 ± 0,004     | 5,70 ± 0,76 <sup>ab</sup>                                      |
| GEL/AC/TRI (15%)/AL 5%   | 0,071 ± 0,007     | 5,38 ± 0,64 <sup>ab</sup>                                      |
| GEL/AC/TRI(15%)/AL10%    | 0,070 ± 0,005     | 4,50 ± 0,55 <sup>b</sup>                                       |

\* Gel: Gelatina, Tri: triacetina, ac: Ácidos (1:1 esteárico e palmítico), AL: Acido láurico. \*\* Média e desvio das replicatas Nota: letras diferentes representam diferença significativa (p< 0,05) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.



**Figura 8.** Relação entre a concentração de ácido láurico (AL) e permeabilidade ao vapor de água.

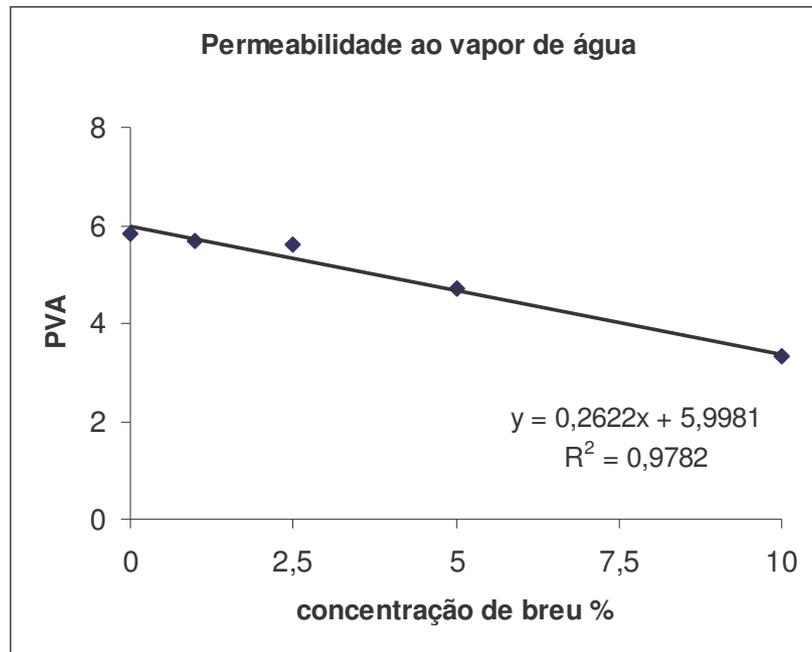
A permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina em função da concentração de breu branco pode ser analisada na Tabela 6. O aumento na concentração de breu diminuiu a permeabilidade ao vapor de água. O menor valor de permeabilidade obtido foi para a formulação com 10% de breu, reduzindo em aproximadamente 56,68% em relação ao filme somente com a blenda.

GONTARD et al. (1994) observaram que as moléculas de substâncias hidrofóbicas que possuem dimensão esférica substancialmente grande, quando utilizadas em formulações de filmes compostos, se esses componentes não forem capazes de se associar com a cadeia de proteína, podem provocar quebra na estrutura da matriz protéica resultando em uma perda global das propriedades de barreira à água. Porém se a substância hidrofóbica for capaz de se ligar de maneira adequada à matriz protéica, o transporte de água é resistente.

**Tabela 6.** Permeabilidade ao vapor de água (Pva, 25°C) dos filmes de gelatina, triacetina, ácido esteárico e palmítico (gel/ac/tri), gelatina, triacetina, ácido esteárico e palmítico e breu branco (gel/ac/tri/breu).

| FILMES *                  | Espessura<br>(mm) | Permeabilidade ao vapor de água<br>(gmm/m <sup>2</sup> dKPa)** |
|---------------------------|-------------------|--|
| GEL/ACI/TRI (15%)         | 0,068 ± 0,012     | 5,84 ± 0,31 <sup>a</sup>                                       |
| GEL/AC/TRI (15%)/BREU 1%  | 0,069 ± 0,012     | 5,69 ± 0,34 <sup>a</sup>                                       |
| GEL/AC/TRI (15%)/BREU2,5% | 0,070 ± 0,011     | 5,60 ± 0,14 <sup>a</sup>                                       |
| GEL/AC/TRI (15%)/BREU 5%  | 0,071 ± 0,005     | 4,70 ± 0,23 <sup>b</sup>                                       |
| GEL/AC/TRI (15%)/BREU 10% | 0,072 ± 0,005     | 3,31 ± 0,44 <sup>c</sup>                                       |

\*Gel: Gelatina, Tri: triacetina, ac: Ácidos (1:1 esteárico e palmítico). \*\* Média e desvio das replicatas  
 Nota: letras diferentes representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.



**Figura 9.** Relação entre concentração de breu branco e permeabilidade ao vapor de água.

Todas as substâncias hidrofóbicas utilizadas para este estudo foram eficientes na redução da permeabilidade ao vapor de água. Na solução filme formadora as proteínas são parcialmente imobilizadas na interface com as partículas de lipídios emulsionadas. Conseqüentemente, as cadeias poliméricas apresentam menor mobilidade, reduzindo desta forma a difusibilidade da água através da proteína interfacial, levando a uma diminuição na permeabilidade ao vapor de água (McHUGHT; KROCHTA, 1994a).

Os resultados obtidos de permeabilidade ao vapor de água nos filmes emulsionados tanto com ácido láurico como com breu branco na máxima concentração, foram menores do que o celofane (6,64-33,2 gmm/m<sup>2</sup> dia, KAMPER; FENNEMA, 1984b) e maiores que poliestireno orientado (2,21gmm/m<sup>2</sup> dia, KAMPER; FENNEMA, 1984b).

## 4.5 Solubilidade

A solubilidade dos filmes em água está diretamente relacionada aos seus componentes, ou seja, com a hidrofiliicidade/hidrofobicidade e estrutura. Observou-se que a adição de cada uma das substâncias hidrofóbicas causou um aumento significativo da solubilidade dos filmes em todas as faixas de concentração estudadas, em relação ao filme de gelatina e triacetina (Tabela 7). Resultados similares foram obtidos por FAKHOURI (2002), com filmes de gelatina e vários tipos de ácidos em várias concentrações e RHIM et. al. (1999), onde a solubilidade dos filmes compostos de isolado protéico de soja e ácido láurico aumentou significativamente conforme a concentração de ácido era aumentada. GONTARD et al. (1994) obtiveram resultados semelhantes com filmes compostos de glúten e lipídios. Os autores observaram que a solubilidade dos filmes em água aumentou bruscamente depois que uma certa quantidade de material lipídico foi adicionada. Provavelmente acima desta quantidade (20g/100g matéria seca), a presença do componente lipídico desestabilizou parcialmente a estrutura da matriz proteica (redução das forças intermoleculares entre as cadeias de proteína).

**Tabela 7.** Solubilidade em água dos filmes de gelatina/triacetina, gelatina/triacetina/ácidos graxos (esteárico, palmítico e blenda de ácido esteárico-palmítico), gelatina/triacetina/blenda de ácido esteárico-palmítico/breu branco ou ácido láurico.

| Filmes*                   | Solubilidade (%) <sup>*</sup> |
|---------------------------|-------------------------------|
| GEL/TRI (15%)             | 30,54 ± 0,79 <sup>e</sup>     |
| GEL/ TRI (15%)/AP 10%     | 33,74 ± 0,10 <sup>d</sup>     |
| GEL/TRI (15%)/AE 10%      | 34,38 ± 0,11 <sup>cd</sup>    |
| GEL/ACI/TRI (15%)         | 34,59 ± 0,77 <sup>cd</sup>    |
| GEL/AC/TRI (15%)/AL 1%    | 34,88 ± 0,11 <sup>bcd</sup>   |
| GEL/AC/TRI (15%)/AL 2,5%  | 34,92 ± 0,73 <sup>bcd</sup>   |
| GEL/AC/TRI (15%)/AL 5%    | 35,48 ± 0,45 <sup>abc</sup>   |
| GEL/AC/TRI(15%)/AL10%     | 36,74 ± 0,19 <sup>a</sup>     |
| GEL/AC/TRI(15%)/BREU 1%   | 34,75 ± 0,20 <sup>bcd</sup>   |
| GEL/AC/TRI(15%)/BREU2,5%  | 34,90 ± 0,25 <sup>bcd</sup>   |
| GEL/AC/TRI (15%)/BREU 5%  | 35,29 ± 0,45 <sup>bc</sup>    |
| GEL/AC/TRI (15%)/BREU 10% | 36,05 ± 0,61 <sup>ab</sup>    |

\* Gel: Gelatina, Tri: triacetina, ac: Ácidos (1:1 esteárico e palmítico), AE: ácido esteárico, AP: ácido palmítico, AL: Acido láurico. \*\* Média e desvio das replicatas Nota: letras diferentes representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

#### 4.6 Propriedades mecânicas

Para manter a integridade e a propriedade de barreira, biofilmes devem ser hábeis em resistir ao estresse normal encontrado durante sua aplicação subsequente. Normalmente, uma alta resistência mecânica é requerida, mas os valores de deformação devem ser ajustados de acordo com a aplicação (CALLEGARIN et al., 1997).

Os valores de resistência à tração e alongação dos filmes de gelatina/triacetina, gelatina/triacetina/ácidos (esteárico, palmítico e blenda de ambos os ácidos) encontram-se na Tabela 8.

A resistência à tração dos filmes de gelatina/triacetina ( $115,08 \pm 1,15\text{MPa}$ ) mostrou-se maior que o valor obtido por FAKHOURI (2002) ( $93,34 \pm 6,39\text{MPa}$ ). Tal variação pode ter ocorrido pela diferença na metodologia utilizada na elaboração dos filmes. FAKHOURI (2002), em seus experimentos, solubilizou a gelatina previamente hidratada em banho-maria. No presente trabalho, após a etapa de solubilização, a solução de gelatina foi mantida em um segundo banho-maria por trinta minutos, o que supostamente provocou evaporação de solvente, ou seja, a solução filmogênica apresentou-se mais concentrada. O aumento da concentração de solvente (água) provoca uma redução das interações moleculares entre as cadeias adjacentes, aumentando as interações entre as macromoléculas e o solvente (VRENTAS; DUDA, 1978 apud SOBRAL, 2000). Dessa forma, a diminuição das interações intermoleculares pelo aumento da concentração de água pode ter reduzido a resistência à tração dos filmes de FAKHOURI (2002). Segundo CALLEGARIN et al. (1997), as propriedades mecânicas dos filmes dependem das interações entre os componentes, ou seja, da formação de ligações moleculares fortes ou numerosas entre as cadeias. A alongação obtida por FAKHOURI (2002) apresentou valor maior ( $8,92 \pm 1,63\%$ ) que aquele obtido neste estudo ( $6,66 \pm 1,46\%$ ). Tal diferença pode estar relacionada às mesmas forças de interação citadas acima.

A adição de ácidos graxos enfraqueceu os filmes de gelatina de maneira significativa (Tabela 8). A adição de ácido esteárico, palmítico e blenda esteárico-palmítico levou a uma diminuição de 10%, 23 e 20% respectivamente, na resistência a tração. Esses resultados confirmaram que a fase protéica apresenta maior resistência à tração que a fase lipídica, e que o aumento da concentração da fase lipídica provocou a redução da resistência à tração da fase protéica. Resultados semelhantes foram obtidos por YANG e PAULSON (2000b), onde os autores observaram que a resistência à tração dos filmes compostos de gelatina e blenda de ácido esteárico-palmitico ou cera

de abelha diminuiu bruscamente quando a concentração de substâncias lipídicas era aumentada. Os autores relataram que filmes compostos com blenda e cera de abelha em concentrações acima de 14,3 e 34% respectivamente, diminuíram a resistência à tração de maneira significativa, quando comparados com os filmes simples. Segundo os autores tal resultado teria ocorrido pela substituição parcial dos polímeros pelos lipídios na matriz filmogênica, onde a interação lipídios-lipídios (moléculas apolares) e lipídios-proteínas apresentam menor energia que a ligação proteína-proteína influenciando, portanto, nas propriedades de barreira.

GONTARD et al. (1994), em um estudo da influência dos lipídios em filmes de glúten, observaram que a influência depende das características do lipídio e da capacidade de interagir com a matriz estrutural de proteína. Observaram também que a resistência à tração diminuiu com o aumento da concentração de lipídios. O declínio da resistência relacionado ao aumento da concentração de ácidos graxos nos filmes foi também observado por FAKHOURI (2002) e GALLO et al. (2000).

A alongação corresponde à máxima variação no comprimento da amostra antes da quebra ou ruptura, ou seja, mede a capacidade de esticar. A porcentagem de alongação aumentou com a adição de substâncias hidrofóbicas. SHELLHAMMER e KROCHTA (1997) observaram um aumento na alongação dos filmes de proteína do soro do leite com o aumento da concentração de lipídios. Segundo os autores esse resultado foi causado pelo efeito plastificante do lipídio. FAKHOURI (2002) também observou aumento na alongação com a adição de ácido graxo. Ao contrário, PÉROVAL et al. (2002) observaram uma diminuição da alongação ao incorporar ácidos graxos aos filmes de arabinoxilana e argumentaram que alguns lipídios são incapazes de formar coesão e matriz contínua, causando desta forma menor alongação.

**Tabela 8.** Propriedades mecânicas dos filmes de gelatina e tricetina; gelatina, triacetina e ácidos graxos (palmítico, esteárico e blenda de ambos os ácidos) (25°C).

| FILMES *              | Resistência à tração<br>(MPa) | Elongação (%)              |
|-----------------------|-------------------------------|----------------------------|
| GEL/TRI (15%)         | 115,08 ± 1,15 <sup>a</sup>    | 6,66 ± 1,46 <sup>c</sup>   |
| GEL/ TRI (15%)/AE 10% | 104,07 ± 1,91 <sup>b</sup>    | 9,97 ± 0,83 <sup>a</sup>   |
| GEL/TRI (15%)/AP 10%  | 88,38 ± 2,04 <sup>c</sup>     | 7,83 ± 0,27 <sup>b,c</sup> |
| GEL/AC/TRI (15%)      | 91,41 ± 2,02 <sup>c</sup>     | 8,92 ± 0,66 <sup>a,b</sup> |

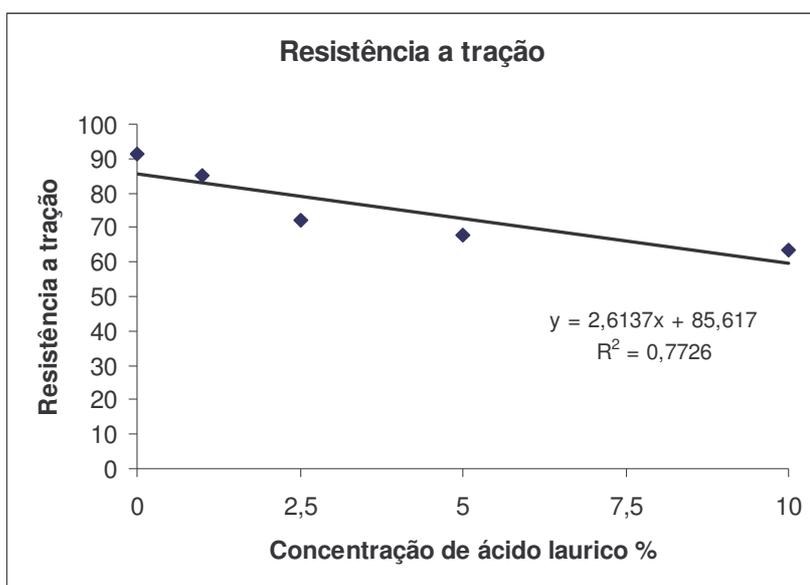
\* Gel: Gelatina, Tri: triacetina, ac: Ácidos (1:1 esteárico e palmítico), AE: ácido esteárico, AP: ácido palmítico. \*\* Média e desvio das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

A adição crescente de ácido láurico diminuiu de maneira significativa a resistência à tração e aumentou a elongação dos filmes compostos de gelatina e blenda de esteárico-palmítico, em todas as concentrações estudadas (Tabela 9). Alguns lipídios (acetoglicerídeos, ácidos graxos, monoglicerídeos, fosfolipídios) são usados para aumentar a flexibilidade dos filmes poliméricos. Eles são considerados plastificantes, por enfraquecerem as forças intermoleculares entre as cadeias poliméricas adjacentes, desta forma influenciando as propriedades mecânicas dos filmes (CALLEGARIN et al., 1997).

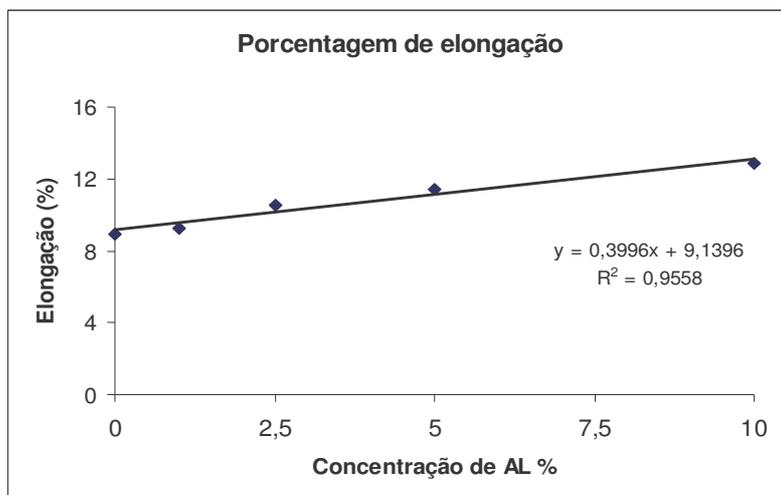
**Tabela 9.** Propriedades mecânicas dos filmes de gelatina, triacetina, blenda ácido esteárico-palmítico e ácido láurico (25°C).

| FILMES                   | Resistência à tração (MPa) | Elongação (%)              |
|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| GEL/AC/TRI (15%)         | 91,41 ± 2,02 <sup>a</sup>  | 8,92 ± 0,66 <sup>b</sup>   |
| GEL/AC/TRI (15%)/AL 1%   | 85,17 ± 1,47 <sup>b</sup>  | 9,25 ± 1,36 <sup>b</sup>   |
| GEL/AC/TRI (15%)/AL 2,5% | 72,07 ± 1,57 <sup>c</sup>  | 10,57 ± 0,71 <sup>ab</sup> |
| GEL/AC/TRI (15%)/AL 5%   | 67,58 ± 1,23 <sup>d</sup>  | 11,45 ± 0,81 <sup>ab</sup> |
| GEL/AC/TRI (15%)/AL10%   | 63,50 ± 1,56 <sup>d</sup>  | 12,90 ± 0,57 <sup>a</sup>  |

\*Gel: Gelatina, Tri: triacetina, ac: Ácidos (1:1 esteárico e palmítico), AL: Acido láurico. \*\* Média e desvio das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas através do teste TUKEY



**Figura 10.** Relação entre concentração de ácido láurico e resistência a tração



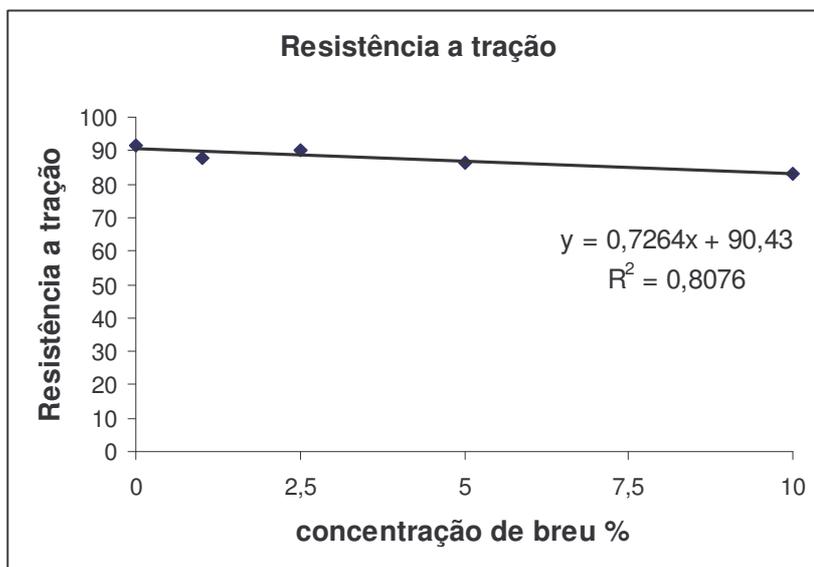
**Figura 11.** Relação entre concentração de ácido láurico e alongação(%).

A adição crescente de breu branco (Tabela 10) causou diminuição da resistência à tração e aumento da porcentagem de alongação, sendo mais evidenciado na máxima concentração utilizada. A diferença na propriedade de barreira entre os filmes com ácido láurico e breu branco pode ter ocorrido pela diferença de polaridade. YANG e PAULSON (2000b) relacionaram a diferença nas propriedades de barreira dos filmes emulsionados de gelatina e blenda ácido esteárico-palmítico e cera de abelha pela diferença na polaridade dos compostos hidrofóbicos utilizados. Os autores argumentaram que a cera de abelha é constituída por substâncias altamente hidrofóbicas: 71% de ésteres, 1-1,25% de álcool graxo livre, 13,5-14,5% de ácidos graxos livres, 10,4-13,6% de hidrocarbonetos e 1-2% de outros materiais. A polaridade dos ácidos graxos (blenda) é menor que a da cera de abelha. Os mesmos autores também associaram a diminuição da resistência à presença de grupo carboxil nas moléculas de ácido esteárico e palmítico, que competem com as moléculas de proteína, reduzindo as interações entre os polímeros, conseqüentemente, enfraquecendo a resistência do filme à tração. A característica hidrofóbica da cera pode ter resultado numa relativa diminuição do conteúdo de água nos filmes compostos, particularmente pela alta concentração de lipídio. A baixa concentração de água nos filmes compostos de cera de abelha pode ter sido responsável pela baixa permeabilidade ao vapor de água e altas propriedades mecânicas (25°C).

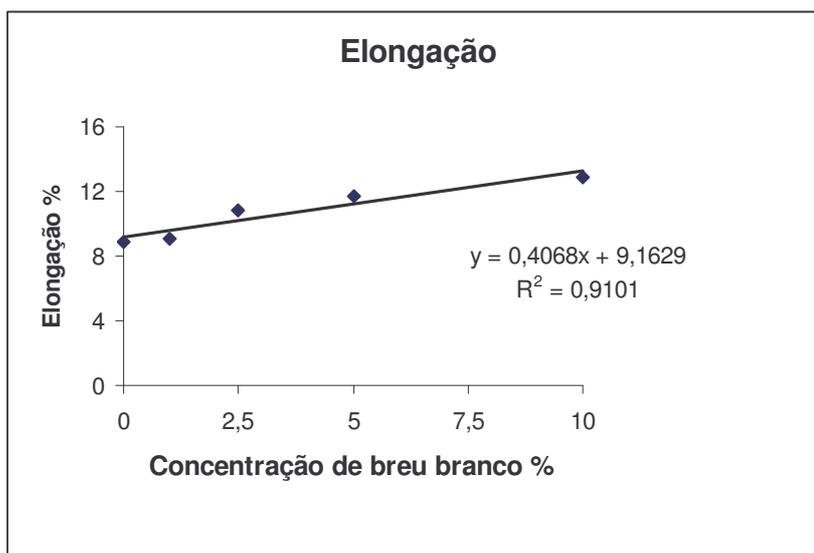
**Tabela 10.** Propriedade mecânica dos filmes de gelatina, triacetina, blenda esteárico-palmítico e breu branco (25°C).

| FILMES*                   | Resistência à tração (MPa) | Elongação (%)              |
|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| GEL/AC/TRI (15%)          | 91,42 ± 2,02 <sup>a</sup>  | 8,92 ± 1,16 <sup>c</sup>   |
| GEL/AC/TRI (15%)/BREU 1%  | 87,58 ± 1,39 <sup>ab</sup> | 9,06 ± 0,26 <sup>c</sup>   |
| GEL/AC/TRI(15%)/BREU 2,5% | 90,14 ± 1,65 <sup>bc</sup> | 10,80 ± 1,03 <sup>b</sup>  |
| GEL/AC/TRI(15%)/BREU 5%   | 86,35 ± 2,07 <sup>cd</sup> | 11,67 ± 0,62 <sup>ab</sup> |
| GEL/AC/TRI (15%)/BREU 10% | 83,22 ± 1,41 <sup>d</sup>  | 12,89 ± 0,61 <sup>a</sup>  |

Gel: Gelatina, Tri: triacetina, ac: Ácidos (1:1 esteárico e palmítico). \*\* Média e desvio das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.



**Figura 12.** Relação entre concentração de breu branco (%) e resistência a tração.



**Figura 13.** Relação entre concentração de breu branco e alongação (%).

#### 4.7 Permeabilidade a gases

Em geral, filmes a base de proteínas devido à sua natureza hidrofílica, apresentam baixa permeabilidade a substâncias apolares como os gases ( $O_2$  e  $CO_2$ ) (GENNADIOS; WELLER; TESTIN, 1993). Os valores determinados de permeabilidade

ao oxigênio dos filmes de gelatina com e sem substâncias hidrofóbicas encontram-se na Tabela 11.

Os resultados indicaram que a adição de substâncias hidrofóbicas aos filmes de gelatina e triacetina ( $15,26 \pm 0,28 \text{ cm}^3\mu\text{m}/\text{m}^2\text{dkPa}$ ) favoreceu o aumento da permeabilidade ao oxigênio, sendo maior no filme de GEL/AC/TRI/AL 10% ( $24,48 \pm 0,07$ ). O mesmo resultado foi obtido por FAKHOURI (2002) em filmes de gelatina. GENNADIOS; WELLER; TESTIN (1993a) compararam a permeabilidade ao oxigênio de filmes de proteínas (glúten, glúten/isolado proteico de soja e zeína) com filmes compostos de polissacarídeos e lipídios, observando que os filmes sem a adição de lipídios mostraram-se menos permeáveis ao oxigênio.

AYRANCI e TUNE (2003) estudaram a permeabilidade ao oxigênio de filmes de metilcelulose (MC) com ácidos graxos (láurico, esteárico e palmítico). Os autores observaram que apesar de os filmes compostos com ácido esteárico (AE) terem se mostrado melhores quanto à propriedade de barreira ao vapor de água, houve um aumento na permeabilidade ao oxigênio conforme aumentava-se à concentração de ácido esteárico. Esse comportamento foi atribuído à formação de pequenos buracos na estrutura dos filmes, os quais eram mais evidentes em concentrações acima de 15g AE/100g MC. Visando a vantagem na permeabilidade ao vapor de água com a adição de ácido esteárico nos filmes de metilcelulose, porém prejudiciais quanto à permeabilidade ao oxigênio, os autores adicionaram alguns antioxidantes (ácido ascórbico e ácido cítrico), para promover as duas propriedades ( $P_{\text{v}}$  e  $PO_2$ ). Os autores chegaram à conclusão de que a adição dos antioxidantes melhorou a  $PO_2$  do filme composto de metilcelulose e ácido esteárico.

**Tabela 11.** Permeabilidade ao oxigênio dos filmes de gelatina e triacetina; gelatina, triacetina e ácidos (esteárico, palmítico e blenda de esteárico-palmítico) e gelatina, triacetina, blenda esteárico-palmítico e breu ou ácido láurico (1 e 10%).

| FILMES *                  | Permeabilidade ao Oxigênio (cm <sup>3</sup> μm/m <sup>2</sup> dkPa) |
|---------------------------|---|
| Gel/tri (15%)             | 15,26 ± 0,28 <sup>d</sup>   |
| Gel/ tri (15%)/AE 10%     | 20,49 ± 0,02 <sup>c</sup>   |
| Gel/tri (15%)/AP 10%      | 21,67 ± 0,60 <sup>bc</sup>  |
| Gel/ac/tri (15%)          | 21,92 ± 0,87 <sup>bc</sup>  |
| Gel/ac/tri (15%)/AL1%     | 23,13 ± 0,63 <sup>ab</sup>  |
| Gel/ac/tri (15%)/AL10%    | 24,48 ± 0,07 <sup>a</sup>   |
| Gel/ac/tri (15%)/Breu 1%  | 22,33 ± 0,38 <sup>bc</sup>  |
| Gel/ac/tri (15%)/Breu 10% | 23,70 ± 0,74 <sup>ab</sup>  |

\* Gel: Gelatina, Tri: triacetina, ác: Ácidos (1:1 esteárico e palmítico), AE: ácido esteárico, AP: ácido palmítico, AL: ácido láurico. \*\* Média e desvio das replicatas Nota: letras diferentes representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas através do teste TUKEY

ARYANCI e TUNE (2001) estudaram o comportamento de filmes compostos de metilcelulose (MC) e ácidos graxos (esteárico, palmítico e láurico) em diversas concentrações (15, 25 e 40g de ácidos/100g MC) quanto à permeabilidade ao CO<sub>2</sub> (PCO<sub>2</sub>). Os autores observaram um aumento na PCO<sub>2</sub> conforme se variou o tipo e concentração de ácido graxo, sendo que o filme com ácido láurico mostrou-se mais permeável. Os autores atribuíram esse comportamento ao pequeno tamanho da cadeia de hidrocarboneto do ácido láurico em relação aos demais ácidos. Assim, o CO<sub>2</sub> pode permear mais facilmente através do filme contendo ácido láurico, pois a maior mobilidade das cadeias do ácido facilita o processo de transferência de gases.

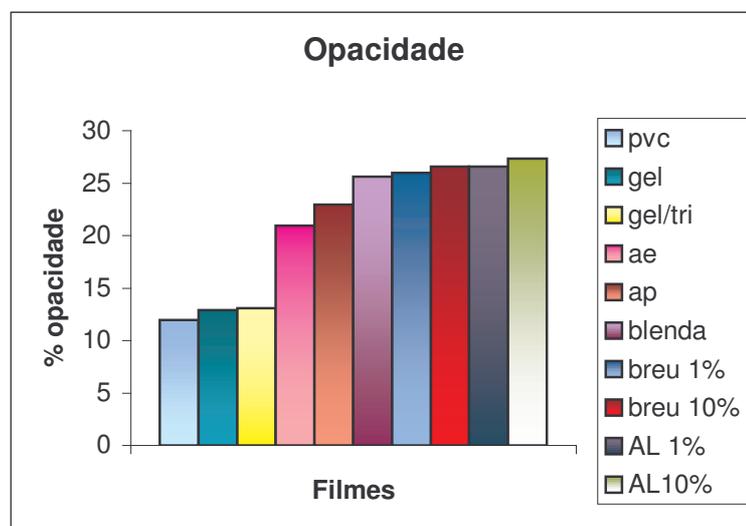
O resultado obtido para o filme composto mais permeável é superior ao cloreto de polivinilideno (PVDC) (5,1 cm<sup>3</sup>μm/m<sup>2</sup>dkPa, McHUGH; KROCHTA, 1994c) e ao Poliéster (15,6 cm<sup>3</sup>μm/m<sup>2</sup>dkPa, McHUGH; KROCHTA, 1994c) e inferior ao polietileno

de baixa densidade (PEBD) ( $1870 \text{ cm}^3\mu\text{m}/\text{m}^2\text{dkPa}$ , McHUGH; KROCHTA, 1994c) na mesma umidade relativa e temperatura.

#### **4.8 Opacidade**

O aspecto visual está diretamente relacionado à aparência e cor final dos filmes de gelatina. Esses fatores foram avaliados através da opacidade, tendo como padrão um filme de cloreto de polivinilideno (PVC). O filme de gelatina apresenta-se mais opaco que o de PVC. A adição de triacetina e substâncias hidrofóbicas resultou num aumento da opacidade do filme de gelatina pura, conforme pode ser observado na Figura 8. O mesmo resultado foi observado por FAKHOURI (2002), quando a adição de triacetina e ácidos graxos causou aumento da opacidade do filme de gelatina pura. Fazendo uma comparação visual, os filmes emulsionados apresentam-se mais opacos o que confirma os resultados obtidos. O aumento da concentração de substâncias hidrofóbicas adicionadas à formulação filmogênica causou aumento da opacidade, sendo maior com a adição dos três ácidos graxos (palmítico, esteárico e láurico). Comportamento semelhante foi observado por YANG e PAULSON (2000b), quando o aumento na opacidade de filmes de gelatina foi proporcional à concentração de ácido esteárico-palmítico adicionada, e por GONTARD et al. (1994), quando aumentando-se a concentração de substâncias hidrofóbicas adicionadas aos filmes de glúten intensificou a opacidade, sendo mais aparente quando o aumento foi de 20-100g de substância hidrofóbica/g matéria seca.

RHIM et al. (1999) também obtiveram filmes de isolado proteico de soja com maior opacidade ao incorporar ácidos graxos (láurico, palmítico e esteárico) na formulação, obtendo maior opacidade com a adição de ácido palmítico. E finalmente, GALLO et al. (2000), concluíram que filmes emulsionados de metilcelulose eram de duas a cinco vezes menos transparentes que os filmes sem lipídios.

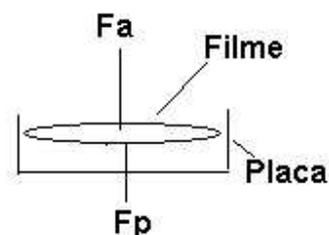


**Figura 14.** Opacidade dos filmes

#### 4.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Vários estudos envolvendo a avaliação de biofilmes têm utilizado a microscopia eletrônica de varredura como ferramenta, buscando correlacionar as propriedades dos mesmos com a estrutura morfológica (SOUZA, 2001). Em função da grande profundidade de foco e da alta resolução, tais análises podem permitir a visualização da estrutura de filmes e dos efeitos dos constituintes adicionados (CARVALHO, 2002).

A morfologia foi avaliada em relação à superfície. Foram avaliados os filmes: gelatina e triacetina (Figura 9a), gelatina, triacetina e ácidos (esteárico, palmítico e blenda de ambos os ácidos) (Figura 9b, c, d), gelatina, triacetina, blenda dos ácidos esteárico-palmitico e ácido láurico e breu branco (1 e 10%) (Figura 10 e 11). A superfície desses últimos foi avaliada em relação à parte superior (filmes secos em contato com o ambiente - Fa) e parte inferior (secagem em contato com a placa plaxiglass - Fp).



**Figura 15.** Representação esquemática da visualização da superfície dos filmes por MEV.

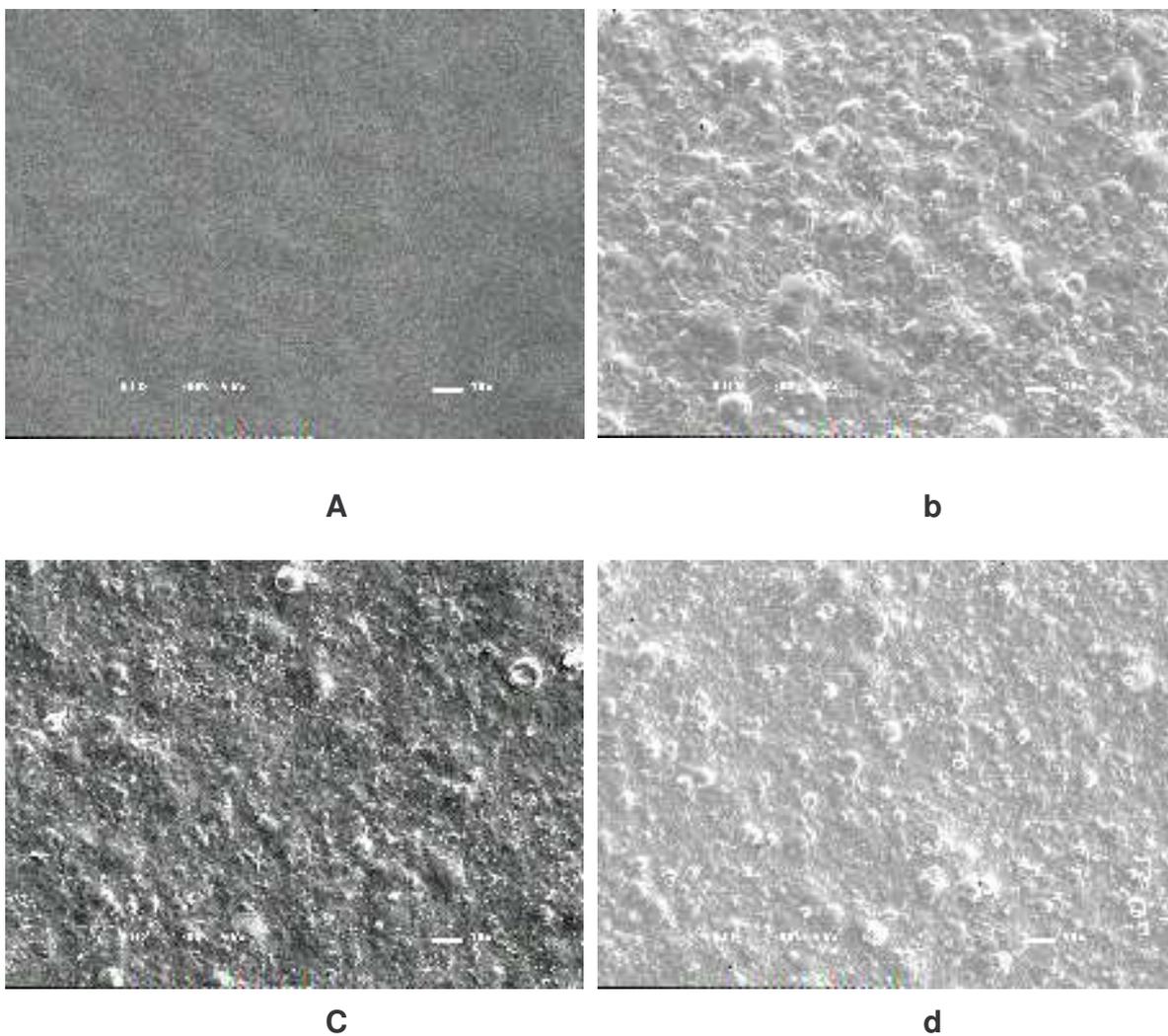
A superfície do filme de gelatina e triacetina (Figura 9a) apresenta-se mais regular, diferentemente dos filmes compostos com lipídios (Figura 9b, 9c e 9d), os quais apresentam-se irregulares. WONG et al. (1992), trabalhando com a adição de ácidos graxos em soluções de quitosana, concluíram que adição de lipídios provocou uma variação na microestrutura dos filmes, que pode estar relacionada à permeabilidade ao vapor de água. MARTIN-PÓLO; MAUGIN e VOILLEY (1992) observaram que a superfície dos filmes emulsionados era claramente irregular. KAMPER e FENNEMA (1984a) concluíram que os filmes emulsionados são mais eficientes quanto as propriedades de barreira e mecânica que os bicamadas usando a blenda esteárico-palmítico como substância hidrofóbica, pois os filmes emulsionados apresentaram-se mais homogêneos, com as gotículas de lipídios mais distribuídas que os bicamadas, quando observados microscopicamente.

Tanto os filmes compostos com ácido palmítico como com esteárico e a com blenda de ambos apresentaram a presença de partículas de lipídios, sendo mais evidenciada nos filmes com ácido esteárico. YANG e PAULSON (2000b) observaram que filmes compostos de goma gelana e blenda de esteárico e palmítico mostraram

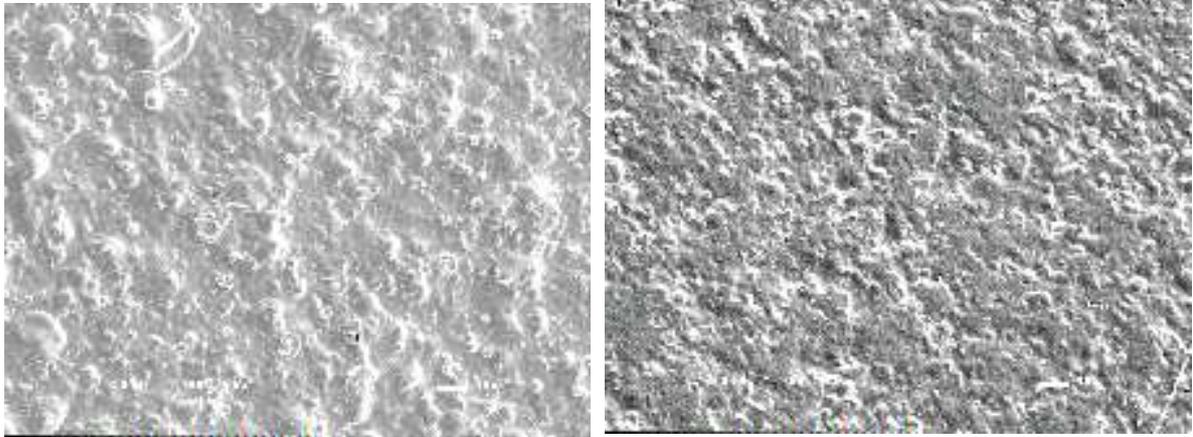
uma alta irregularidade na superfície, resultado da grande fragmentação dos ácidos na homogeneização da solução filme formadora anterior à colocação no suporte.

Os filmes obtidos com a adição tanto de ácido láurico como de breu nas duas concentrações utilizadas mantiveram a aparência irregular da superfície. A visualização dos filmes através da porção em contato com a placa (Fp) (Figura 10b; 10c; 11b e 11c) mostrou maior uniformidade.

McHUGH e KROCHTA (1994a) avaliaram a superfície dos filmes emulsionados de proteína do soro do leite e observaram que a superfície daqueles que estavam em contato com a placa apresentavam maior uniformidade e brilho. Tal comportamento foi justificado pelos autores como decorrência da maior presença de proteínas no fundo da placa. O lado do filme exposto ao ambiente apresentou-se mais opaco e irregular pela presença de lipídios, menos densos e que tendem a migrar para a superfície. Embora os autores tenham hipotetizado tal comportamento, o mesmo ocorre para maioria dos filmes, independentes de conterem proteína ou não. A diferença observada na superfície dos filmes em contato com a placa e em contato com o ambiente, provavelmente, possa ter ocorrido pelo contato mais direto da superfície superior com o ar causando a irregularidade observada.

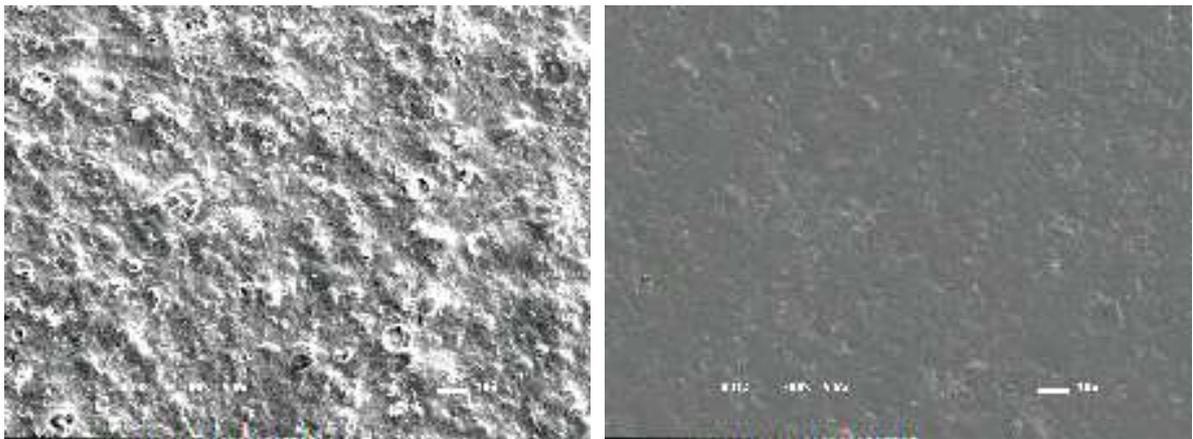


**Figura 16.** Imagens fotográficas obtidas através de microscopia de varredura do (a) filme de gelatina e triacetina (Fa) (700X); (b) gelatina, triacetina e ácido esteárico (Fa) (700X); (c) gelatina, triacetina e ácido palmítico (Fa) (700X) e (d) gelatina, triacetina e blenda ácido esteárico-palmítico (Fa) (700X).



**A**

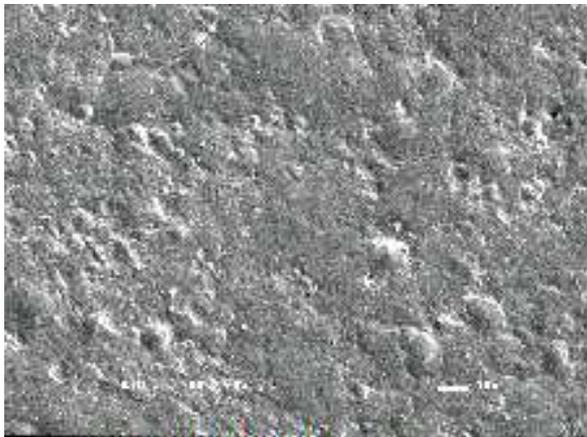
**b**



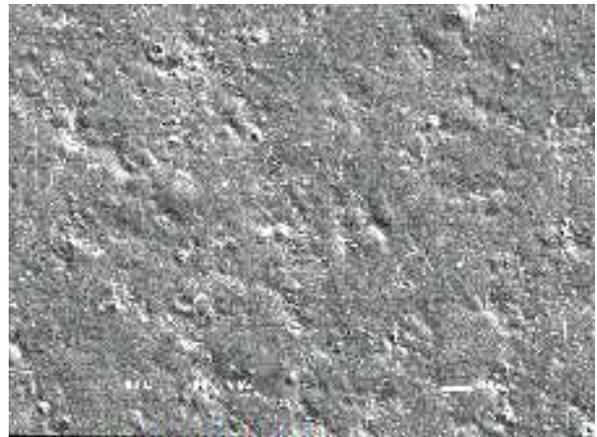
**C**

**d**

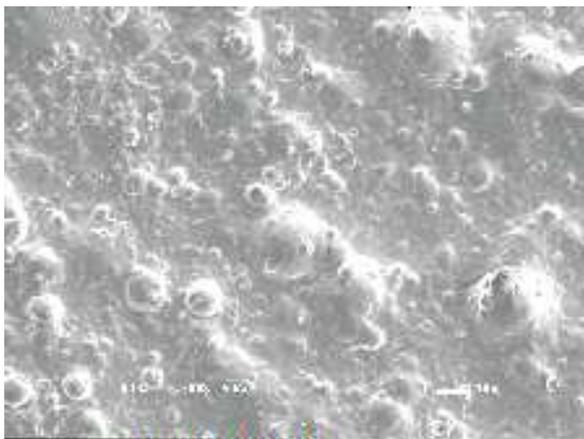
**Figura 17.** Imagens fotográficas obtidas através de microscopia de varredura do filme de (a) gelatina, triacetina e blenda de ácido esteárico-palmítico e ácido láurico 1% (Fa) (700X); (b) gelatina, triacetina e blenda de ácido esteárico-palmítico e ácido láurico 1% (Fp) (700X); (c) gelatina, triacetina e blenda de ácido esteárico-palmítico e ácido láurico 10% (Fa) (700X) e (d) gelatina, triacetina e blenda de ácido esteárico-palmítico e ácido láurico 10% (Fp) (700X)



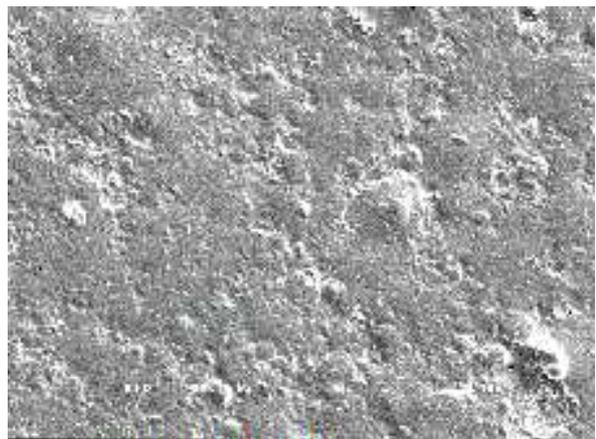
**A**



**b**



**C**



**d**

**Figura 18.** Imagens fotográficas obtidas através de microscopia de varredura do filme de (a) gelatina, triacetina e blenda de ácido esteárico-palmítico e breu 1% (Fa) (700X); (b) gelatina, triacetina e blenda de ácido esteárico-palmítico e breu 1% (Fp) (700X); (c) gelatina, triacetina e blenda de ácido esteárico-palmítico e breu 10% (Fa) (700X) e (d) gelatina, triacetina e blenda de ácido esteárico-palmítico e breu 10% (Fp) (700X).

#### **4.10 Microscopia confocal de varredura a laser (MCLV)**

Atualmente, a microscopia confocal de varredura a laser (MCLV) tem sido uma ferramenta valiosa na obtenção de imagens de alta resolução. Com a combinação dos princípios de fluorescência e da microscopia, a microscopia confocal pode ser utilizada como ferramenta, para visualização da estrutura morfológica dos filmes, inclusive da distribuição de seus constituintes na matriz. Pela microscopia confocal a laser pode ser possível investigar o arranjo estrutural tanto por superfície como por profundidade (interior da matriz do filme), viabilizando com isso a obtenção de maiores informações sobre a estrutura dos biofilmes. No presente trabalho essa técnica foi utilizada para complementar os estudo de microscopia eletrônica de varredura, permitindo a visualização da superfície interna dos filmes. Foram apresentados quatro tipos de fotos, entre elas: DIC (Contraste Interferencial Diferencial de Fase), confocal com proteína corada (FITC - Isotiocianato de fluoresceína), confocal com substâncias hidrofóbicas coradas (Nile Red) e confocal sobreposta (Merge - imagens obtidas pelos corantes FITC e Nile Red).

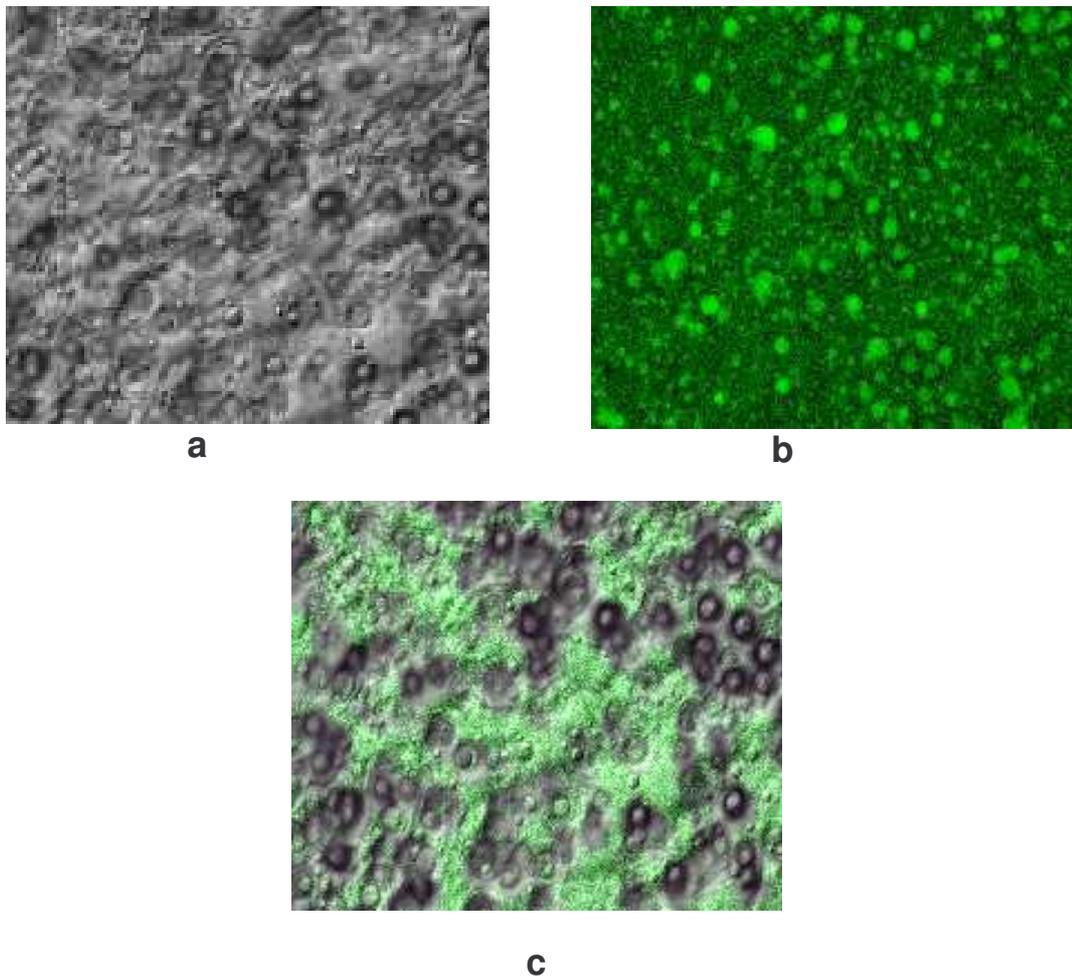
Os filmes de gelatina e triacetina apresentam-se corados pelo corante FITC e Nile Red nas Figuras 12 e 13, respectivamente. Na Figura 12 a superfície apresenta-se homogênea com pequenas partículas que correspondem às moléculas de triacetina distribuídas por toda a superfície. A distribuição da triacetina pode ser melhor evidenciada na Figura 13, possível indicativo de uma ligeira migração de triacetina para a superfície do filme (Figura 13b), provocada pelo excesso da mesma.

As imagens dos filmes compostos de gelatina, triacetina e ácidos graxos (esteárico, palmítico e blenda de ambos) podem ser visualizadas nas Figuras 14, 15 e 16. Em todas as fotos os ácidos graxos são claramente identificados, sugerindo ser um material heterogêneo, contendo a matriz polimérica e a fase de ácidos graxos. A heterogeneidade foi confirmada pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) (figura 10 a 12). Os ácidos graxos (esteárico e palmítico), corados em vermelho pelo corante Nile Red, apresentam-se bem distribuídos. Como na microscopia eletrônica de varredura foi possível visualizar a presença de glóbulos de ácidos graxos em tamanhos

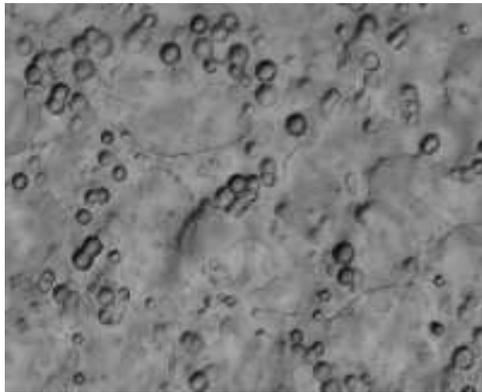
maiores nos filmes de ácido esteárico (figura 10b), possivelmente em consequência de o mesmo apresentar cadeia carbônica maior. Em todas as figuras sobrepostas (Merge) (figura 14c, 15d e 16d), foi possível visualizar além das cores verde (referente ao FITC) e vermelha (referente ao Nile Red) outras cores, como alaranjado e amarelo, sendo consequência da mistura em diversas proporções dos corantes utilizados, ou seja, FITC e Nile Red. O amarelo é constituído por uma blenda de cores, sendo criado pela mistura do vermelho e verde (OTTERSTATTER, 1999).

Nas figuras 17 e 18 é possível visualizar os biofilmes de gelatina, triacetina, blenda de ácido esteárico-palmítico e breu branco 10% (Figura 17) e ácido láurico 10% (Figura 18). Nos filmes de breu branco, as partículas hidrofóbicas apresentam-se maiores, o que possivelmente resultou nos baixos valores de permeabilidade ao vapor de água, pois, devido ao tamanho, a molécula de água teve maior dificuldade de atravessar o filme. Apesar de os filmes contendo ácido láurico apresentarem maior distribuição das substâncias hidrofóbicas, é possível verificar a presença de lacunas, as quais podem ter contribuído para facilitar o trânsito das moléculas de água.

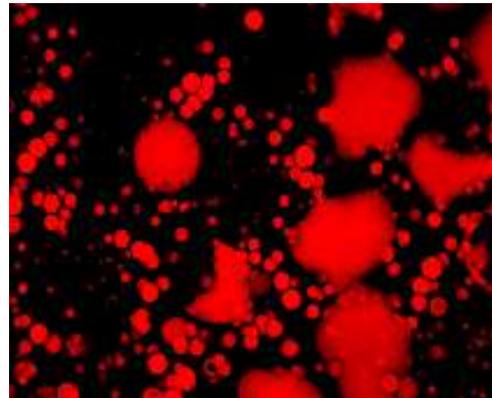
A microscopia confocal a laser para avaliação da estrutura dos biofilmes pode ser bastante explorada, pois é uma ferramenta que possibilita evidenciar a distribuição de cada constituinte do filme, sejam eles proteínas ou substâncias hidrofóbicas. Além disso, proporciona a visualização do interior da matriz filmogênica.



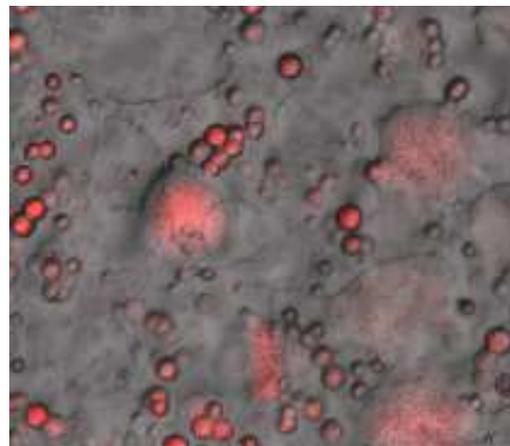
**Figura 19.** Imagens de microscopia confocal a laser do filme de gelatina (corada) e triacetina. (a) DIC (Contraste Interferencial Diferencial de Fase) (20X); (b) FITC (Isotiocianato de fluoresceína- gelatina corada) (20X) e (c) Merge (sobreposição gelatina-FITC e DIC) (20X).



a

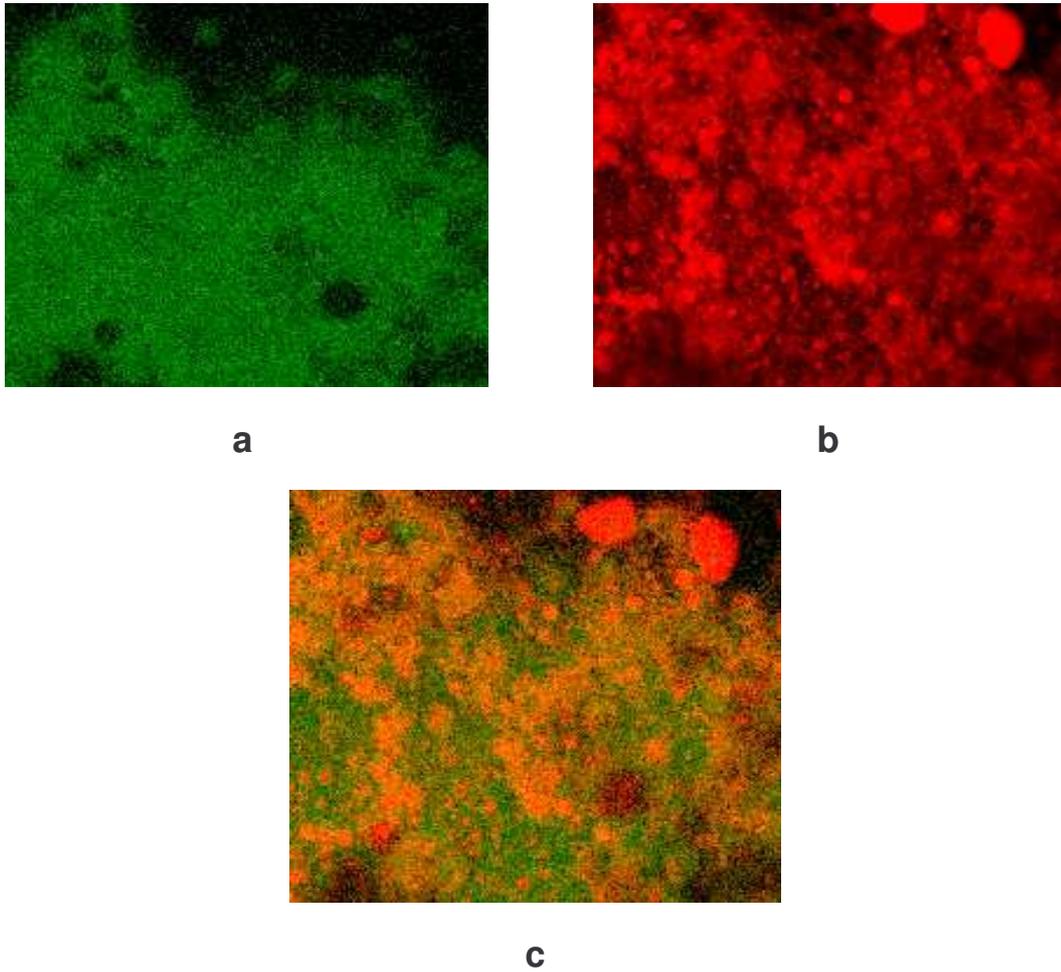


b

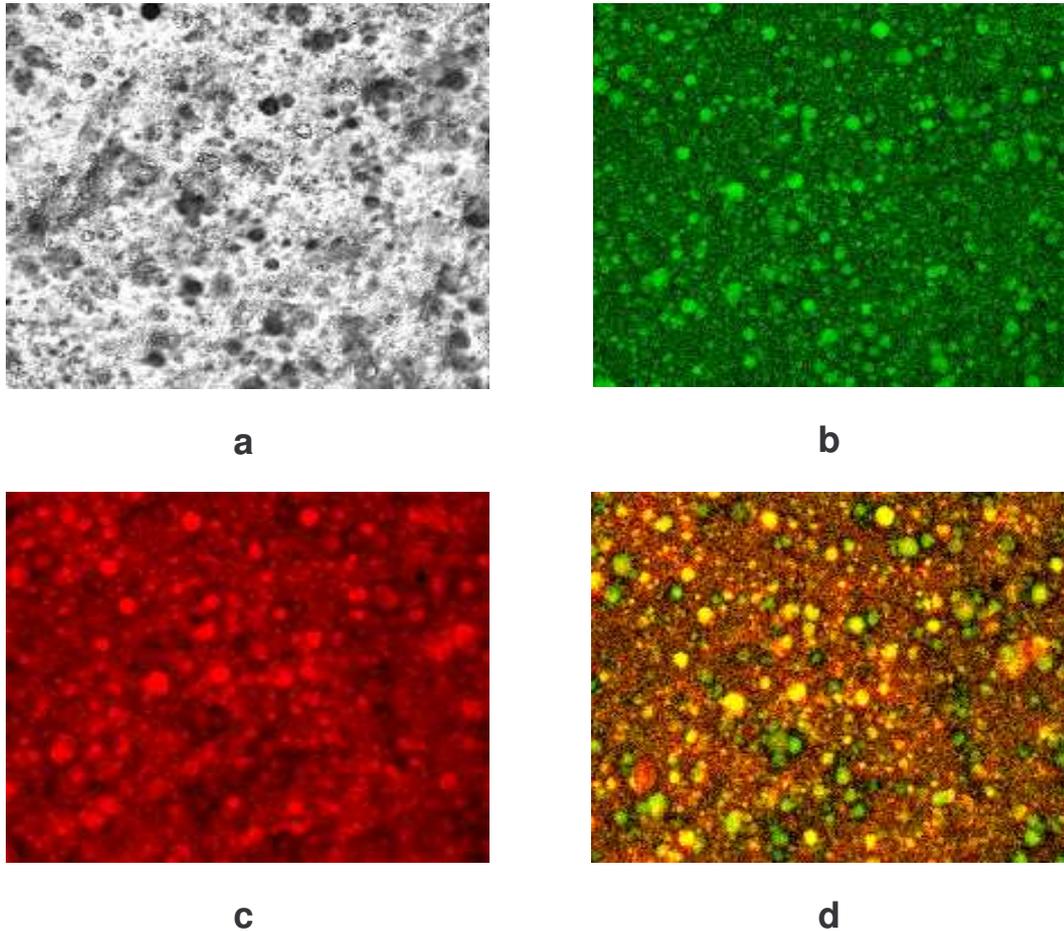


c

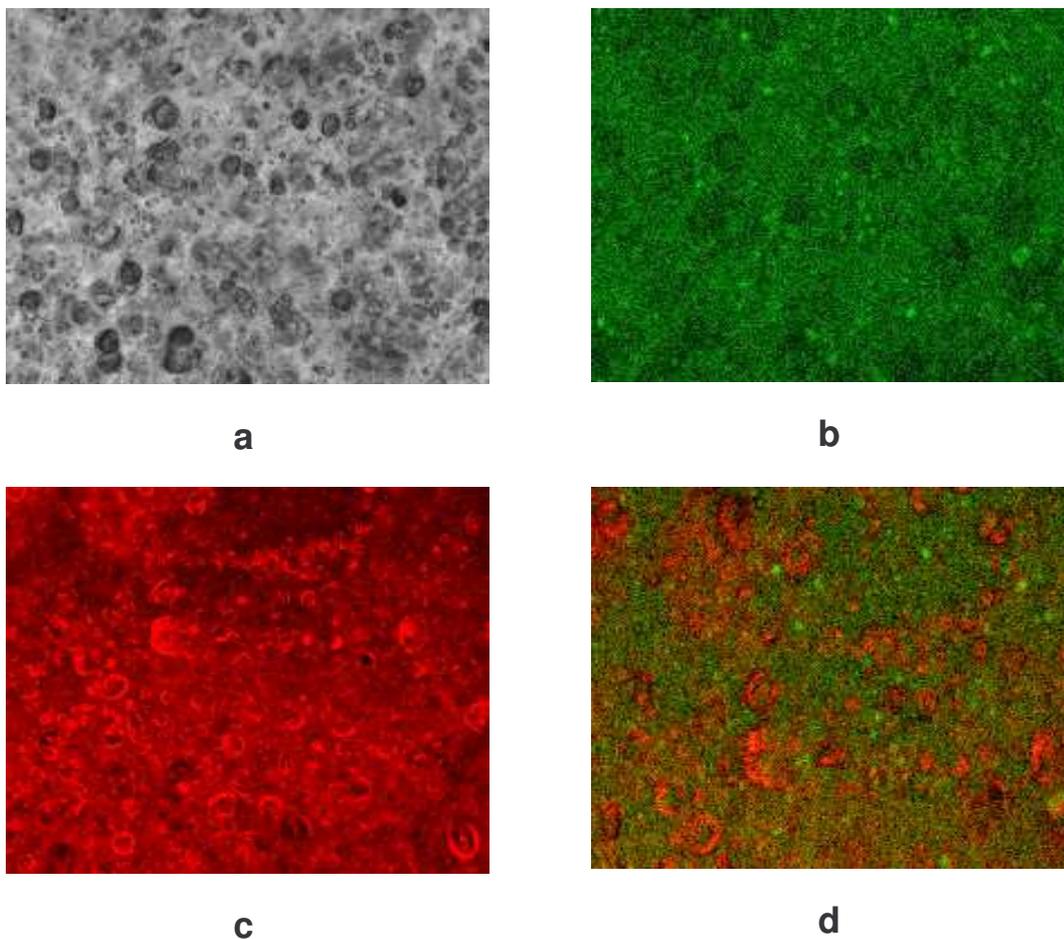
**Figura 20.** Imagens de microscopia confocal a laser do filme de gelatina e triacetina (corada). (a) DIC (Contraste Interferencial Diferencial de Fase) (20X); (b) Nile Red (triacetina corada) (20X) e (c) Merge (sobreposição triacetina-Nile Red e DIC) (20X).



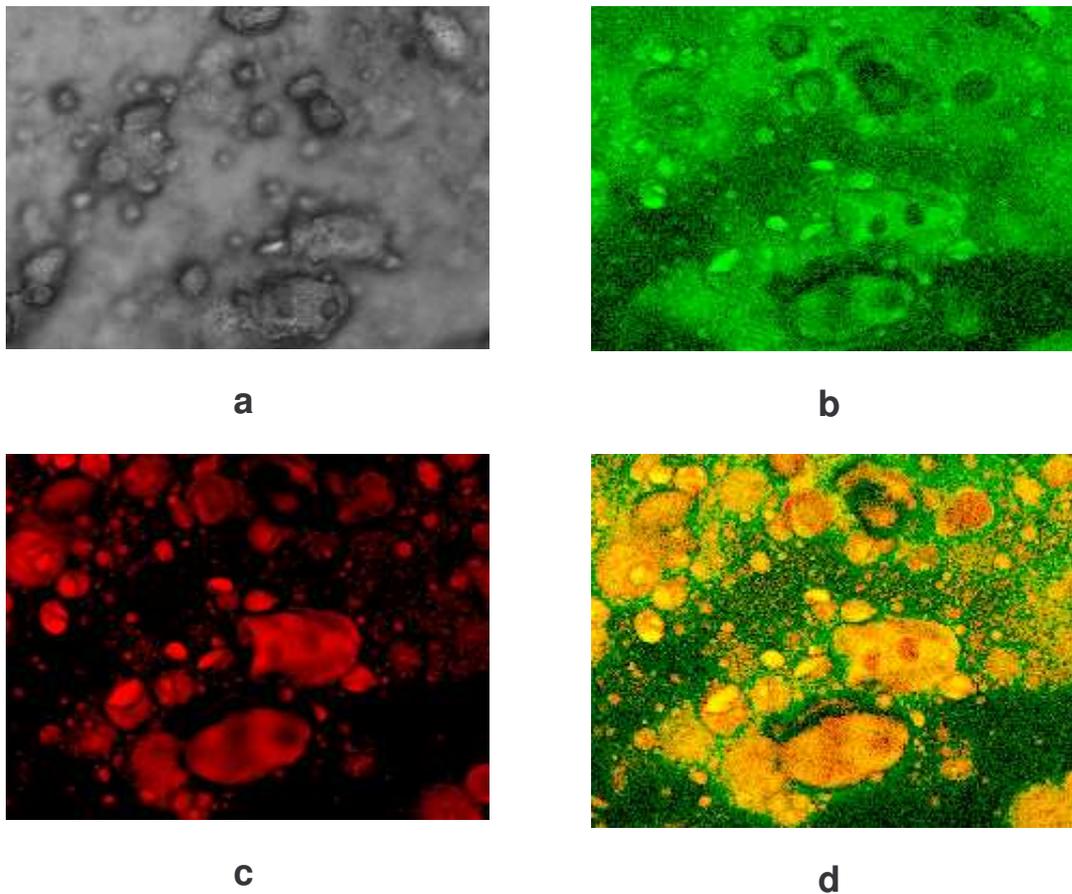
**Figura 21.** Imagens de microscopia confocal do filmes de gelatina, triacetina e ácido esteárico. (a) FITC (Isotiocianato de fluoresceína - gelatina corada) (20X); (b) Nile Red (triacetina+ácido esteárico - Nile Red) (20X) e (c) Merge (sobreposição gelatina-FITC e triacetina+ácido esteárico - Nile Red) (20X).



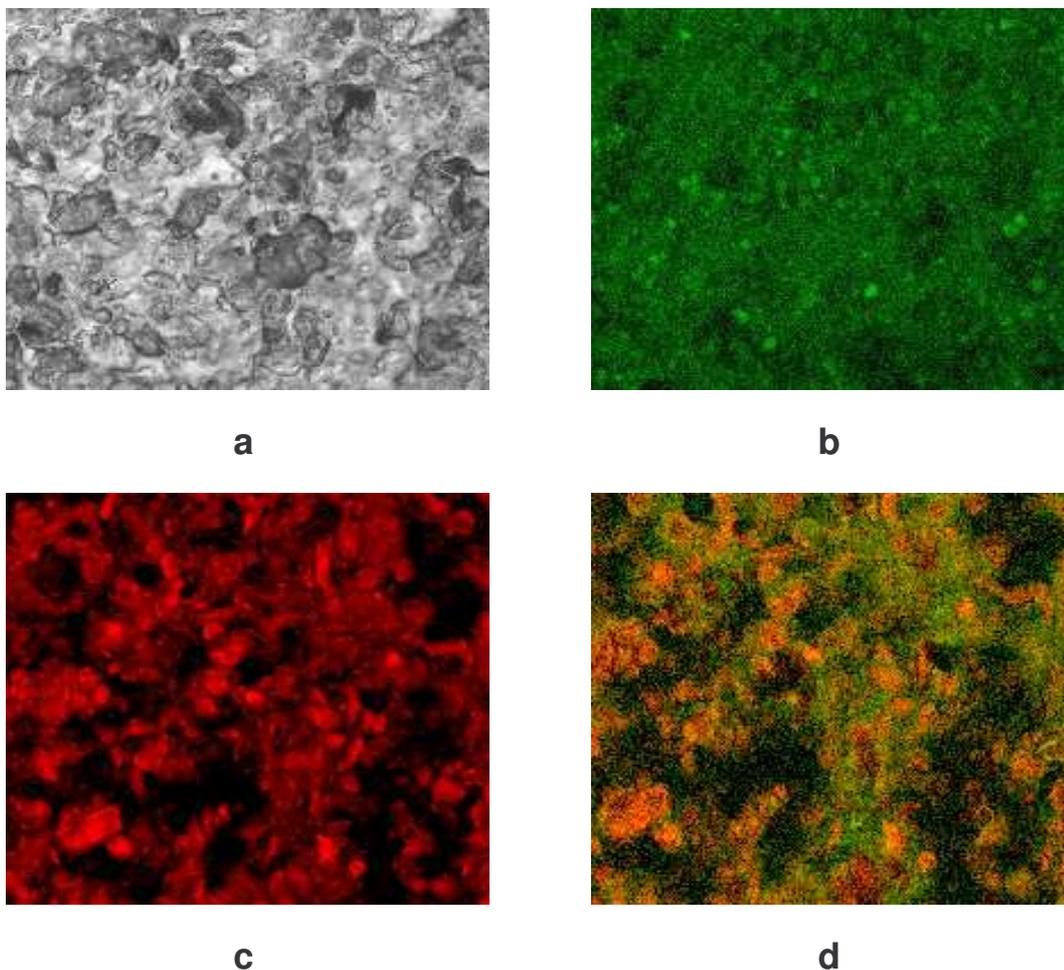
**Figura 22.** Imagens de microscopia confocal a laser do filme de gelatina, triacetina e ácido palmítico. (a) DIC (Contraste Interferencial Diferencial de Fase) (20X). (b) FITC (Isotiocianato de fluoresceína - gelatina corada) (20X), (c) Nile Red (triacetina+ácido palmítico - Nile Red) (20X) e (d) Merge (sobreposição gelatina-FITC e triacetina+ácido palmítico - Nile Red) (20X).



**Figura 23.** Imagem de microscopia confocal a laser do filme de gelatina, triacetina e ácido esteárico-palmítico. (a) DIC (Contraste Interferencial Diferencial de Fase) (20X); (b) FITC (Isotiocianato de fluoresceína - gelatina corada) (20X); (c) Nile Red (triacetina+ ácido esteárico-palmítico - Nile Red) (20X) e (d) Merge (sobreposição gelatina-FITC e triacetina+ ácido esteárico-palmítico - Nile Red) (20X).



**Figura 24.** Imagem de microscopia confocal do filme de gelatina, triacetina, blenda de ácido esteárico-palmítico e breu branco 10%. (a) DIC (Contraste Interferencial Diferencial de Fase) (20X); (b) FITC (Isotiocianato de fluoresceína - gelatina corada) (20X); (c) Nile Red (triacetina+ blenda de ácido esteárico-palmítico e breu branco 10% - Nile Red) (20X) e (d) Merge (sobreposição gelatina-FITC e triacetina+ blenda de ácido esteárico-palmítico e breu branco 10% - Nile Red) (20X).



**Figura 25.** Imagem de microscopia confocal do filme de gelatina, triacetina, blenda ácido esteárico-palmítico e ácido láurico 10%. (a) DIC (Contraste Interferencial Diferencial de Fase) (20X); (b) FITC (Isotiocianato de fluoresceína - gelatina corada) (20X); (c) Nile Red (triacetina+ blenda de ácido esteárico-palmítico e ácido láurico 10% - Nile Red) (20X) e (d) Merge (sobreposição gelatina-FITC e triacetina+ blenda de ácido esteárico-palmítico e ácido láurico 10% - Nile Red) (20X).

#### 4.11 Isoterma de sorção

As isotermas de sorção têm sido extensivamente utilizadas para descrever matematicamente o comportamento entre o conteúdo de umidade e atividade de água de materiais biológicos. Tal determinação é importante para filmes de biopolímeros hidrofílicos, visto que esses filmes são sensíveis a umidade, e o conteúdo de água ou  $a_w$  pode influenciar fortemente sua funcionalidade (YANG, PAULSON, 2000a). Através das isotermas de sorção, obtêm-se informações do teor de umidade de equilíbrio em filmes proteicos em função da umidade relativa. Polímeros hidrofílicos, como as proteínas, contêm grupos polares que permitem a formação de pontes de hidrogênio, absorvendo água do ambiente. Desta forma, a presença de vapor de água na matriz polimérica altera a permeação a gases, pois uma alta sorção de água provoca uma maior taxa de permeação, já que a molécula de água atua como plastificante na matriz filmogênica e aumenta o volume livre do polímero. Portanto, as isotermas de sorção indicam o comportamento dos filmes proteicos quanto às propriedades de barreira em diferentes umidades relativa (KIN; USTUNOL, 2001).

Com o objetivo de determinar as características de adsorção de água dos filmes, foram determinadas as curvas de adsorção de água nos filmes de gelatina e triacetina, gelatina, triacetina e ácidos (esteárico, palmítico e blenda de ácido esteárico-palmítico) e gelatina, triacetina, blenda de ácido esteárico-palmitico e breu branco ou ácido láurico (1 e 10%). Existem diversas equações que descrevem isotermas, sendo as mais comuns BET e GAB, utilizadas neste estudo. Os resultados indicaram que todos os modelos testados ajustaram os resultados em toda faixa de atividade de água estudada. Os valores das constantes das equações de BET e GAB e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para os diferentes filmes estão nas Tabelas 12 e 13. Foi observado que o modelo GAB obteve valores de  $R^2$  maiores, o que indica que esse modelo ajustou-se melhor aos dados experimentais. A equação GAB foi o modelo utilizado para as isotermas de sorção de filmes de gelatina (LIM; MINE; TUNG, 1999) e filmes emulsionados de proteína do soro do leite (KIM; USTUNOL, 2001). Deste modo o

modelo GAB foi utilizado para representar as curvas de adsorção de água nos filmes em teste.

As isotermas de adsorção (Figuras 19 e 20), para todos os filmes, apresentam a forma sigmoideal, como de polímeros sensíveis ao vapor d'água (LIOUTAS; BECHTEL; STEINBERG, 1988). Geralmente, sistemas com alto teor protéico apresentam maior incidência na forma sigmoideal, como as proteínas de trigo (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1993). LIM; MINE e TUNG, (1999) relataram que o formato sigmoideal das curvas de isotermas de adsorção de umidade sugere a formação de agrupamentos de moléculas de água na matriz polimérica com o aumento da atividade de água, seguido de um entumescimento da matriz, o que pode ocasionar a exposição de um número maior de sítios de ligação para a sorção de água.

A umidade da monocamada ( $X_m$ ) foi maior no filme de gelatina/triacetina. Segundo KINSELA (1984), os componentes hidrofílicos, como proteína e glicerol, são responsáveis pela afinidade da água pelo filme. Para valores elevados de umidade relativa, o ganho de umidade aumentou de forma exponencial, promovendo o entumescimento dos filmes. Tal fenômeno provoca mudanças conformacionais da estrutura do filme, o que aumenta a adsorção de água e abre a matriz polimérica permitindo um aumento no fluxo de permeante (WILLES et al., 2000). A adição de substâncias hidrofóbicas provocou diminuição do teor de umidade na monocamada ( $X_m$ ). Este comportamento pode estar relacionado com o aumento da hidrofobicidade dos filmes e conseqüente diminuição da capacidade de absorção de água. Resultado semelhante foi obtido por KIM e USTUNOL (2001) em filmes emulsionados à base de proteína do soro do leite.

O biofilme de gelatina e triacetina adsorveu mais umidade do que os outros biofilmes em toda a faixa de atividade de água estudada (Figuras 19 e 20). A gelatina é uma proteína hidrofílica, e, dessa maneira, era esperada uma progressiva hidratação e inchamento do filme quando exposto a um ambiente com alta umidade relativa evidenciado na isoterma de adsorção. Os biofilmes compostos adsorveram menos umidade do que os filmes sem substâncias hidrofóbicas. Todos os biofilmes adsorveram

pouca umidade em atividade de água menor do que 0,4, porém houve um grande aumento na adsorção em atividades de água elevadas.

Segundo WATT (1983), a absorção de vapor de água pelo biopolímero pode resultar no aumento de volume e mudanças conformacionais na estrutura molecular. Conseqüentemente, o conhecimento das propriedades de sorção do biofilme à base de proteína é necessário para informar o quanto de água ele pode absorver ou perder, seja do ambiente ou de um sistema alimentício para, dessa forma, estabelece as condições adequadas de armazenamento.

**Tabela 12.** Constantes e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) de cada modelo de isoterma de adsorção a 25°C

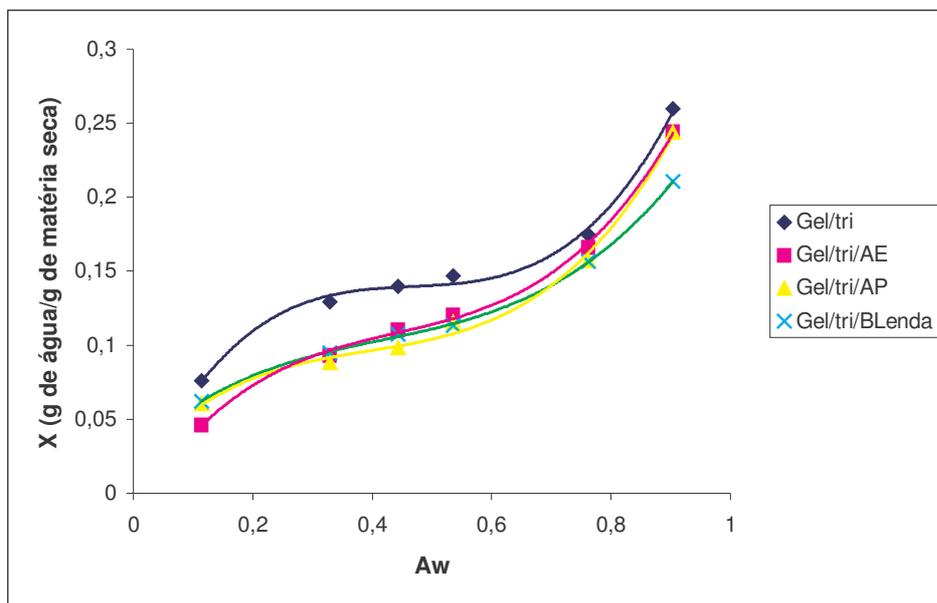
| Modelo | Constante | Gel/tri | Gel/tri/ae | Gel/tri/ap | Gel/tri/blenda |
|--------|-----------|---------|------------|------------|----------------|
| BET    | $x_m$     | 0,0680  | 0,0564     | 0,0614     | 0,0549         |
|        | c         | 35,08   | 33,48      | 24,71      | 43,29          |
|        | $R^2$     | > 0,98  | > 0,99     | > 0,98     | > 0,97         |
| GAB    | $x_m$     | 0,0842  | 0,0710     | 0,0683     | 0,0756         |
|        | K         | 0,87    | 0,87       | 0,91       | 0,91           |
|        | C         | 29,72   | 42,28      | 11,94      | 42,45          |
|        | $R^2$     | >0,99   | > 0,99     | > 0,99     | > 0,99         |

\* Gel: Gelatina, Tri: triacetina, blenda: 1:1 esteárico-palmítico; AE: ácido esteárico, AP: ácido palmítico.

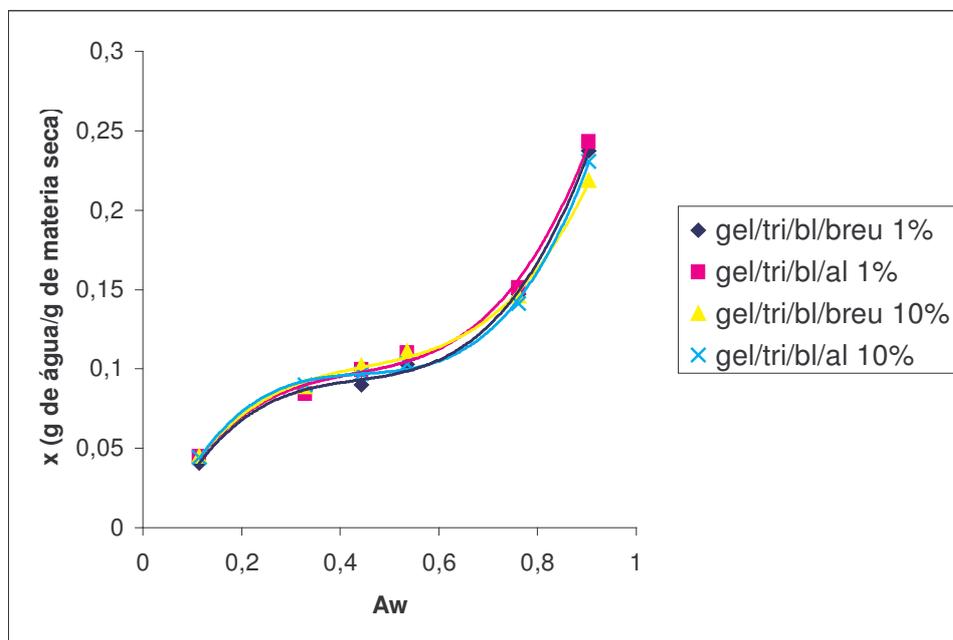
**Tabela 13.** Constantes e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de cada modelo de isoterma de adsorção para os filmes a 25°C.

| Modelo | Constante ou $R^2$ | Gel/tri/blenda/al<br>1% | Gel/tri/blenda/al<br>10% | Gel/tri/blenda/breu<br>1% | Gel/tri/blenda/<br>breu 10% |
|--------|--------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| BET    | $x_m$              | 0,0554                  | 0,0520                   | 0,0514                    | 0,0561                      |
|        | c                  | 32,85                   | 47,98                    | 41,63                     | 37,04                       |
|        | $R^2$              | > 0,98                  | > 0,99                   | > 0,98                    | > 0,98                      |
| GAB    | $x_m$              | 0,0716                  | 0,0668                   | 0,0788                    | 0,0672                      |
|        | k                  | 0,87                    | 0,87                     | 0,88                      | 0,90                        |
|        | c                  | 15,70                   | 18,34                    | 15,31                     | 14,54                       |
|        | $R^2$              | > 0,99                  | > 0,99                   | > 0,99                    | >0,99                       |

\* Gel: Gelatina, Tri: triacetina, blenda: 1:1 esteárico-palmítico; AL: ácido láurico.



**Figura 26.** Isotherma de adsorção dos filmes de gelatina com e sem ácido graxo, ajustadas pela equação de GAB, nas temperaturas de 25°C.



**Figura 27.** Isotermas de adsorção dos filmes ge gelatina com breu e ácido láurico, ajustado pela equação de GAB, na temperatura de 25°C.

## 4.12 Análises térmicas

### 4.12.1 Análises dinâmica mecânica (DMA)

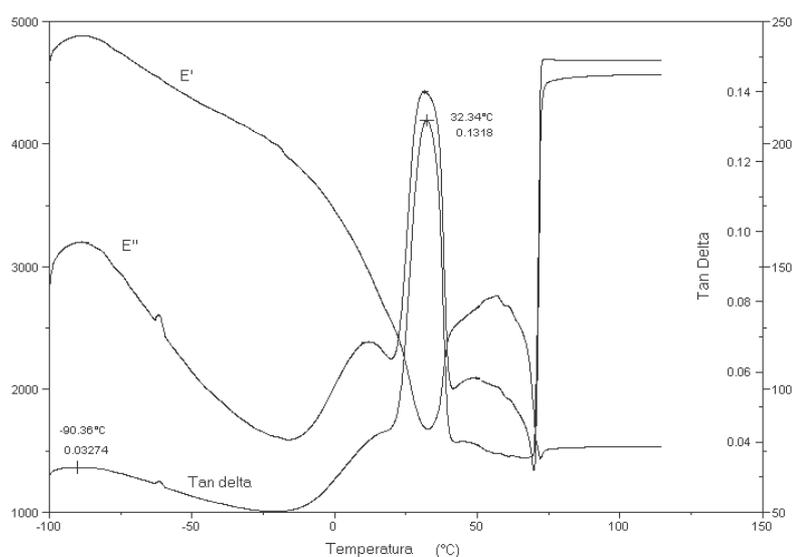
A análise dinâmica mecânica (DMA) é capaz de fornecer informações sobre o comportamento viscoelástico dos materiais. As propriedades mecânicas mais importantes em polímeros, como tensão-deformação, resistência, tensão-relaxamento, entre outras, decorrem de processos onde existem grandes relaxações moleculares e são dependentes da temperatura, habilidade de desenvolver deformações reversíveis e da íntima correlação entre os processos mecânicos e químicos (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

Através da análise dinâmica mecânica foi possível obter o módulo de armazenamento ( $E'$ ), módulo de perda ( $E''$ ) e a tangente de perda ( $\tan \delta$ ). A tangente de perda ( $\tan \delta$ ) foi obtida pela razão entre o módulo de perda ( $E''$ ) e módulo de armazenamento ( $E'$ ). A diminuição do módulo de armazenamento e o aumento do pico da tangente de perda ( $\tan \delta$ ) correspondem à transição típica de material rígido para borrachoso, ou seja, a transição vítrea (GALLIETTA ET AL. 1998). Os métodos dinâmicos mecânicos são muito sensíveis a transformações (ou movimentos) que ocorrem em nível molecular, sendo capazes de detectar não somente movimentos significativos, como o caso da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), como também movimentos mais discretos, conhecidos como relaxações secundárias (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002; LUCAS, SOARES; MONTEIRO, 2001).

Os gráficos típicos de DMA dos filmes de gelatina simples e compostos, mostrando a tangente de perda ( $\tan \delta$ ), o módulo de armazenamento ( $E'$ ) e o módulo de perda ( $E''$ ) em função da temperatura, estão representados nas Figuras 22 a 28.

Na Figura 22, foi possível observar uma transição  $\alpha$  (relacionada à temperatura de transição vítrea) a 32,34°C e uma transição  $\beta$  (relacionada a relaxações secundárias) a -90,36°C. Relaxações secundárias também foram encontrados por DIAB et. al. (2001) em filmes de pullulan, polissacarídeo extracelular produzido por *Aureobasidium*

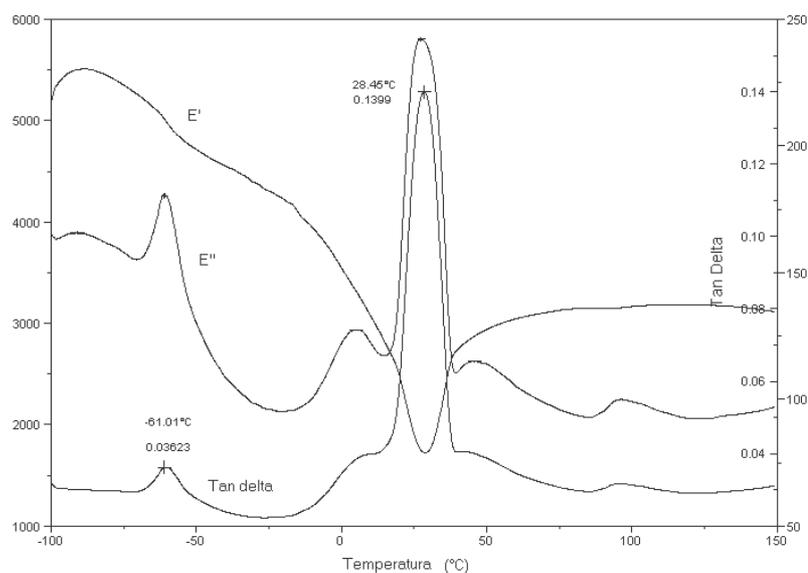
*pullulans*, plastificado com sorbitol. Análise de espectroscopia dielétrica apontou que, mesmo no estado vítreo (abaixo da  $T_g$ ), existe rotação da cadeia lateral da molécula de gelatina e/ou movimentação local dos segmentos da cadeia principal, chamada  $\beta$  relaxação ou relaxação dielétrica secundária. (JOHARI, 1985) As relaxações secundárias ocorrem abaixo da  $T_g$  e podem ter origem nos movimentos moleculares de grupos ou partes de grupos laterais, sendo que o tipo de movimento dependerá da estrutura química da molécula (LUCAS, SOARES; MONTEIRO, 2001). RAMARAJ, RAJALINGAM, RADHAKRISHANAN (1991) observaram na gelatina pura, duas temperaturas de transição vítrea e uma temperatura de fusão, obtidas através de DSC, 58, 88 e 110°C, respectivamente.



**Figura 28.** Análise termodinâmica do filme de gelatina utilizando DMA.

Nos filmes de gelatina plastificados com triacetina (Figura 23) foi possível verificar duas temperaturas de transição vítrea (-61,01°C e 28,45°C), indicando separação de fase entre a macromolécula e o plastificante. O valor de -61,01°C ( $T_{g1}$ ), possivelmente está relacionado com a transição da fração rica em plastificante. FRINGANT et al. (1998) encontraram valor em torno de -65°C para triacetina pura, registrada por

calorimetria diferencial de varredura (DSC), sendo possível concluir que a temperatura da primeira transição (-61,01°C) esteja mesmo relacionada à fração rica em plastificante, ou seja, a tricetina.



**Figura 29.** Análise termodinâmica do filme de gelatina/triacetina, utilizando DMA.

Essa fase de separação também foi observada nos filmes de gelatina plastificados com glicerol (CARVALHO, 2002), em filmes de metilcelulose plastificado com polietileno glicol 400 (DEBEAUFORT, VOILLEY, 1997) e glúten com glicerina (CHERIAN et. al., 1995). ARVANITOYANNIS et al (1997) não observaram separação de fases em filmes de uma mistura de gelatina e amido, plastificados com glicerina ou sorbitol, porém os termogramas apresentados começaram a 0°C, acima da Tg dos plastificantes.

Uma das características necessárias do plastificante é que seja compatível e solúvel no biopolímero. A separação de fase nos biofilmes indica a não ocorrência de 100% de mistura entre o plastificante e biopolímero (GONTARD; RING, 1996). Por outro lado, como os filmes são materiais de baixa umidade, os plastificantes encontram-se relativamente concentrados, podendo causar problemas (SOBRAL, 2000). Deste

modo, a separação de fases deveria implicar em perda da flexibilidade do filme, porém, segundo DEBEAUFORT e VOILLEY (1997), os plastificantes podem atuar também como lubrificante das cadeias dos biopolímeros, facilitando dessa forma a flexibilidade do filme. A utilização do DMA para estudos de miscibilidade é baseada na observação de que sistemas miscíveis apresentam apenas um pico  $\alpha$  combinado, cuja localização é dependente da composição (LUCAS, SOARES; MONTEIRO, 2001).

Nos termogramas dos filmes de gelatina, gelatina/triacetina, gelatina/triacetina/ácido palmítico é possível visualizar um pequeno ombro antes do pico da tangente de perda, possivelmente referente às diferentes massas moleculares presentes na gelatina. A gelatina pode apresentar diferentes frações de massa molecular, pois, em geral, o processo de extração não é completamente uniforme (JOHNSTON-BANKS, 1990). A massa molecular da gelatina depende do tipo de matéria prima e das condições de processo utilizadas. De forma geral, a massa molecular da gelatina pode variar de 300 a 200.000 Da (GENNADIOS et al., 1994).

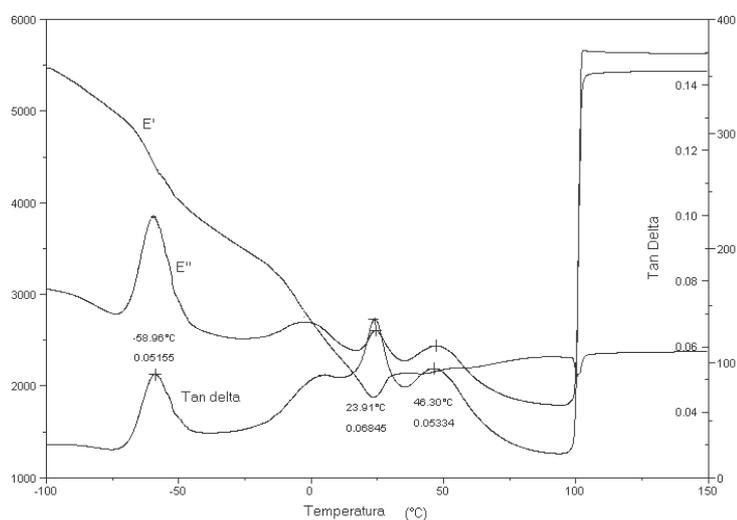
A temperatura de transição vítrea do filme de gelatina/triacetina (28,45°C) (Figura 23) referente à fase rica em gelatina foi menor que a temperatura encontrada no filme de gelatina apenas (32,34°C) (Figura 22). Essa diminuição resulta provavelmente, do efeito plastificante da molécula de triacetina, a qual aumenta o volume livre da rede polimérica e a mobilidade da cadeia, causando dessa forma diminuição no valor de Tg. O volume livre, que corresponde ao volume não ocupado pelo material sólido, representa o espaço disponível para o movimento livre das moléculas (FLINK, 1983 apud COLLARES, 2001). A plastificação, a nível molecular leva a um aumento do espaço inter-molecular ou volume livre, diminuindo a viscosidade local, concomitantemente aumentando a mobilidade (FERRY, 1980). GALIETTA et al. (1998) observaram uma diminuição no valor da temperatura de transição vítrea nos filmes de proteína do soro do leite, conforme ocorria aumento da concentração de glicerol. Segundo os autores, esse comportamento estaria associado à diminuição das forças intermoleculares entre as cadeias poliméricas, causadas pela presença do plastificante. DEBEAUFORT; VOILLEY (1997) também evidenciaram uma diminuição na Tg dos

filmes de metilcelulose, conforme aumentava a concentração do plastificante (PEG-100).

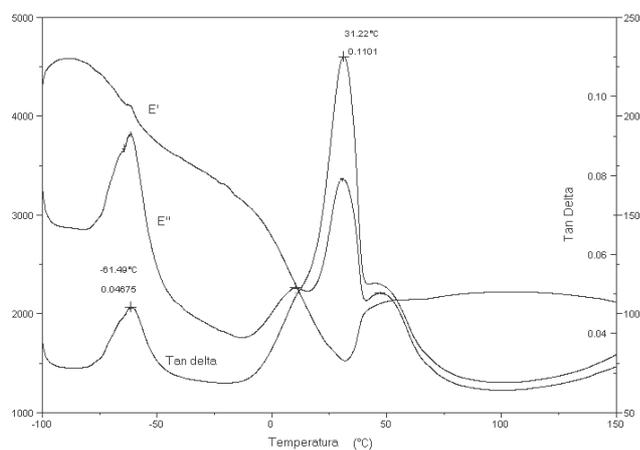
Os termogramas da análise dinâmico mecânicas (Figura 22, 23, 24, 25, 26; 27 e 28) mostraram a presença de três transições nos filmes de gelatina/triacetina/ácido esteárico e gelatina/triacetina/blenda esteárico-palmítico/ácido láurico 1%, e duas nos demais filmes (gelatina/triacetina/ácido palmítico; de gelatina/triacetina/blenda ácido esteárico-palmítico; gelatina/triacetina/blenda esteárico-palmítico/ácido láurico 10%; gelatina/triacetina/blenda esteárico-palmítico/ácido breu 1% e gelatina/triacetina/blenda esteárico-palmítico/ácido breu 10%).

As temperaturas de transição negativas possivelmente estão relacionadas com a transição da fração rica em plastificante, indicativo de separação de fase entre o agente formador de filme (gelatina e substâncias hidrofóbicas) e o plastificante. A segunda temperatura de transição vítrea ( $Tg_2$ ) observada está relacionada com a temperatura de transição da fase rica em proteína e a  $Tg_3$  (GEL/TRI/AP 10% e GEL/AC/TRI/AL 1%), provavelmente a temperatura de transição dos ácidos graxos, referente a falta de acomodação física de forma homogênea desses ácidos na matriz filmogênica.

O pico de  $\tan \delta$  para o filme de GEL/TRI/AP 10% (Figura 24) apresenta-se menor que o do filme de GEL/TRI/AE 10% (Figura 25). O mesmo comportamento foi observado por POMMET et al. (2003) para filmes emulsionados de glúten e ácidos graxos. Os autores constataram que a utilização de ácidos graxos de menor cadeia refletia em picos de  $\tan \delta$  menores.



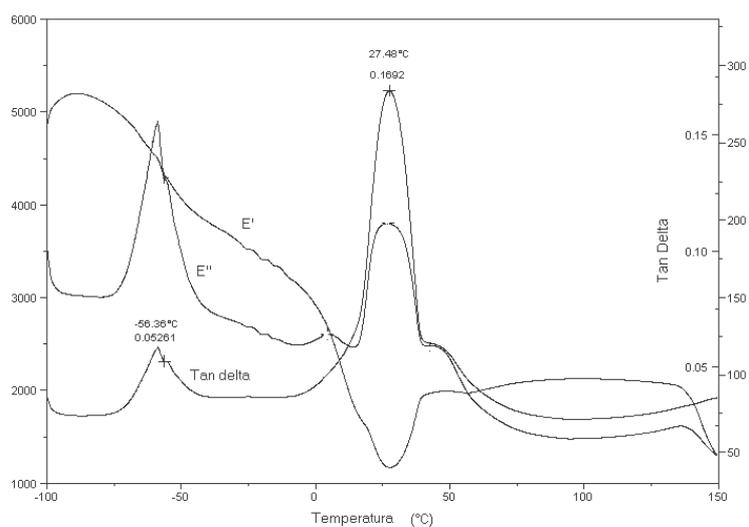
**Figura 30.** Análise termomecânica do filme de gelatina/triacetina/ácido palmítico, utilizando DMA.



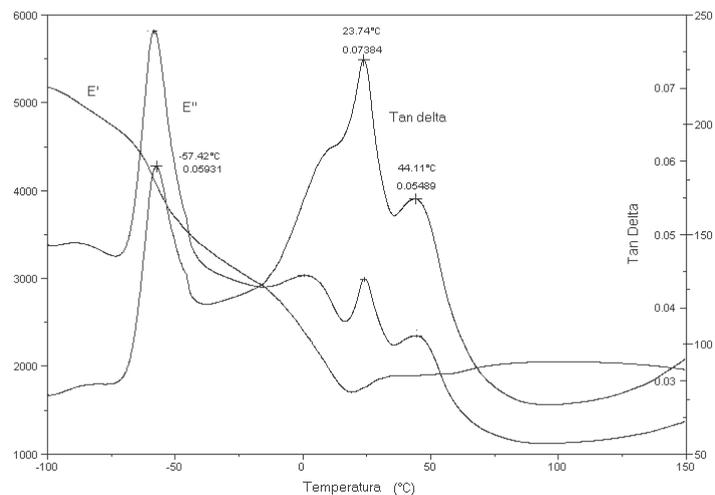
**Figura 31.** Análise termomecânica do filme de gelatina/triacetina/ácido esteárico, utilizando DMA.

SARI; KAYGUSUZ (2003) avaliaram a estabilidade térmica de diversos ácidos graxos utilizando calorimetria diferencial de varredura (DSC). As temperaturas de

transição vítrea obtidas foram 53,8; 59,9; 42,6°C para os ácidos esteárico, palmítico e láurico, respectivamente. Dessa maneira, provavelmente a  $Tg_3$  visualizada nos termogramas dos filmes de Gel/tri/AP 10% (46,30°C) (Figura 24) e Gel/ac/tri/AL 1% (44,11°C) (Figura 27) estão relacionadas com a transição vítrea desses ácidos graxos.

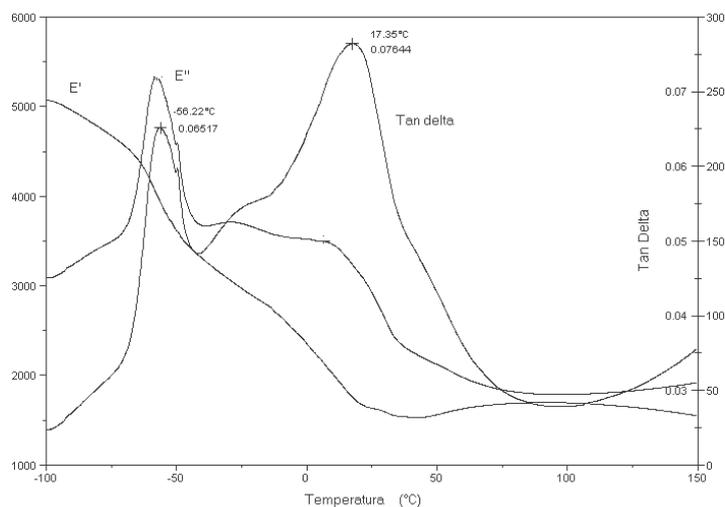


**Figura 32.** Análise termomecânica dos filmes de gelatina/triacetina/blendas esteárico-palmítico utilizando DMA.



**Figura 33.** Análise termomecânica dos filmes de gelatina/triacetina/blenda de esteárico-palmítico/ácido láurico 1%, utilizando DMA.

Ao aumentar a concentração de ácido láurico no filme, observou-se no termograma apenas uma transição com alargamento do pico relativo à transição (Figura 28). Segundo LUCAS, SOARES; MONTEIRO (2001), a largura do pico que ocorre na transição vítrea está relacionada com a homogeneidade da fase que está sofrendo o processo. Em sistemas parcialmente miscíveis é comum ocorrer solubilidade das cadeias de uma fase na outra, o que pode ser acompanhado pelo alargamento do pico relativo à transição vítrea da fase na qual cadeias da outra fase estão solubilizadas. ARVANITOYANNIS et al (1997) discutem ser muito difícil detectar transições de sistemas complexos, como gelatina/amido/polióis/água, em particular em baixo conteúdo de umidade. O efeito do sinergismo entre os componentes pode resultar em um alargamento da transição.



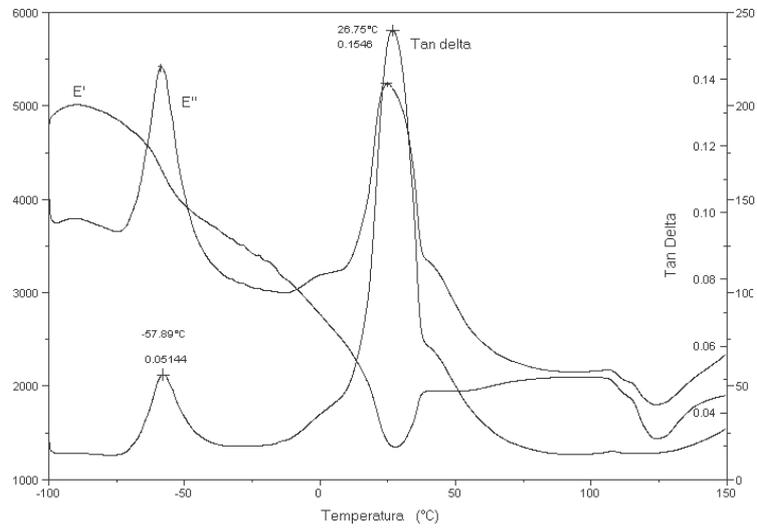
**Figura 34.** Análise termomecânica do filme de gelatina/triacetina/blendas esteárico-palmítico/ácido láurico 10%, utilizando DMA.

Alguns lipídios (acetoglicerídeos, ácidos graxos, monoglicerídeos, fosfolipídios) são usados para aumentar a flexibilidade dos filmes poliméricos. Eles são considerados plastificantes por enfraquecerem as forças intermoleculares entre as cadeias poliméricas adjacentes, influenciando, desta forma, as propriedades mecânicas dos filmes (CALLEGARIN et al., 1997), como também na temperatura de transição vítrea. KALICHEVSKY; JAROSZKIEWICZ; BLANSHARD (1992) estudaram o efeito de lipídios e emulsificantes na Tg dos filmes de glúten. Os autores observaram uma diminuição na temperatura de transição vítrea de 4°C para -18°C, nos filmes com a adição de ácido capríco. O mesmo comportamento foi observado com a adição de ácido 2-hidrocaprício nos filmes.

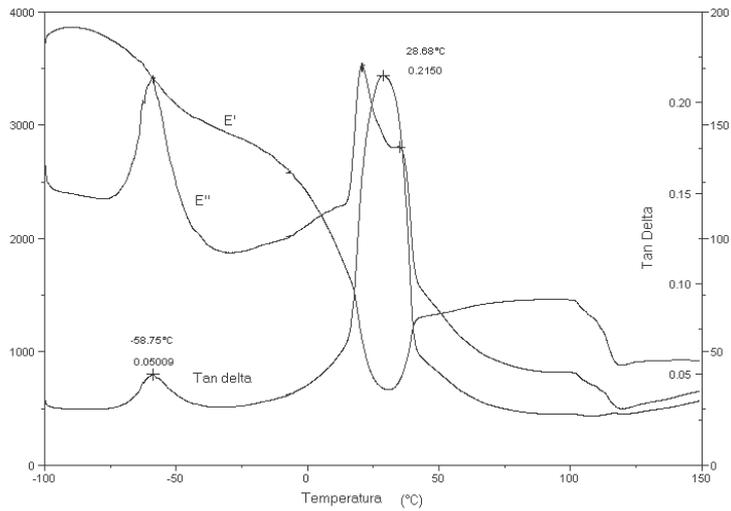
POMMET et al. (2003) propuseram a utilização de diversos ácidos graxos para plastificar filmes de proteína, como o glúten. Os autores observaram que ao adicionar ácidos graxos com cadeia de carbono menores que 10 carbonos, o efeito lubrificante mostrou-se mais eficiente, enquanto a utilização de ácidos graxos com cadeias maiores resultou em separação de fases e exsudação dos mesmos na matriz protéica. Nos

termogramas de DMA, os mesmos autores verificaram que os filmes plastificados com ácido láurico, mirístico e palmítico, apresentavam um pico menor antes do maior pico referente à Tg do glúten, devido à heterogeneidade do material.

A adição de breu branco (1 e 10%) (Figura 29 e Figura 30) aos filmes de gelatina/triacetina/blenda ácido esteárico-palmítico apresentou uma Tg<sub>2</sub> maior que a obtida ao adicionar ácido láurico nas mesmas concentrações. Esse comportamento deu-se provavelmente pelo fato de o breu branco apresentar uma conformação mais “volumosa” que o ácido láurico, causando dessa maneira impedimento da movimentação molecular. Com isso, houve um deslocamento da temperatura de transição vítrea para valores mais altos.



**Figura 35.** Análise termomecânica do filme de gelatina/triacetina/blenda esteárico-palmítico/breu 1%, utilizando DMA.



**Figura 36.** Análise termomecânica do filme gelatina/triacetina/blenda esteárico-palmítico/breu 10%, utilizando DMA.

Acima da T<sub>g</sub>, a estrutura polimérica é pouco ordenada e viscosa, assim como abaixo da T<sub>g</sub> a conformação polimérica é mais ordenada. A taxa de permeabilidade ao vapor de água através do filme no estado borrachoso é muito maior que a permeação da mesma barreira no estado vítreo (KOELSH; LAMBUZA, 1992). Devido a isso, é aconselhável a estocagem dos filmes a temperaturas abaixo da temperatura de transição vítrea, para que não haja movimentação molecular, impedindo a reorganização molecular e conseqüente alteração nas propriedades dos filmes, como, por exemplo, aumento na permeabilidade ao vapor de água e diminuição da resistência a tração. Portanto, a partir dos resultados, é aconselhável a estocagem dos filmes em produtos sob refrigeração para melhorar as propriedades dos mesmos.

**Tabela 14.** Temperatura de transição vítrea e umidade dos filmes de gelatina simples e composto.

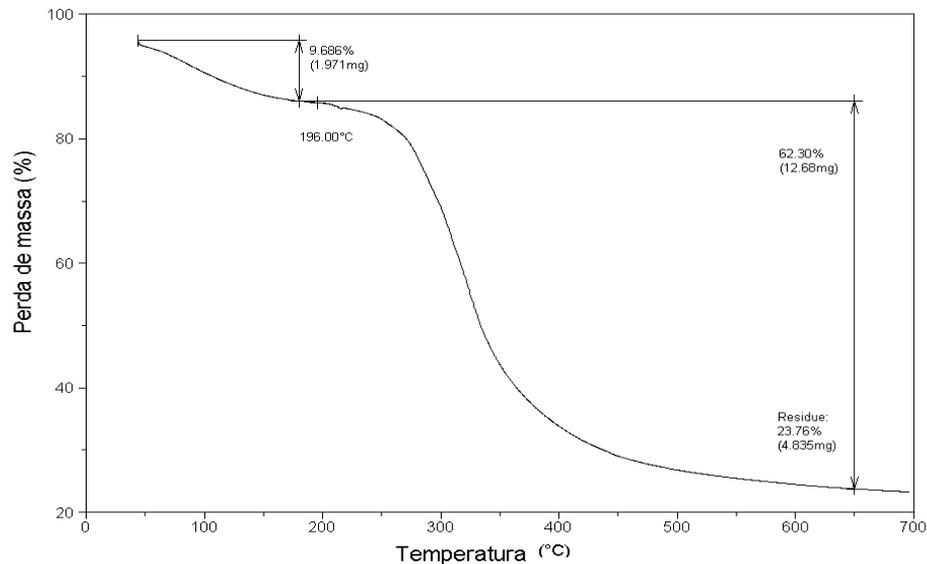
| FILMES              | T <sub>g1</sub> | T <sub>g2</sub> | T <sub>g3</sub> | Umidade (%)  |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|
| Gel                 | 32,34°C         | *               | *               | 11,23 ± 0,23 |
| Gel/tri             | -61,01°C        | 28,45°C         | *               | 11,18 ± 0,64 |
| Gel/tri/AP 10%      | -58,96°C        | 23,91°C         | 46,30°C         | 11,12 ± 0,12 |
| Gel/tri/AE 10%      | -61,49°C        | 31,22°C         | *               | 11,2 ± 0,33  |
| Gel/ac/tri          | -56,36°C        | 27,48°C         | *               | 10,25 ± 0,78 |
| Gel/ac/tri/AL 1%    | -57,42°C        | 23,74°C         | 44,11°C         | 10,68 ± 0,31 |
| Gel/ac/tri/AL10%    | -56,22°C        | 17,35°C         | *               | 9,28 ± 0,44  |
| Gel/ac/tri/Breu 1%  | -57,89°C        | 26,75°C         | *               | 10,01 ± ,026 |
| Gel/ac/tri/Breu 10% | -58,89°C        | 28,68°C         | *               | 9,05 ± 0,56  |

\* Gel: Gelatina, Tri: triacetina, ác: Ácidos (1:1 esteárico e palmitico), AE: ácido esteárico, AP: ácido palmitico, AL: ácido láurico.

#### 4.12.2 Termogravimetria (TGA)

A análise termogravimétrica é um processo contínuo que envolve medida da variação de massa de uma amostra em função da temperatura. O resultado em geral é dado na forma de um gráfico cuja abscissa contém os registros da temperatura e a ordenada, o percentual em massa perdido ou ganho (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

Na Figura 26 é apresentada a curva de degradação térmica resultante do filme de gelatina. É possível observar no perfil da curva uma perda de massa de 9,686% (1,971mg) na faixa de temperatura de 25-180°C, referente à evaporação de água da amostra. A partir dessa faixa de temperatura (196 °C) inicia-se a degradação, que parece concluída até a temperatura de 500°C, quando as curvas apresentam praticamente uma linha constante de variação de massa. Ao final (650°C) houve uma perda de 62,30% (12,68mg) de massa e resíduo de 23,76% (4,835mg).

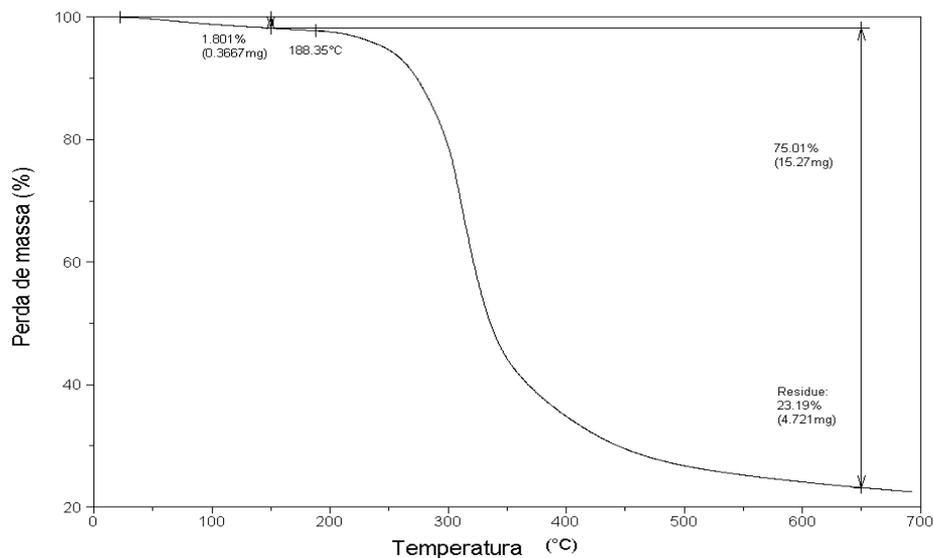


**Figura 37.** Curva termogravimétrica de degradação do filme de gelatina.

Polímeros naturais e sintéticos podem apresentar certas instabilidades químicas sob a ação de determinados agentes, como radiações eletromagnéticas (raios gama, infravermelho, etc.), cisalhamento, calor, entre outros. Os polímeros, quando submetidos a um tratamento térmico, podem apresentar mudanças estruturais caracterizadas por ruptura de ligações químicas das cadeias principais e laterais. Essas modificações são evidenciadas pela diminuição na massa molar com evaporação de produtos voláteis (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

XIAO et al. (2001) trabalharam com filmes de blenda de polissacarídeo Konjac glucomannan-gelatina. Os autores observaram que filme feito apenas de gelatina apresentava maior estabilidade térmica (245°C) que os mesmos feitos com o polissacarídeo (203°C). Os mesmos autores reportaram que o aumento da concentração de gelatina aumentou sensivelmente a estabilidade térmica do filme da mistura.

Na Figura 32, é possível observar a curva de degradação térmica da amostra de gelatina em pó previamente seca em estufa de circulação de ar a 105°C por 24 horas. É possível observar no perfil da curva uma perda de massa de 1,801% (0,3667mg) na faixa de temperatura de 25-180°C, referente à evaporação de água presente no pó de gelatina. A partir da temperatura de 188,35 °C, inicia-se a degradação, que consiste na variação de massa de materiais sólidos, que é concluída a temperatura de 500°C. Ao final (650°C) houve uma perda de 75,01% (15,27mg) de massa e resíduo de 23,19% (4,721 mg).



**Figura 38.** Curva termogravimétrica da gelatina em pó previamente seca.

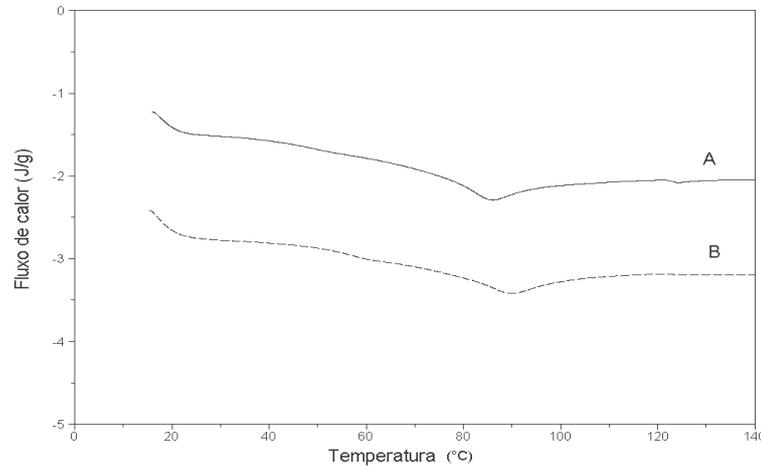
#### 4.12.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Os resultados da temperatura de fusão dos filmes de gelatina simples e compostos estão graficados nas figuras 33, 34 e 35. Observou-se apenas uma fusão nos filmes simples (Figura 33) e duas fusões nos filmes compostos (Figura 34 e 35).

Foi possível verificar pela análise de TGA que a fusão e a evaporação da água dos filmes ocorrem simultaneamente, desta forma o valor de  $\Delta H$  de fusão da gelatina não

pode ser considerado um valor absoluto estando embutido no mesmo o calor latente de evaporação da água. O valor do  $\Delta H$  de fusão do filme de gelatina foi calculado descontando-se o  $\Delta H$  de evaporação da água presente no filme. Desta forma, o peso de amostra (filme de gelatina) presente na panelinha de DSC (10,9 mg) foi multiplicado pela porcentagem de perda de água (9,686% valor obtido por TGA) e multiplicado pelo calor de vaporização da água, na temperatura de fusão da amostra (2291 J/g a 358,64K, INCROPERA; DEWITT, 1992).

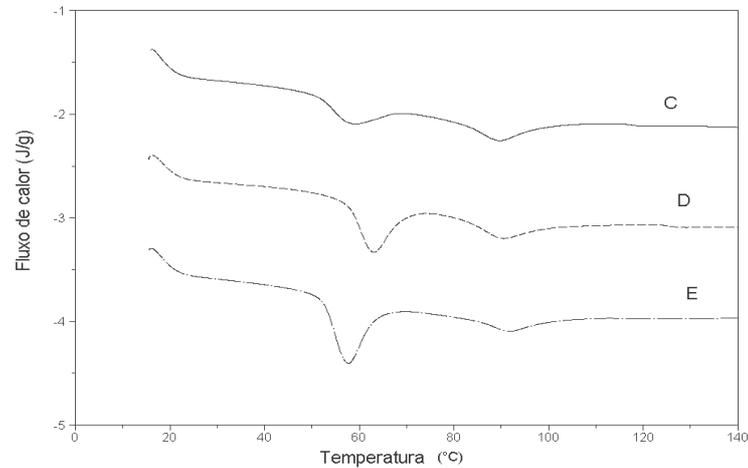
A temperatura de fusão da gelatina tanto dos filmes simples como dos compostos apresentam-se na faixa de 85,62-91,87°C. Resultados semelhantes foram encontrados por SOBRAL (2000) para os filmes de gelatina de cor de bovina e suína plastificados com sorbitol. O autor observou temperaturas de fusão na faixa de 77,6-93,1°C para gelatina de cor de bovina e 73,8-93,3°C para de cor de suína, conforme a quantidade de sorbitol utilizada era variada. CARVALHO (2002) obteve valores de temperatura de fusão para os filmes de gelatina de 65,1°C e SAKANAKA (2002) em torno de 55°C.



**Figura 39.** Termogramas de DSC dos filmes de gelatina (A), gelatina/triacetina (B).

BIGI et al. (2001) observaram um pico endotérmico central em torno de 43°C para os filmes de gelatina associada à fusão do filme. Os mesmos autores verificaram que o aumento das ligações cruzadas promovida pelo uso de glutaraldeído (2,5%) aumentou a estabilidade térmica do filme de gelatina e conseqüentemente um deslocamento no pico endotérmico com temperatura em torno de 72°C.

A adição de ácidos graxos resultou no aparecimento de mais um pico de fusão em todos os filmes. Observa-se que as temperaturas onde se encontram esses picos está relacionada com a temperatura de fusão. Os ácidos láurico, palmítico e esteárico possuem ponto de fusão de 44°C, 63°C e 69;3°C, respectivamente (BOBBIO, BOBBIO, 2003). Os resultados obtidos sugerem que as substâncias hidrofóbicas não estão totalmente incorporadas na matriz de gelatina, resultando nesse comportamento, também observado pela análise dinâmica mecânica (DMA), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal de varredura a laser (MCLV).



**Figura 40.** Termogramas de DSC dos filmes de gelatina/triacetina/ácido esteárico (C), gelatina/triacetina/ácido palmítico (D) e galatina/triacetina/blenda esteárico-palmítico (E).

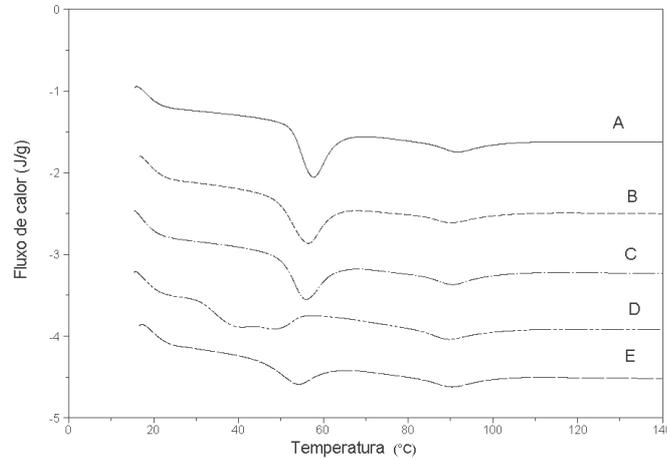
Comportamento semelhante foi encontrado por POMMET et al. (2003) nos filmes de glúten emulsionados com ácidos graxos. Os autores observaram que, ao utilizar ácidos graxos de cadeia menor (6-10C), o pico de fusão referente aos ácidos graxos foi de difícil observação, indicando que os mesmos estão imobilizados de forma homogênea na cadeia de glúten. Ao contrário, ao utilizarem ácidos graxos de cadeia maiores (láurico, mirístico e palmítico) os picos referentes à fusão foram claramente identificados, sugerindo um material heterogêneo, contendo a matriz de glúten plastificada e uma fase de ácido graxo não incorporada.

A temperatura de fusão observada para o filme composto de GEL/TRI/AP 10% (62,77°C) (Figura 34), foi semelhante temperatura de fusão do filme de glúten contendo ácido palmítico (61,02°C) determinado por POMMET et al (2003).

Ao adicionar ambos os ácidos ao filme de gelatina, o valor da temperatura de fusão observado foi 58,10°C. Em estudo com sistemas binários de ácidos palmítico e esteárico, MARKLET (1960-1968) apud UNICHEMA INTERNATIONAL (1987) observou

que, ao misturar os ácidos na proporção de 1:1, a temperatura de fusão obtida foi em torno de 56°C.

A adição de ácido láurico (1 e 10%) resultou em uma diminuição da temperatura de fusão dos filmes, sendo mais significativa na máxima concentração. Essa queda provavelmente ocorreu em virtude da temperatura de fusão (44°C) do ácido láurico, que resultou no deslocamento da fusão. Ao contrário, a adição de breu branco (1 e 10%) não causou um deslocamento significativo da temperatura de fusão, sendo possível concluir que a temperatura de fusão do breu branco encontra-se próxima à temperatura de fusão da blenda dos ácidos esteárico-palmítico.



**Figura 41.** Termogramas de DSC dos filmes de gelatina/triacetina/blenda esteárico-palmítico (A), gelatina/triacetina/blenda esteárico-palmítico/ácido láurico 1% (B), gelatina/triacetina/blenda esteárico-palmítico/breu 1% (C), gelatina/triacetina/blenda esteárico-palmítico/ácido láurico 10% (D) e gelatina/triacetina/blenda esteárico-palmítico/breu 10% (E).

A entalpia de fusão corresponde ao calor latente, isto é, à energia que deve ser fornecida para que ocorra fusão completa. Os valores de entalpia das substâncias hidrofóbicas variaram de 12,59 a 25,26 J/g. POMMET et al. (2003) encontraram valores de entalpia de fusão de 16,18 e 53,62 J/g, para os filmes de glúten emulsionados com ácido láurico e palmítico respectivamente. O valor de  $\Delta H_{m2}$  referente à fusão da gelatina dos filmes emulsionados mostraram-se menores que o  $\Delta H$  dos filmes simples. GARCIA et al. (2000) observaram que o valor de  $\Delta H$  dos biofilmes elaborados a base de amido diminuiu com a adição de óleo. Os autores atribuíram esse comportamento provavelmente pela interferência do lipídio na associação das cadeias poliméricas. O valor de  $\Delta H$  para os filmes de gelatina e gelatina e triacetina (18,57 e 13,6 J/g) foram semelhantes aos encontrados por SOBRAL (2000) que obteve valores de  $\Delta H$  em torno de 12,8-18,7 J/g.

**Tabela 15.** Valores de temperatura de fusão ( $T_m$ ) e entalpia de fusão dos filmes simples e compostos de gelatina.

| Filmes              | $T_{m1}$ (°C)    | $\Delta H_{m1}$ (J/g) | $T_{m2}$ (°C)    | $\Delta H_{m2}$ (J/g) |
|---------------------|------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|
| Gel                 | $85,62 \pm 0,11$ | $18,57 \pm 2,25$      |                  |                       |
| Gel/tri             | $90,18 \pm 0,89$ | $13,6 \pm 1,18$       |                  |                       |
| Gel/tri/AE 10%      | $58,17 \pm 0,19$ | $12,91 \pm 3,32$      | $89,40 \pm 0,28$ | $9,18 \pm 2,21$       |
| Gel/tri/AP 10%      | $62,77 \pm 0,19$ | $16,88 \pm 5,04$      | $90,02 \pm 0,07$ | $8,66 \pm 0,14$       |
| Gel/ac/tri          | $58,10 \pm 0,71$ | $22,98 \pm 2,92$      | $91,10 \pm 0,91$ | $5,71 \pm 0,48$       |
| Gel/ac/tri/AL 1%    | $56,38 \pm 0,12$ | $22,46 \pm 5,31$      | $91,81 \pm 2,21$ | $4,57 \pm 0,44$       |
| Gel/ac/tri/AL 10%   | $43,11 \pm 4,94$ | $25,26 \pm 0,16$      | $89,78 \pm 0,06$ | $5,51 \pm 2,73$       |
| Gel/ac/tri/Breu 1%  | $55,97 \pm 0,26$ | $19,53 \pm 3,28$      | $91,17 \pm 0,86$ | $5,89 \pm 0,13$       |
| Gel/ac/tri/Breu 10% | $53,62 \pm 0,52$ | $12,59 \pm 1,12$      | $90,55 \pm 0,13$ | $7,70 \pm 2,39$       |

\* Gel: Gelatina, Tri: triacetina, ác: Ácidos (1:1 esteárico e palmítico), AE: ácido esteárico, AP: ácido palmítico, AL: ácido láurico.

## 5. CONCLUSÕES

Os filmes elaborados com gelatina, triacetina, ácidos graxos (separadamente e em conjunto) e breu branco ou ácido láurico (em todas as concentrações) apresentaram-se manuseáveis e visivelmente homogêneos.

A adição de substâncias hidrofóbicas aos filmes de gelatina provocou uma redução na permeabilidade ao vapor de água e resistência a tração e aumentaram a permeabilidade ao oxigênio, solubilidade, alongação e opacidade.

As imagens de superfície e internas dos filmes indicaram uma superfície irregular com boa distribuição da substância hidrofóbica, embora fique evidente que não ocorreu uma incorporação homogênea dos componentes hidrofóbicos na matriz protéica.

A equação de GAB foi o modelo que melhor representou os dados de isoterma de adsorção dos filmes de gelatina simples e compostos, apresentando uma forma sigmoideal.

As propriedades físico-químicas dos filmes de gelatina simples e composto mostraram a presença de duas a três temperaturas de transição vítrea obtidas por DMA, indicando separação de fase, também observada na calorimetria diferencial de varredura pela presença de um pico de fusão nos filmes simples e dois picos nos compostos.

## **6. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS**

Inclusão de tensoativos de diferentes HLB (hidrofilic lipofilic balance) nos filmes emulsionados.

Uso de solventes orgânicos.

Uso de ácidos graxos de cadeia menor para verificar viabilidade de melhor incorporação dos mesmos na matriz de proteína.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHET, D; HE, X.W. Determination of renaturation level in gelatin films. **Polymer**, Oxford, v. 36, n.4, p.787-791, 1995.

ASTM. Standart test methods of water vapor transmission of materials. **American Society for Testing and Materials**, Philadelphia, E 96-95, 1995.

ASTM. Tensile properties of thin plastic sheeting. **Annual Book of ASTM Standards**, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, D 882, 1995.

ASTM. Standard test methods for oxygen transmission rate through dry packages using a coulometric sensor, Designation D 3985-81, **ASTM Book of Standards**, ASTM, Philadelphia, PA, pp. 1177-1182, 1990.

ARVANITOYANNIS, I. S. ; NAKAYAMA, A; AIBA, S. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. **Carbohydrate Polymer**, Oxford, v.37, p.371-382, 1998.

ARVANITOYANNIS, I. S. ; PSOMIADOU, E; NAKAYAMA, A; YAMAMOTO, N. Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols-Part 3. **Food Chemistry**, Oxford, v.60, n.4, p. 593-604, 1997.

AVENA-BUSTILLOS, R. J.; KROCHTA, J.M. Water vapor permeability of caseinate-based edible films as affectes by pH, calcium crosslinking and lipid content. **Journal of Food Science**, Chicago, v.58, n.4, p.904-907, 1993.

AYRANCI, E.; TUNE, S. The effect of fatty acid content on water vapour and carbon dioxide transmissions of cellulose-based edible films. **Food Chemistry**, Oxford, v.72, n.2, p. 231-236, 2001.

AYRANCI, E.; TUNE, S. A method of the measurement of the oxygen permeability and the development of edible films to reduce the rate of oxidative reactions in fresh foods. **Food Chemistry**, Oxford, v.80, n.2, p.423-431, 2003.

BALDWIN, A; NISPEROS, O.; HAGENMAIER, D.; BAKER, R.A Use of lipids in coatings for food products. **Food Technology** , Chicago, v.51, n.6, p.56-62, 1997.

BELL, A E Gel structure and food biopolymer. In: HARDMAN T. M. (ed): **Water and Food Quality**. London: Elsevier Applied Science, p.251-275, 1989.

BERTSCH, M; MAYBURD, A L.; KASSNER, R J. The identification of hydrophobic sites on the surface of proteins using absorption difference spectroscopy of bromophenol blue. **Analytical Biochemistry**, New York; 313, p. 187-195, 2003.

BIGI, A; BRACCI, B; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; ROVERI, N. Drawn gelatin films with improved mechanical properties. **Biomaterials**, Oxford, v.19, p.2335-2340, 1998.

BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K.; ROVERI, N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. **Biomaterials**, Oxford, v. 22, p. 763-768, 2001.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Lipídios. **Introdução à Química de Alimentos**. 3º ed. São Paulo: Varela. p.139-176, 2003.

BODMEIER, R.; PAERATAKUL, O .Plasticizer uptake by aqueous colloidal polymer dispersions used for the coating of solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam; v.152, p.17-26, 1997.

CALLEGARIN, F; GALLO, J-A Q; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A Lipids and Biopackaging. **Journal of American Oil Chemistry Society**, Champaign, v.74, n.10, p.1183-1192, 1997.

CARVALHO R.A. Desenvolvimento e caracterização de biofilmes a base de gelatina, **Tese de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de alimentos, Campinas, 1997.

CARVALHO, R. A. Elaboração e caracterização de filmes à base de gelatina modificada enzimática e quimicamente, **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de alimentos, Campinas, 2002.

CHEN, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.78, n.11, p.2563–2583, 1995.

CHERIAN, G.; GENNADIOS, A.; WELLER, C.; CHINACHOTI, P. Thermomechanical behavior of gluten films; effect of sucrose, glycerin and sorbitol. **Cereal Chemistry**, Sta. Paul, v.72, n.1, p.1-6, 1995.

CHITARRA, M. I. F., CHITARRA, A.B. **Pós-Colheita de frutas e hortaliças: Fisiologia e manuseio**. 1ª Ed., Lavras, p.320, 1990.

COLLARES, P.F. Desprendimento de filmes de pastas alimentícias durante secagem sobre superfície de sólidos e sua relação com transição vítrea., **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2001.

COSTA, A F. **Farmacognosia**. Vol I, Lisboa Fundação Calouste Gulbenkian, 4º Ed. p.840-841, 1988

CUQ, B. GONTARD, N.; GUILBERT, S. Proteins as agricultural polymers for packaging production. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.75, n.1, p.1-9, 1998.

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Edible film and coating as active layers, In: **Active Food Packaging**, London, Edr. M. L. Rooney, Blackie Academic & Professional, p.111-142, 1995.

CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Stability of myofibrillar protein-based biopackagings during storage. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technology**, London, v. 29, n.4, p. 344-348, 1996.

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J.-A; VOILLEY, A Edible Films and coatings: tomorrow 's packagings: a review. **Critical reviewa in Food Science and Technology**, Oxford, v.30, n.2, p.183-190, 1995.

DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A Methycellulose-based edible films and coating: 2. Mechanical and thermal properties as a function of plasticizer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.45, n.3, p.685-689, 1997.

DIAB,T; BILIADERIS, C.G.; GERASOPOULOS, D.; SFAKIOTAKIS, E. Physicochemical properties and application of pullulan edible films and coatings in fruit preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.81, p.988-1000, 2001.

DONHOWE, I. G; FENNEMA, O Edible films and coatings: characteristic, formation, definitions and testing methods. In: KROTCHA, J. M.; BALDWIN, E. A e NISPEROS-CARRIEDO, M. O. **Edible coating and films to improve food quality**, Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc., p 1-24, 1994.

FAIRLEY, P.; MONAHAN, F.J.; GERMAN, Interfacial interactions in edible emulsion films from whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.11, n.3, p.245-252, 1997.

FAIRLEY, P.; MONAHAN, F.J.; GERMAN, J.B; KROCHTA, J.M. Mechanical properties and water vapor permeability of edible films from whey protein isolate and sodium dodecyl sulfate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n.2, p. 438-443, 1996.

FAKHOURI, F. M. Coberturas comestíveis aplicadas na preservação de goiabas in natura (*Psidium guajava* L.), **Dissertação de mestrado.**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas,2002.

FAKIROV, S.; SARAC, Z.; ANBAR, T.; BOZ, B.; BAHAR, I.; EVSTATIER, M.; APOSTOLOV, A A.; MARK, J E; KLOCZKOWSKI, A Mechanical properties and transition temperatures of cross-linked orient gelatin: II Effect of orientation an water content on transition temperatures. **Colloid Polymer Science**, Berlin, v. 275, n.4, p.307-314, 1997.

FENNEMA, O R. (ED) **Food Chemistry**, 3 edition. New York: Marcel Dekker, Inc., p.1051, 1996.

FERRY, J D **Viscoelastic Properties of Polymers**, 3<sup>o</sup>ED., New York, John Wiley & Sons, p.641, 1980.

FRINGANT, C.; RINAUDO, M.; FORAY, M. F.; BARDET, M. Preparation of mixed esters of starch or use of an external palticizer: two different ways to change the properties of starch acetato film. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.35, p.97-109, 1998.

GALIETTA, G.; GIOIA, D. D.; GUILBERT, S.; CUQ, B. Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey protein as affect by plasticizer and crosslinking agents. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, p. 3123-3130, 1998.

GALLO, J-A Q.; DEBEAUFORT, F.; CALLEGARIN, F. e VOILLEY, A Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based films. **Journal of Membrane Science.**, Amsterdan, v.180, p.37-46, 2000.

GARCIA, M. A; MARTINO, M. N. , ZARITZKY, N. E. Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 65, n. 6, p.941-947, 2000.

GENNADIOS, A ; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F. Temperature effect on oxygen permeability of edible protein based film. **Journal of Food Science**, Chicago, v.58, n.1, p.: 212-219, 1993a.

GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; TESTIN, R.F. Modification of physical and barrier properties of edible wheat gluten-based films. **Cereal Chemistry**, Sta Paul v.70, n.4, p.426-429, 1993b.

GENNADIOS, A.; MCHUGH, T. H.; WELLER, C. L.; KROCHTA, J. M.. Edible coating and films based on proteins, in: **Edible Coatings and to Improve Food Quality**, KROCHTA J. M., BALDWIN E. A. & Nisperos-Carriedo M.O., Technomic Publishing Company, Ch 9, p. 201-277, 1994.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packing: Technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. **Boletim da SBCTA**, v.30, n.1, p. 3-15, 1996.

GONTARD, N. ; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Edible wheat gluten film: I. Influence of the main process variables on films properties of an edible using response surface methodology. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 57, n.1, p.:190-200, 1992.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticizer affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, Chicago, v.58, n. 1, p.206-211, 1993.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J-L.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat and lipids: water vapour permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.29, p.39-50, 1994.

GONTARD, N. , RING, S Edible wheat gluten film:influence of water content on glass transition temperature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washinington, v. 44, p. 3474-3478, 1996.

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

GREENSPAN, P. MAYER, E P; FOWLER, S Nile Red: A selective fluorescent stain dor intracellular lipid droplets. **The Journal of Cell Biology**, v.100, march, p. 965-973, p.1985.

GUILBERT, S. Technology and application of edible protective film. In: **Food Packaging and Preservation**, New York, Edr. M. Mathlouthi, Elsevier Applied Science Publishers, Ch 19, p.371-394, 1986.

GUILBERT, S.; CUQ, B.; GONTARD, N. Recent innovations in edible film and/or biodegradable packaging materials. **Food Additives and Contaminants**, London, v.14, n.6-7, p.741-751, 1997.

HALL, G. M. **Methods of Testing Protein Functionality**. London. Blackie Academic. & Professional, p.11-53, 1996.

HARDENBURG, R. E. Wax and related coatings for horticultural products. A bibliography. **Agriculture Research Service Bulletin** 51,15, United States Department of Agriculture, Washington, DC, 1997.

HUNTERLAB. The color management company. Universal software, version 3.2. Reston, 1997.

INCROPERA, F. P.; DEWITT, D.P. **Fundamentos de Transferência de Calor e de Massa**, Ed. Guanabara, p.437-738, 1992.

JANGCUHD, A ; CHINNAN, M S Properties of peanut protein film: sorption isotherm and plasticizer effect. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, London, v.32, n.1, p.89-94, 1999

JOHARI, G. P. Low-frequency molecular relaxations in disordered solids. **Journal Chemical Physics**, v. 82, p. 283-291, 1985.

JOHNSTON-BANKS, F. A. Gelatin, In: **Food Gels**, London, Peter Harris, Elsevier Applied Science, Ch 7, p.233-289, 1990.

KALICHEVSKY, M T; JAROSZKIEWWICZ, E M; BLANSHARD, J M V Glass transition of gluten:2. The effect of lipids and emulsifiers. **International Journal of Biological macromolecule**, v. 14, October, p. 267-273, 1992.

KAMPER, S. L., FENNEMA, O. Water vapor permeability of edible bilayer films. **Journal of Food Science**, Chicago, v.49:, p.1478-1481,1984a.

KAMPER, S. L., FENNEMA, O. Water vapor permeability of an edible, fatty acid bilayer film. **Journal of Food Science**, Chicago, v.49, : p.1482-1485, 1984b.

KESTER, J. J.; FENNEMA. O.R. Edible films and coatings: a review. **Food Technology**, Chicago, v.40, n.12, p.47-59, 1986.

KESTER, J. J., FENNEMA, O. Resistance of lipid films to oxygen transmission. **Journal of American Oil Chemistry Society**, Champaign,.v.66; p.1129-1138, 1989.

KIN, S-J; USTUNOL, T. Solubility and moisture sorption isotherms of whey-protein-based edible films as influenced by lipids and plasticizer incorporation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.49, n.9, p.4388-4391, 2001.

KINSELLA, J. E. Milk protein: physicochemical and functional properties. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.21, n.3, p.197-262, 1984.

KINSELA, J.E.; FOX, P.F. Water sorption by protein: milk and whey proteins. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton , v.5, n.2, p. 91-139, 1986.

KROCHTA, J. M. Edible protein films and coating. **Food Proteins and their Applications**. Damodaran, S. e Paraf, A. Ed., Marcel Dekker, Inc.; New York, p.529-549, 1997.

KROCHTA, J. M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, Chicago, v. 51, n, 2, p.60-74, 1997.

KOELSCH, C. M. Edible water vapor barrier: properties and promise. **Trends in Food Science & Technology**, London, v.51, n.5, p.76-81, 1994.

KOELSCH, C. M.; LAMBUZA, T.P. Functional, physical and morphological properties of methyl cellulose and fatty acid-based edible barriers. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologies**, London, v. 25, n.5, p. 404-411, 1992.

KUMAGAI, H.; SUGIYAMA, T. ; IWAMOTO, S. Effect of water content on dielectric relaxation of gelatin in glassy state. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washinington, v.48, p.2260-2265, 2000

LABUZA T. P.; CONTRERAS M. R. Prediction of moisture protection requirements for foods. **Cereal Foods World**, St. Paul, v.26, n.7, p.335, 1981.

LABUZA, T P; KANANE, A, CHEN, J Y; Effect of temperature on the moisture sorption and water activity shift of two dehydrated foods. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, n.4, p.385-391, 1986.

LAMPRECHT, A; SCHAFFER, U F; Lehr, C-M. Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: struture, capsule wall composition and encapsulation rate. **Europea Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.**, v.49, p.1-9, 2000.

LIN, S-Y; CHEN, K-S; RUN-CHU, L. Organic esters of plasticizers affecting the water absorption, adhesive property, glass transition temperature and plasticizer permanence of Eudragit acrylic films. **Journal of Controlled Release.**, Amsterdam, v.68, p.343-350, 2000.

LIN, L-T; MINE, Y; TUNG, M.A Barrier and tensile properties of transglutaminase cross-linked gelatin films as affected by relative humidity, temperature and glicerol content. **Journal of Food Science**, Chicago, v.64, n.4, p.616-622, 1999.

LIOUTAS, T. S.; BECHTEL, P. J.; STEINBERG, M. P. Desorption and adsorption isotherms of meat-salt mixture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.32, n. 6, p.1382-1385, 1988.

LOMAURO, C. J. ; BAKSHI, A. S; LABUZA, T P. Evaluation of food moisture sorption-isotherm equations. Part 1: fruit, vegetable and meat products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.18, n.2, p.11-117, 1985

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de Polímeros**. E-papers serviços editoriais, Rio de Janeiro, p.247-343, 2001.

MAIA, R.M.; BARBOSA, P. R.; CRUZ, F.G.; ROQUE, N. F.; FASCIO, M. Triterpenos da resina *Protium Heptaphyllum* MARCH (BURSERACEAE): Caracterização em misturas binárias. **Químca Nova**, São Paulo, v.23, n.5, p.623-626, 2000.

MARKLEY, K S. **Fatty acid** , New York, Interscience, Part 1-5, 1960-1968.

MARTIN-POLO, M.; MAUGUIN, C.; VOILLEY, A Hydrophobic films and their efficiency against moisture transfer. I. Influence of the preparation technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.40, n.3, p.407-412, 1992.

MARTIN-POLO, M.; VOILLEY, A ; BLOND, G.; COLAS, B.; MESNIER, M.; FLOQUET, N. Hydrophobic Films and their efficiency against moisture transfer. 2. Influence of the physical state. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.40, n.3, p. 413-418, 1992.

McHUGH, T. H. Effects of macromolecular interactions on the permeability of composite edible films. In PARRIS, N.; KATO, A; CREAMER, L. K.; PEARCE, J. **Macromolecular Interactions in Food Technology**, Washington: American Chemical Society, 1996.

McHUGH, T. H Protein-lipid interactions in edible films and coatings. **Nahrung**, Berlin, v. 44, n.3, p.148-151, 2000.

McHUGH, T. H.; KROCHTA Water vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. **Journal of American Oil Chemistry Society**. Champaign, v.71, n.3, p. 307-312, 1994a.

McHUGH, T. H.; KROCHTA, J.M. Sorbitol-vs Glycerol-Plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., Washington, v.42, n.4, p.841-845, 1994b.

McHUGH, T. H.; KROCHTA,. Milk-protein-based edible films and coatings **Food Technology**, Chicago, v.48, n.1, p. 97-108, 1994c.

MENCZED, J D; JAFFE, M; BESSEY, W. E. Films. **Thermal Characterization of Polymeric Materials**., 2° ed, vol. 2, Edith A Turi, San Diego, p.1979-1980, 1997

MONTERREY-QUINTERO, E. S. Caracterização Físico químicas de proteínas miofibrilares e elaboração de biofilmes. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, Pirassununga, 1998.

MORRISON, R. T. e BOYD, R. N. **Química Orgânica**, Fundação Calouste Gulbenkian, 8° ed., Lisboa, 1983.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A D. **Análise Térmica em Materiais**, São Paulo, 1°ed., editora, p. 113-201, 2002.

OTTERSTATTER, G. **Coloring of Food, Drugs and Cosmetics**. Ed. Marcel Dekker, New York, p.1, 1999.

PARK, H. J.; CHINNAN, M. S. Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.25, p.497-507, 1995.

PARK, J.M.; TESTIN, R.F.; PARK, H.J.; VERGANO, P.J.; WELLER, C. L. Fatty acid concentration effect on tensile strength, elongation, and water permeability of laminated edible films. **Journal of Food Science**, Chicago, v.59, n.4, p.916-919, 1994.

PARK, J.M.; TESTIN, R.F.; VERGANO, P.J.; PARK, H.J ; WELLER, C. L. Fatty acid distribution and its effect on oxygen permeability in laminated edible film. **Journal of Food Science**, Chicago, v.61, p. 401-406, 1996.

PÉREZ-GAG; KROCHTA, J.M. Denaturation time and temperature affects on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. **Journal of Food Science**, Chicago, v.66, n.5, p.705-710, 2001.

PÉREVAL, C.; DEBEAUFORT, F.; DESPRÉ, D.; VOILLEY, A Edible arabinoxylan-based films. 1.Effects of lipids types on water vapor permeability, film structure, and other physical characteristics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.50, p. 3977-3983, 2002.

PEREZ, J. Theories of liquid-glass transition. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.22, n.11, p.89-114, 1994.

PERNET, R. Phytochimie des Burseracees, **Lloydia**, Cincinnati, v.35, p.280-287, 1972.

PRIEBBENOW, R. Propriedades funcionais da gelatina. In: **Seminário de Uso e Aplicações da Gelatina na Indústria Alimentícia**. Leiner Davis Gelatin, 1995.

POMMET, M.; REDL, A ; MOREL, M-H; GUILBERT, S. Study of wheat plasticization with fatty acids. **Polymer**, v.44, p. 115-122, 2003.

POPPE, J. Gelatin, In: **Thickening and Gelling Agents for Food**, New York., Ed. Alan Imeson, Blackie Academic & Professional, Ch. 7, p 144-168, 1997.

RAMARAJ, B.; RAJALINGAM, P.; RADHAKRISHMAN, G. Crosslinked latex blends based on gelatin: synthetisis, morphology, thermal and mechanical properties. **Journal of Applied Science**, v. 43, p.23-28, 1991.

RAMOS, M F S, SINAI, A C ; TAPPIN, M R R; GUIMARÃES, A C ; RIBEIRO, J E L, Essential oils from oleoresins of *Protium* spp. Of Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, v.150, p.383-387, 2000.

RHIM, J.W.; WU, Y.; WELLER, C. L.; SCHINEPF, M. Physical characteristics of a composite film of soy protein isolate and propyleneglycol alginate. **Journal of Food Science**, Chicago, v.64, n.1. p. 149-152, 1999.

ROGERS, C E Permeation of gases and vapors in polymer. In: **Polymer Permeability**. J. comyn, ed. Elsevier Applied Science: London, p.11-73, 1985.

ROOS, YRJO. **Reaction Kinetics**. Phase Transitions in foods. Academic Press, San Diego, California, p.271-312, 1995.

RIZVI, S. S. H. Thermodynamic properties of food in desydratation. In: RAO, M. A; RIZVI, S.S. **Engineering Properties of Foods**, New York: Marcel Dekker Inc., p. 265-279, 1995.

SACKETT, D. L; WOLF, J. Nile Red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surface. **Analytical Biochemistry**, New York, 167, p.228-234, 1987.

SAKANAKA, L. S. Estudo das condições de armazenamento sobre as propriedades mecânicas e de barreira de filmes de gelatina reticulada. **Dissertação de Mestrado**., Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de alimentos, Campinas, 2002.

SARI, A; KAYGUSUZ. Some fatty acids used for latent heat storage: thermal stability and corrosion of metals with respect to thermal cycling. **Renewable Energy**, London, v. 28, p. 939-948, 2003.

SARMENTO, A L.S.C. Elaboração e caracterização de biofilmes a partir de gelatina reticulada. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de alimentos, Campinas, 1999.

- SCHREIBER, A B; HAIMOVICH, J. Quantitative fluorometric assay for detection and characterization of Fc receptors. **Method Enzymological**, v.93, p. 147-155, 1983.
- SGARBIERI, V. **Proteínas em Alimentos Proteicos: Propriedades, Degradação e Modificação**. São Paulo, Ed. Varela, p. 517, 1996.
- SHELLHAMMER, T. H.; KROCHTA, J. M. Whey protein emulsion performance as affected by lipid type and amount. **Journal of Food Science**, Chicago, v.62, n.2, p.390-398, 1997)
- SHERWIN, C. P.; SMITH, D.E.; FULCHER, G. Effect of fatty acid type on dispersed phase particle size distribution in emulsion films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., Washington, v.46, n.11, p.4534-4538, 1998.
- SHIH, F.F. Edible Films from rice protein concentrate and pullulan. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.73, n.3, p.406-409, 1996.
- SILVA, J. R. A Óleo-resinas de dez espécies do gênero *Protium* **Tese de Mestrado**. Universidade do Amazonas, Manaus, 1995.
- SIMÕES, C M O; SPITZER, V. Óleos voláteis. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Editora Universidade/UFSC, Porto alegre, p.389, 1999.
- SMAILI, S. S Microscopia de fluorescencia um novo jeito de olhar as células. **Ciência Hoje**, São Paulo, Abril, p.67-69, 2001.
- SOBRAL, P. J.A Diffusivité de l' eau dans le gel polyacrylamide-eau autour de la transition vitreuse. **Tese de Doutorado**, Inpl, Nancy, França, 1992.
- SOBRAL, P. J. A. Propriedades funcionais de gelatina em função da espessura. **Ciência e Engenharia (Science and Engineering Journal)**, Uberlandia, v.8; n.1; p.60-67, 1999.

SOBRAL, P J A Proteínas de origem animal na tecnologia de biofilmes **Tese de Livre Docência**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de São Paulo, 2000.

SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C.; HUBINGER, M. D e ROQUES, M. A Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.15, p.423-432, 2001

SOBRAL, P. J. A. ; MENEGALLI, F. C.; CARVALHO, R.A.; SOUZA, S.M.A; MONTERREY, E.S. Elaboração de filmes de proteína para uso como impermeabilizante ou embalagem flexível. **Seminário Internacional- Tópicos Especiais em Ciências e Tecnologia de Alimentos**. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 1997, p. 95-104.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizer effect on oxygen permeability of  $\beta$  lactoglobulina films. **Journal of Agricultural and. Food Chemistry**., Washington, v.48, n.12, p.:6298-6302, 2000.

SOUZA, S. M. A Elaboração e caracterização de filmes comestíveis biodegradáveis a base de proteínas miofibrilares de origem bovina. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de alimentos, Campinas, 2001.

SUSUNAGA, G. S. Estudo químico e biológico da resina produzida pela espécie *Protium heptaphyllum* March (BURSERACEAE), **Tese de Mestrado**. Universidade do Amazonas, Manaus, 1996.

UNICHEMA INTERNACIONAL. **Fatty Acid Data Book**, 2º edição, p.42, Federal Republic of Germany, October 1987.

VRENTAS, J S; DUDA, J L A free volume interpretation of the influence of glass transition on diffusion in amorphous polymer. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v.22, p. 2325-2339, 1978.

XIAO, C.; LU, Y.; GAO, S.; ZHANG, L. Characterization of Konjac glucomannan-Gelatin blend films. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v.49, p.1596-1602, 2001.

WATT, I. C. The theory of water sorption by biological materials. In: JOWITT, R; ESCHER, F.; HALLSTON, B; MEFFERT, H F T; SPISSSES, W E L; VOS, G **Physical Properties of Foods**, England: applied Science Publishers, 1983.

WERTZ, D. H.; SCHERAGA, H. A Influence of water on protein structure. An analysis of the preferences of amino acid residues for the inside or outside and for specific conformations in a protein molecule. **Journal of Biological Macromolecules**, v.11, n.1, p.9-15, 1978.

WILLES, J L; VERGANO, P.J.; BARRON, E H; BUNN, J M; TESTIN, R F Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films **Journal of Food Science**, Chicago, v.65, n.5, p.1175-1179, 2000.

WONG, D. W. S; GASTINEAU, F. A; GREGORSKI, S. S.; TILLIN, S. J; PAVLATH, A E. Chitosan-lipid films: microstructure and surface energy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v.40, p.540-544, 1992.

YANG, L. PAULSON, A T. Mechanical and water barriers properties of edible gellan film. **Food Research International**, Amsterdan, v.33, n.7, p.563-570, 2000a.

YANG, L. PAULSON, A T. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. **Food Research International**, Amsterdan, v.33, n. 7, p. 571-578, 2000b.

YOSHIDA, C. M. P. Aplicação de concentrado proteico de soro de leite bovino na elaboração de filmes comestíveis **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2002.

ZOGHBI, M G B, MAIA, J G S, LUZ, A I R. Volatile constituents from leaves and stems of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v.7, p. 541-543, p.1995.

## ANEXO I

### Caracterização do breu branco

O breu utilizado neste trabalho foi da espécie *Protium altsonii*, coletada na Reserva Biológica Duke, a 21 Km de Manaus, em maio de 1997. A planta foi identificada pelo botânico J. E. S. Ribeiro, do Instituto de Pesquisa da Amazônia (INPA).

A resina bruta foi submetida ao processo de arraste a vapor durante 2 horas, quando a parte fixa foi separada da fração volátil. A fração fixa foi então dissolvida em clorofórmio, filtrada e evaporada para resultar em um sólido branco, que foi então utilizado diretamente na confecção dos filmes após trituração.

A utilização de cromatografia gasosa de alta eficiência na detecção de constituintes químicos em amostras complexas, aromas, amostras gasosas e misturas contendo substâncias voláteis é alicerçada no seu alto poder de resolução, alta sensibilidade na detecção de substâncias em quantidades de traços. Amostras contendo substâncias que possuam similaridade ou proximidade quanto às suas características físico-químicas, como por exemplo os terpenos, podem apresentar sobreposição de picos no cromatograma, indicando uma resolução cromatográfica insatisfatória. Isso pode ser superado mediante observação de determinadas condições cromatográficas, como a seleção da coluna (SILVA, 1995).

Para identificação dos constituintes presentes no breu foi utilizado cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 6890N, acoplado ao espectrômetro de massas Modelo 5973, com injetor tipo split/splitless (200°C) e divisão de vazão de 1:20. Foi utilizada uma coluna capilar HP-5 (30m X 0,25 mm X 0,25 µm de espessura do filme) e detector por impacto de elétrons (290°C), foi utilizando hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 ml/min. Volume de injeção de 1,0 µl de uma solução de 2ml da amostra (metilada) em 500 µl de diclorometano. Temperatura inicial de 150°C, 5 minutos de isoterma, seguida de taxa de aquecimento de 5°C/min até 290°C, mantida por mais 30 minutos.

A análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas apontou a presença de 5 principais componentes no breu branco utilizado, onde a mistura de  $\alpha$  e  $\beta$  amirina perfazem 65% do total da mistura. A análise espectroscópica por ressonância Magnética de Carbono 13 confirmou a presença da mistura, e indicou outros três componentes como sendo ácidos derivados do lanosterol, similarmente aos resultados descritos para a espécie *Protium heptaphyllum* (MAIA et al., 2000).

**Tabela 166.** Porcentagens dos constituintes da fração fixa do breu, com base nas áreas relativas dos picos correspondentes, no cromatograma, assim como os sinais diagnósticos do espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN- $^{13}\text{C}$ ):

| Tempo de retenção | Componentes (Massa Molecular) | % na mistura | Picos diagnósticos no RMN- $^{13}\text{C}$ (ppm) |
|-------------------|-------------------------------|--------------|--|
| 38,03 minutos     | $\beta$ amirina (426)         | 22,0         | 145,19 e 121,81                                  |
| 39,07 minutos     | $\alpha$ amirina (426)        | 43,1         | 139,64 e 124,580                                 |
| 41,19 minutos     | Ácido esteroidal A (468) *    | 10,8         | 181,38; 134,42; 133,01; 132,82 e 132,00          |
| 41,69 minutos     | Ácido esteroidal B (470) *    | 14,1         | 181,75; 145,72; 132,07; 123,72 e 118,24          |
| 44,20 minutos     | Ácido esteroidal C (470)*     | 9,85         | **   |

\* Analisados com éster metílico, após tratamento da amostra com diazometano. Para sugestão da estrutura, vide referência Maia et al., 2000. \*\* Sinais abaixo do limite de detecção na concentração da amostra utilizada e do número de acumulações usados para obtenção do espectro. A sugestão da estrutura do ácido esteroidal C está baseada apenas na análise do padrão de fragmentação no CG-EM.

Data File : C:\MSDCHEM\1\DATA\MS0642.D  
Acq On : 24 Jul 2002 17:08  
Sample : Breu /Larissa  
Misc : HP-5

Vial: 90  
Operator: Marce  
Inst : Inst  
Multiplr: 1.00  
Sample Amount: 0.00

MS Integration Params: autoint1.e  
Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\OE.M (Chemstation Integrator)  
Title :

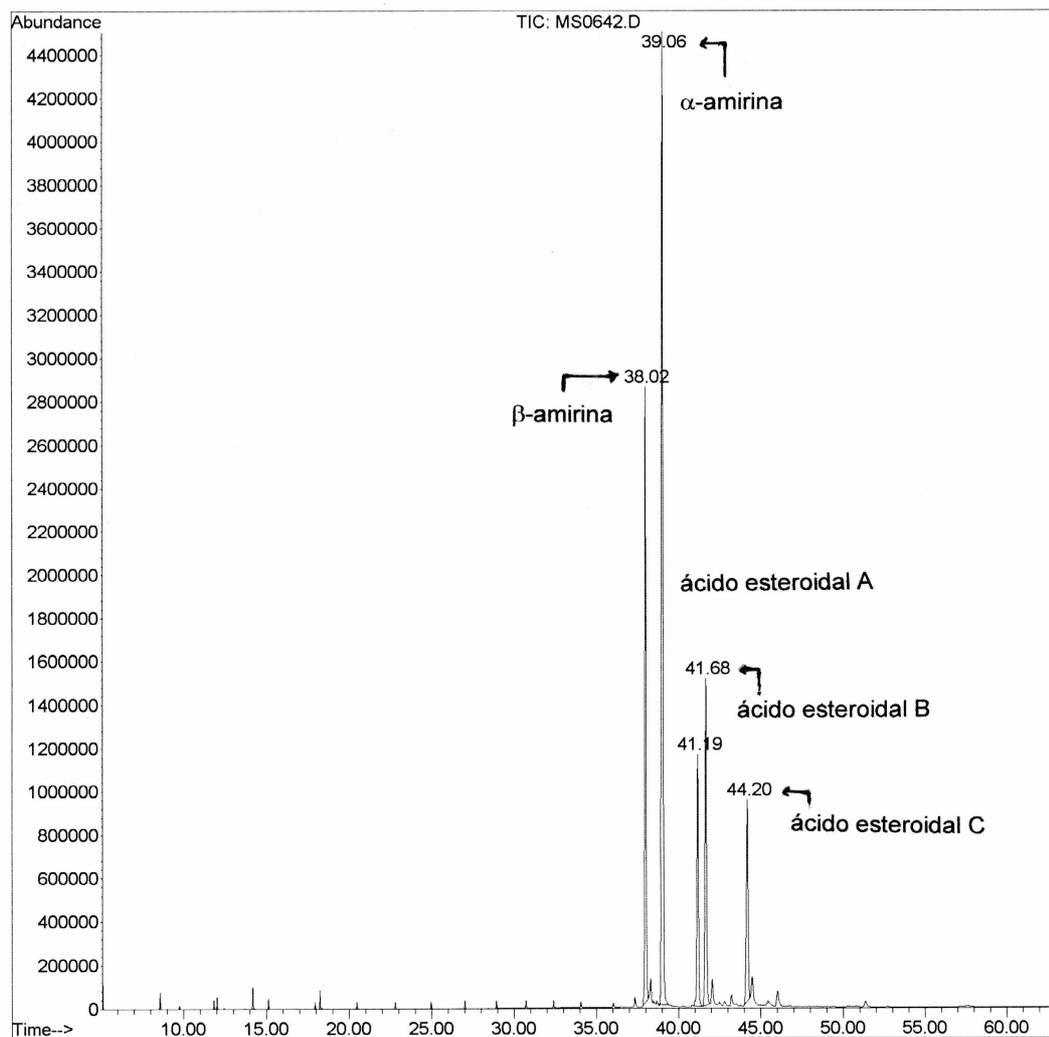


Figura 42. Cromatograma do breu branco.

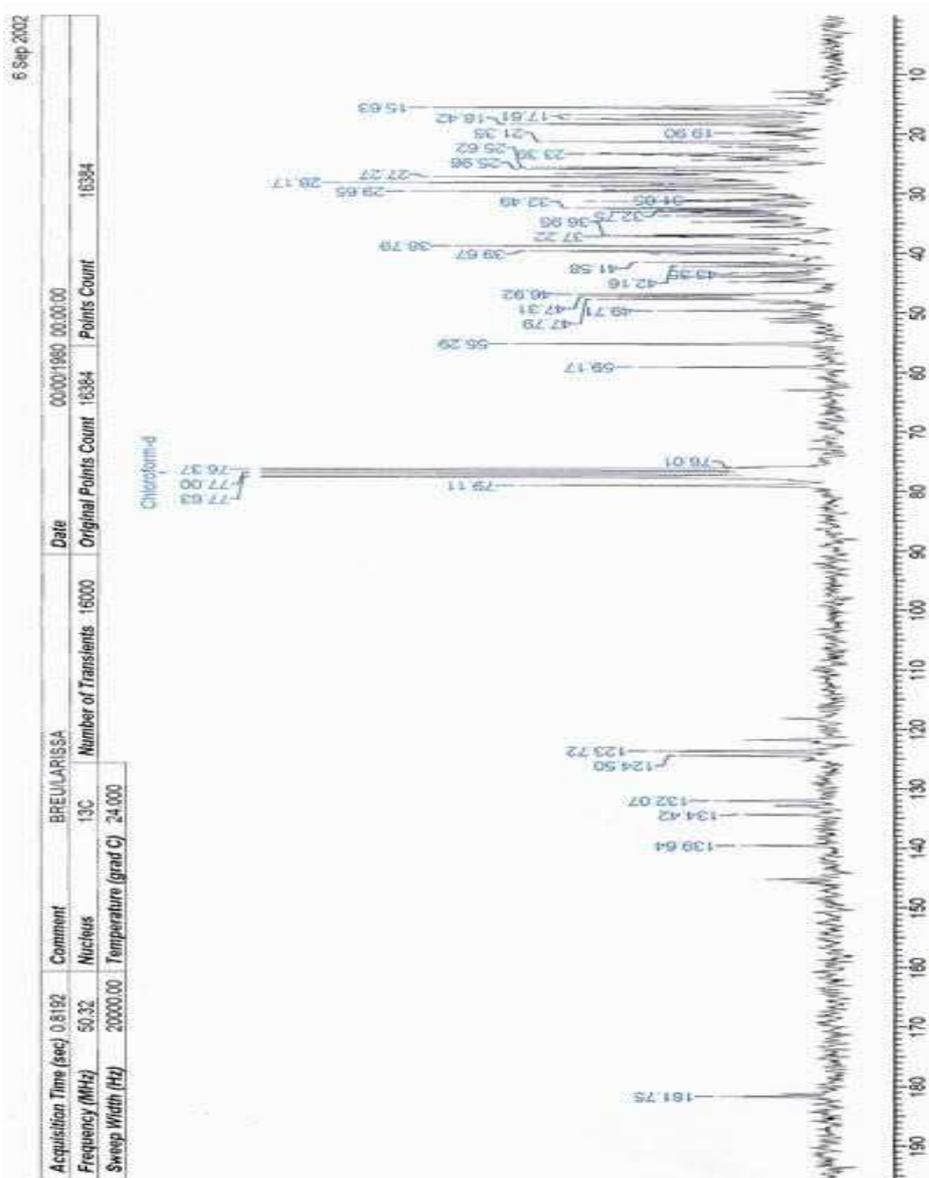


Figura 43. Espectro completo breu branco.

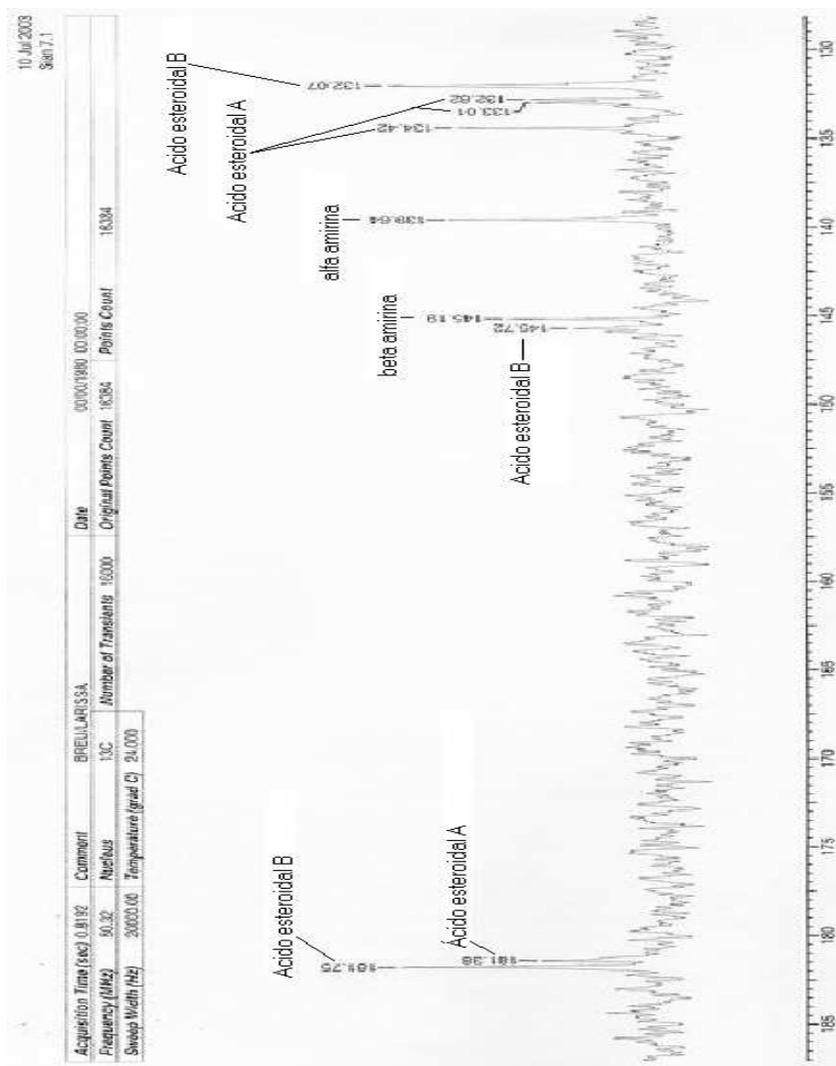


Figura 44. Expansão do espectro na região 185-130 ppm.

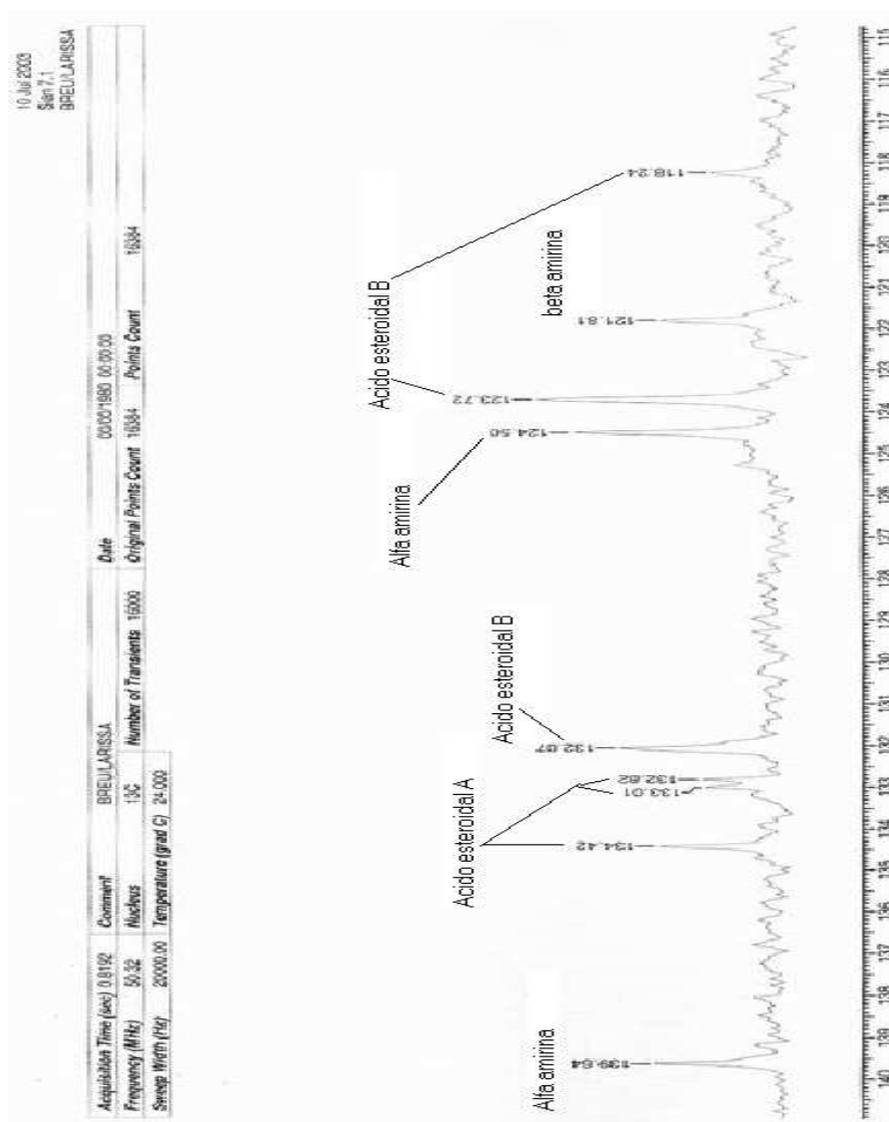
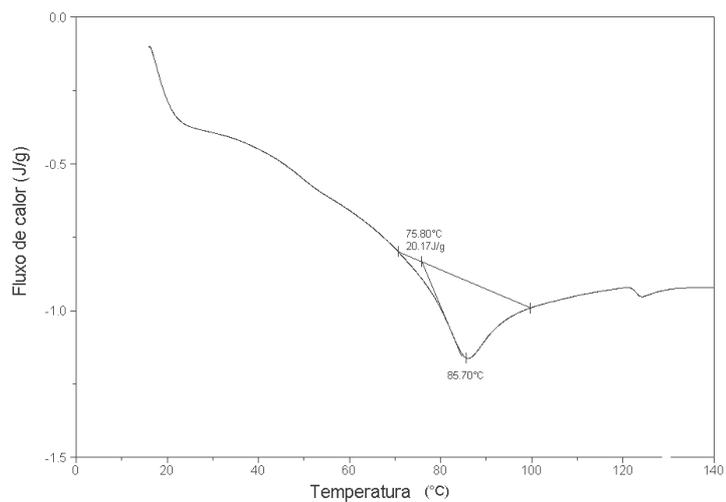


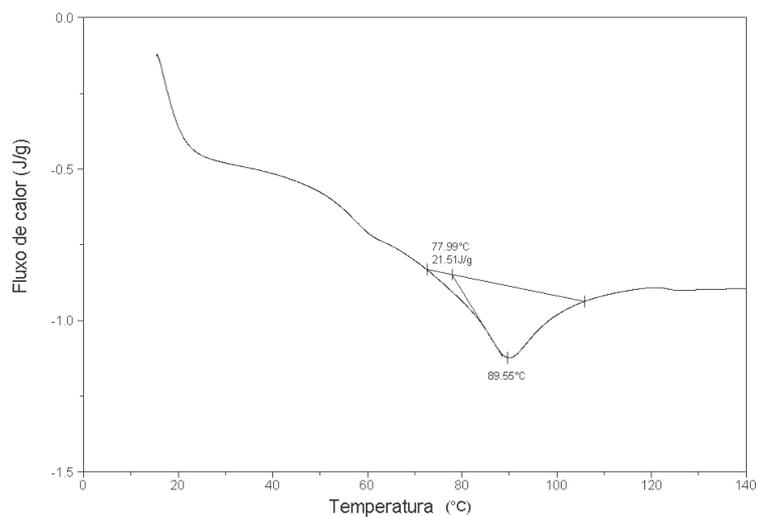
Figura 45. Expansão do espectro na região 140-115 ppm.

ANEXO II

Calorimetria diferencial de varredura dos filmes individuais

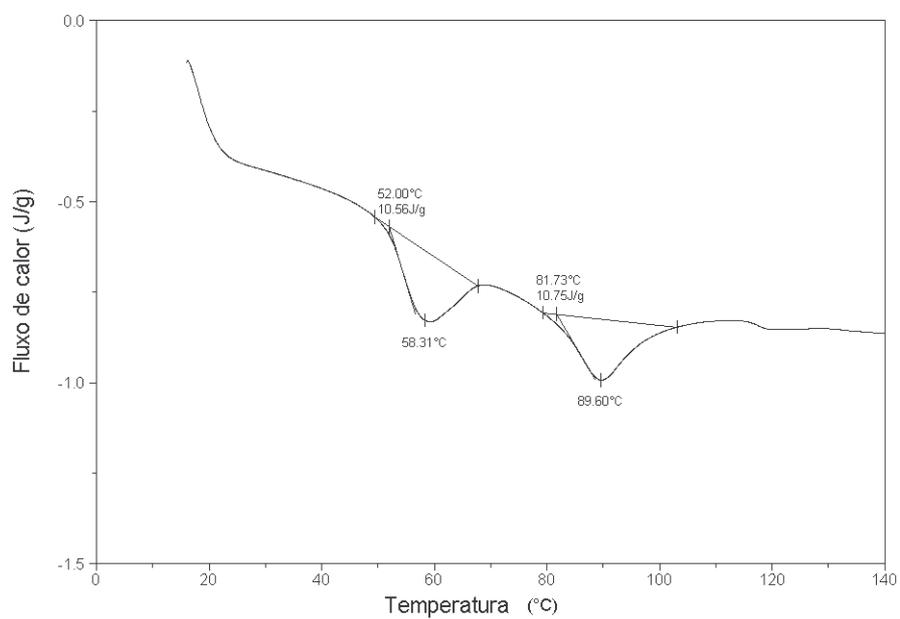


A

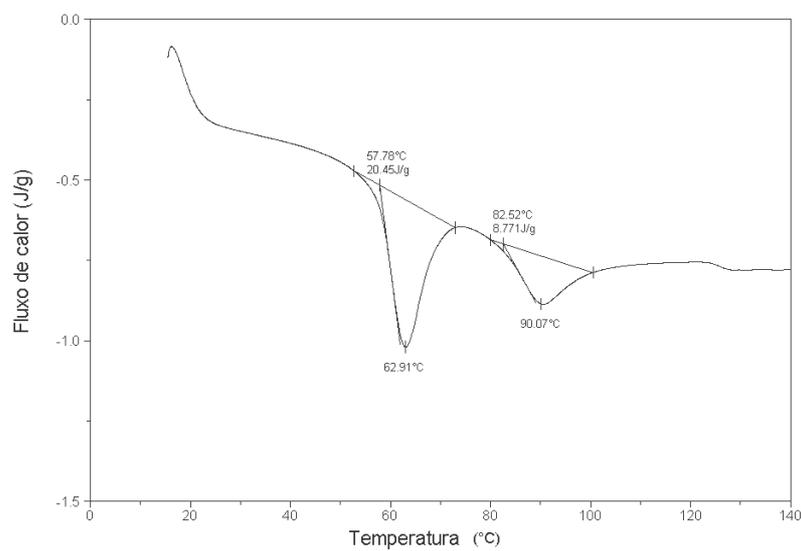


B

Figura 46. Termograma de DSC dos filmes de (A) gelatina e (B) gelatina e triacetina.

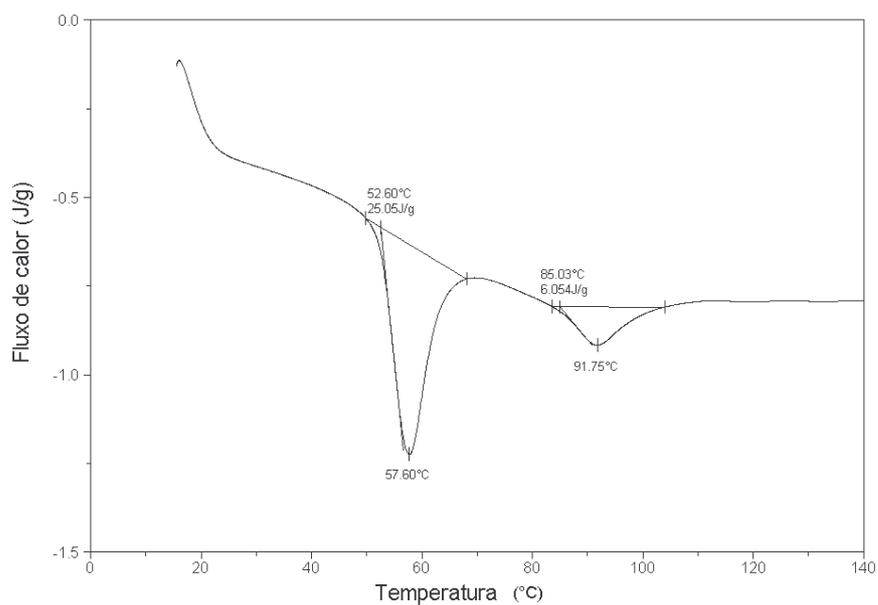


A

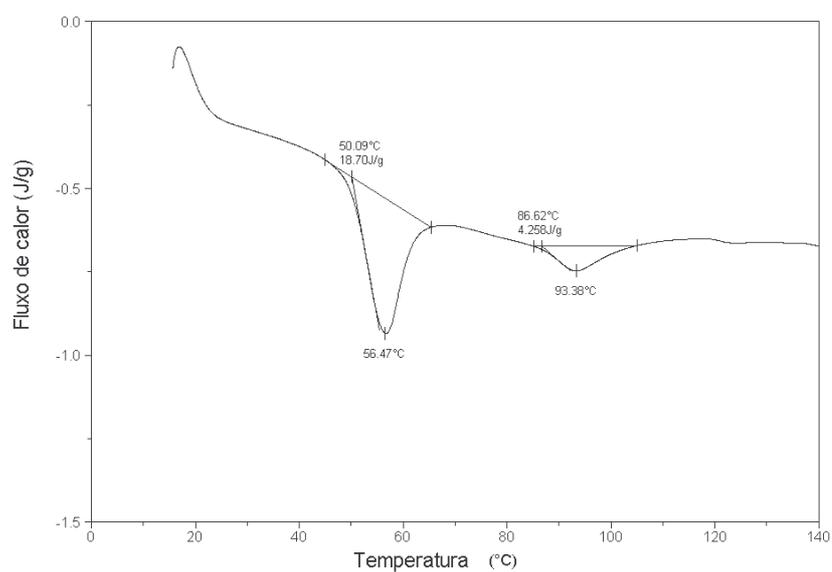


B

**Figura 47.** Termograma de DSC dos filmes de (A) gelatina/triacetina/ácido esteárico e (B) gelatina/triacetina/ácido palmítico.

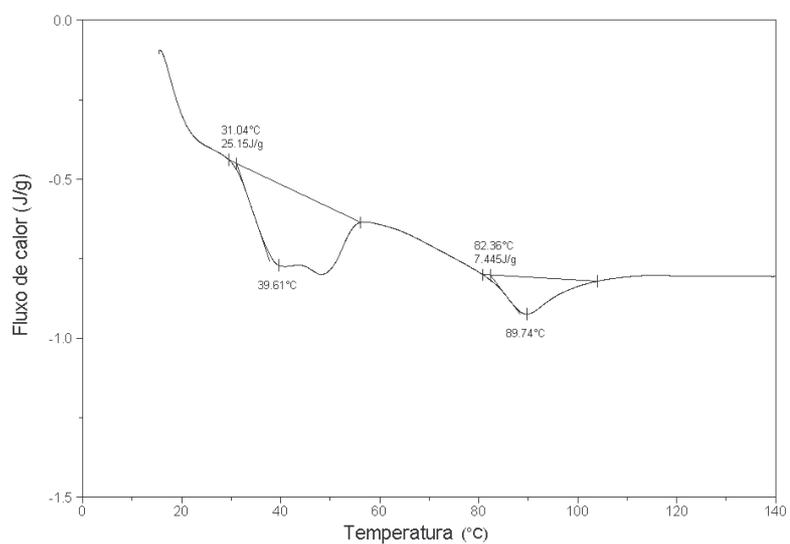


A

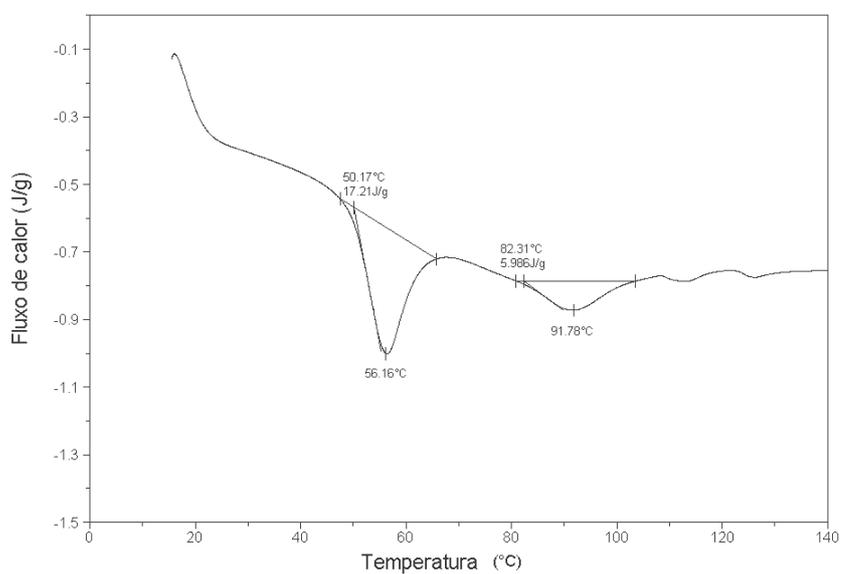


B

**Figura 48.** Termogramas de DSC dos filmes (A) gelatina/triacetina/blenda esteárico-palmítico e (B) gelatina/triacetina/blenda esteárico-palmítico/ácido láurico 1%.

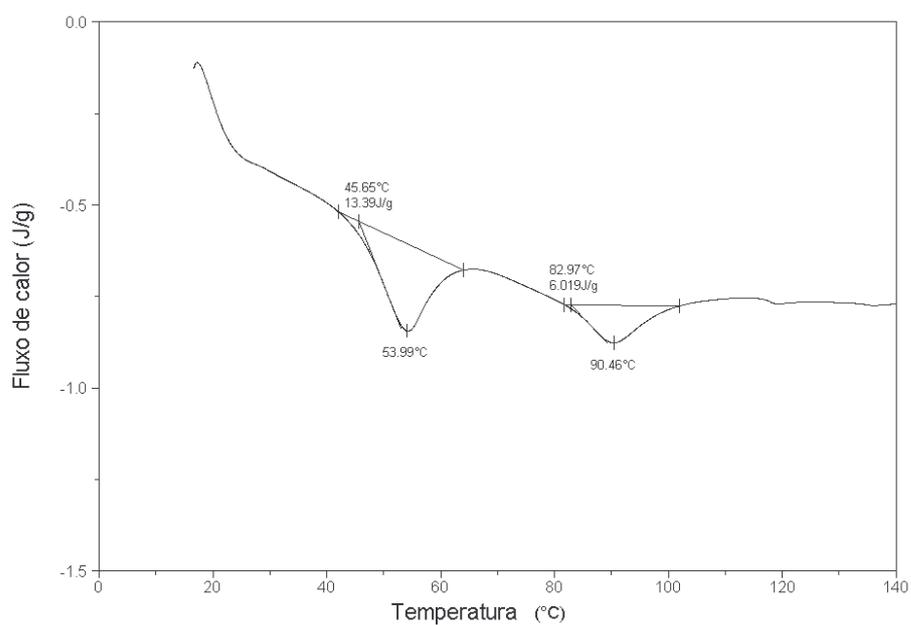


**A**



**B**

**Figura 49.** Termogramas de DSC dos filmes de (A) gelatina/triacetina/blenda esteárico-palmítico/ácido láurico 10% e (B) gelatina/triacetina/blenda ácido esteárico-palmítico/breu branco 1%.



**Figura 50.** Termograma de DSC do filme de gelatina/triacetina/blenda esteárico-palmítico/breu branco 10%.