



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



**Desenvolvimento e Caracterização de Biofilmes à base de
Gelatina, Triacetina, Ácido esteárico ou Ácido capróico e
Surfactantes.**

TACIANA DAVANÇO
Nutricionista

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 - 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

D271d Davanço, Taciana
Desenvolvimento e caracterização de biofilmes à base de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou ácido capróico e surfactantes / Taciana Davanço. – Campinas, SP: [s.n.], 2006.

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

1. Biofilme. 2. Gelatina. 3. Triacetina. 4. Ácido capróico. 5. Ácido esteárico. 6. Lauril sulfato de sódio. 7. Tween 80. I. Grosso, Carlos Raimundo Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.
(ckn/fea)

Título em inglês: Development and characterization of biofilms based on gelatin, triacetin, stearic or caproic acid and surfactants

Palavras-chave em inglês (Keywords): Edible film, Gelatin, Triacetin, Caproic acid, Stearic acid, Sodium lauryl sulphate, Tween 80

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Área de concentração: Nutrição Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Patrícia Sayuri Tanada Palmu
Rosemary Aparecida de Carvalho
Florência Menegalli

BANCA EXAMINADORA

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

Dra. Patrícia Sayuri Tanada Palmu
Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP
(membro)

Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP
(membro)

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

"E assim, depois de muito esperar, num dia como outro qualquer, decidi triunfar...
Decidi não esperar as oportunidades, e sim, eu mesmo buscá-las.
Decidi ver cada problema como uma oportunidade de encontrar uma solução.
Decidi ver cada deserto como uma possibilidade de encontrar um oásis.
Decidi ver cada noite como um mistério a resolver.
Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz.
Naquele dia, descobri que meu único rival não era mais que minhas próprias limitações,
e que enfrentá-las era a única e melhor forma de superá-las.
Naquele dia, descobri que eu não era o melhor e que talvez eu nunca tenha sido.
Deixei de me importar com quem ganha ou perde; agora, me importa simplesmente
saber melhor o que fazer.
Aprendi que o difícil não é chegar lá em cima, e sim, deixar de subir.
Aprendi que o melhor triunfo que posso ter, é ter o direito de chamar a alguém de
"Amigo".
Descobri que o amor é mais que um simples estado de enamoramento,
"o amor é uma filosofia de vida".
Naquele dia, deixei de ser um reflexo dos meus escassos triunfos passados e passei a
ser a minha própria tênue luz deste presente.
Aprendi que de nada serve ser luz se não vai iluminar o caminho dos demais.
Naquele dia, decidi trocar tantas coisas...
Naquele dia, aprendi que os sonhos são somente para fazer-se realidade.
E desde aquele dia já não durmo para descansar...
Agora simplesmente durmo para sonhar.

(Walt Disney)

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Gercino Davanço e Diomar, que nunca mediram esforços para que eu sempre conseguisse alcançar meus objetivos. O amor e admiração que tenho por eles é infinita, pelos exemplos, educação, dedicação, carinho e apoio que recebi em todos os momentos da minha vida.

"O amor resume inteiramente a doutrina de Jesus, porque é o sentimento por excelência, e os sentimentos são os instintos elevados a altura do progresso realizado. No seu início, o homem não tem senão instintos; mais avançado e corrompido, só tem sensações; mais instruído e purificado, tem sentimentos; e o ponto delicado do sentimento é o amor, não o amor no sentido vulgar do termo, mas este Sol interior que condensa e reúne em seu foco ardente todas as aspirações e todas as revelações sobre-humanas. A lei de amor substitui a personalidade pela fusão dos seres e aniquila as misérias sociais. Feliz aquele que, ultrapassando sua humanidade, ama com amplo amor seus irmãos em dores! Feliz aquele que ama, porque não conhece nem a angústia da alma, nem a miséria do corpo; seus pés são leves, e vive como que transportado para fora de si mesmo. Quando Jesus pronunciou esta palavra divina - amor - , ela fez estremecer os povos, e os mártires, ébrios de esperança, desceram ao circo."

(O Evangelho segundo o Espiritismo - Allan kardec)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar saúde e força, para que eu concluísse esta obra, estando presente em todos os dias de minha vida.

.Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso, pelo carinho, atenção e dedicação dada a mim e a este trabalho.

A banca examinadora, composta pelas professoras: Florência Cecília Menegalli, Patrícia Tanada-Palmu e Rosemary Aparecida de carvalho pelo auxílio e atenção, dado ao meu trabalho e a mim.

A todos do Laboratório de Controle de Qualidade: Renata, Gustavo, Karina, Juliana, Ana Sílvia, Andréa, Noemi, Izabela pela amizade, pela ajuda na parte prática e também por tornar o ambiente de trabalho um lugar bem agradável. As estagiárias Gabriela e Helô pela compreensão e amizade.

A todos os funcionários do DEPAN: Fátima, Suzana, Cidinha, Sônia, Chico, Eliana, Dona Nice, Carla, Lia e Adriana, pela amizade e colaboração.

Ao meus colegas do DEPAN: Susi, Vera, Karina, Noemi, Fábio, Lucia, Paulo Sérgio, Cristina, Duda, Marisa, Andréia, Luciano, Cláudia, Sibelen, Lílian, Adrianinha, Fabiane, Janesca, Maria Inês, Pablo, Giovana, Vitor entre outros, pelos momentos de descontração.

A querida Izabela, por toda sua colaboração e atenção comigo e com o meu trabalho, a paciência e amizade ...Obrigada por tudo!!!!!!!

As minhas amigas Susi e a Lucia, que sempre estiveram do meu lado quando eu precisava de um conselho e de uma ajuda...

Ao meu querido amigo Victor, que sempre me socorria quando eu precisava...Muito obrigada!!!

A minha grande AMIGA Noemi, pessoa maravilhosa que entrou na minha vida e espero que continue sempre presente...Como é bom ter você por perto!!!!Muito obrigada por sua amizade, por seus conselhos e por me entender e me escutar....Só você mesmo, me entende!!!!!!!

A minha parceira Renatinha....Que esteve presente em minha vida desde que comecei tudo aqui...tanto no trabalho...como na vida pessoal...AMIGA...Muito obrigado por tudo...

As minhas companheiras de república Renata, Silvana, Fabiane, Aline e Alyne pela amizade e pelo companherismo.

A galerinha dos gaúchos, Claudinha, Camila, Cedenir, Roger, Regina, Giovanna, Andréia, Fábio, e ao churrasqueiro responsável Rodrigo.

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

As queridas amigas Nádia e Helaine, pela atenção, pelo carinho e amizade prestada a mim....

A minha tia Neusa, que sempre me apoiou nesta etapa da minha vida e nunca deixou que nada faltasse para mim...

Aos meus queridos amigos Roulien e Bruno os “amores da minha vida”, pelos conselhos, confiança e ótimos momentos de descontração, principalmente quando eu estava sem lar. Que nossa amizade continue grandiosa e tão valiosa quanto o passar dos anos de um belo vinho...

Ao Conselho nacional de Pesquisa Científica (CNPQ), pela concessão da bolsa de estudos.

Obrigada.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	XV
ÍNDICE DE FIGURAS	XVII
RESUMO	XXIII
ABSTRACT	XXV
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVO GERAL	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 BIOFILMES	5
2.2 FILMES EMULSIONADOS.....	7
2.3 GELATINA	9
2.4 ÁCIDOS GRAXOS.....	10
2.5 SURFACTANTES.....	12
2.5.1 <i>Classificação dos surfactantes:</i>	13
2.5.2 <i>Formação de micela:</i>	14
2.5.3 <i>Sistema HLB</i>	15
2.5.4 <i>Dodecil Sulfato de sódio (HLB=40)</i>	16
2.5.5 <i>Tween 80 (Monooleato de sorbitan Etoxilado (HLB=15))</i>	17
2.6 CARACTERÍSTICAS DOS FILMES.....	20
2.6.1 <i>Espessura</i>	20
2.6.2 <i>Textura/ Aparência</i>	20
2.6.3 <i>Sabor e aroma</i>	20
2.6.4 <i>Cor e opacidade</i>	21
2.7 PROPRIEDADES MECÂNICAS E DE BARREIRA DOS BIOFILMES	22
2.7.1 <i>Propriedades de barreira</i>	22
2.7.2 <i>Propriedades mecânicas</i>	24
2.7.3 <i>Solubilidade em água</i>	26
2.7.4 <i>Isotermas de sorção</i>	27

2.7.5	<i>Calorimetria diferencial de varredura (DSC)</i>	28
2.7.6	<i>Microscopia confocal de varredura a laser</i>	29
3.	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	MATERIAL.....	31
3.2	ENSAIOS PRELIMINARES.....	31
3.3	ELABORAÇÃO DOS FILMES.....	33
3.3.1	<i>Elaboração dos filmes a base de gelatina e triacetina sem e com ajuste de pH</i> 33	
3.3.2	<i>Elaboração dos filmes a base de gelatina, triacetina e ácido esteárico sem e com o ajuste de pH</i>	34
3.3.3	<i>Elaboração dos filmes a base de gelatina, triacetina e ácido capróico sem e com o ajuste de pH</i>	34
3.3.4	<i>Elaboração dos filmes de gelatina, triacetina, lauril sulfato de sódio e ácido esteárico sem e com o ajuste de pH</i>	34
3.3.5	<i>Elaboração dos filmes de gelatina, triacetina, ácido esteárico e Tween 80 com ajuste de pH</i>	35
3.3.6	<i>Elaboração dos filmes de gelatina, triacetina, ácido esteárico e misturas de lauril sulfato de sódio e Tween 80</i>	35
3.3.7	<i>Elaboração dos filmes de gelatina, triacetina, ácido capróico e mistura de lauril sulfato de sódio e Tween 80</i>	35
3.3.8	<i>Elaboração dos filmes de gelatina, triacetina, ácido capróico e mistura de lauril sulfato de sódio e Tween 80 com ajuste de pH</i>	36
3.4	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES.....	39
3.4.1	<i>Aspecto visual</i>	39
3.4.2	<i>Espessura</i>	40
3.5	PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA.....	40
3.6	SOLUBILIDADE EM ÁGUA.....	41
3.7	PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	41
3.8	OPACIDADE.....	42
3.9	MICROSCOPIA ÓTICA.....	43
3.10	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	43

3.11	MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (MCLV).....	44
3.12	ISOTERMAS DE SORÇÃO	45
3.13	CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC).....	46
3.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	ENSAIOS PRELIMINARES PARA A DEFINIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTANTES E SUAS MISTURAS	47
4.2	ASPECTO VISUAL DOS FILMES	52
4.3	ESPESSURA DOS FILMES	52
4.4	PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA.....	52
4.5	SOLUBILIDADE.....	60
4.6	PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	65
4.7	OPACIDADE.....	75
4.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	81
4.9	ISOTERMA DE SORÇÃO	99
4.10	CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)	105
5.	CONCLUSÕES GERAIS	113
6.	SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	115
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
ANEXO	161

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. FÓRMULA QUÍMICA E FONTES DE ÁCIDO CAPRÓICO E ÁCIDO ESTEÁRICO.	11
TABELA 2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS DO TWEEN 80.....	19
TABELA 3. ATIVIDADE DE ÁGUA DAS SOLUÇÕES SALINAS SATURADAS A 25°C	45
TABELA 4. PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA, PARA FILMES BÁSICOS PRODUZIDOS COM GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDOS ESTEÁRICO OU CAPRÓICO COM E SEM O AJUSTE DE PH.....	53
TABELA 5. PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDO CAPRÓICO COM ADIÇÃO DE SURFACTANTES.....	55
TABELA 6. PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDO ESTEÁRICO.....	57
TABELA 7. PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA DOS FILMES DE GELATINA E SURFACTANTES (SDS E TWEEN).....	58
TABELA 8. PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA E SURFACTANTES (SDS E TWEEN).....	59
TABELA 9. SOLUBILIDADE E UMIDADE DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDOS ESTEÁRICO, ÁCIDO CAPRÓICO COM E SEM O AJUSTE DE PH.....	60
TABELA 10. SOLUBILIDADE E UMIDADE DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO ESTEÁRICO E SURFACTANTE (SDS E TWEEN 80).....	62
TABELA 11. SOLUBILIDADE E UMIDADE DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO CAPRÓICO E SURFACTANTE (SDS E TWEEN 80).....	63
TABELA 12. SOLUBILIDADE E UMIDADE DOS FILMES DE GELATINA E SURFACTANTES (SDS E TWEEN).....	64
TABELA 13. SOLUBILIDADE E UMIDADE DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETIANA E SURFACTANTES (SDS E TWEEN).....	65

TABELA 14. TENSÃO NA RUPTURA E ELONGAÇÃO DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDOS ESTEÁRICO E CAPRÓICO (FILMES BÁSICOS).....	66
TABELA 15. RESISTÊNCIA MECÂNICA DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETIANA E ÁCIDO CAPRÓICO.....	68
TABELA 16. RESISTÊNCIA MECÂNICA DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDOS ESTEÁRICO E SURFACTANTE (SDS E TWEEN 80).....	70
TABELA 17. RESISTÊNCIA MECÂNICA DOS FILMES DE GELATINA E SURFACTANTES (SDS E TWEEN 80).....	72
TABELA 18. . RESISTÊNCIA MECÂNICA DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA E SURFACTANTES (SDS E TWEEN).....	74
TABELA 19. OPACIDADE (OP) DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDOS ESTEÁRICO E CAPRÓICO (FILMES BÁSICOS).....	75
TABELA 20. OPACIDADE DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETIANA, ÁCIDO CAPRÓICO E SURFACTANTES (SDS E TWEEN 80).....	77
TABELA 21. OPACIDADE DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDOS ESTEÁRICO E SURFACTANTE (SDS E TWEEN 80).....	78
TABELA 22. OPACIDADE DOS FILMES DE GELATINA E SURFACTANTES (SDS E TWEEN).....	79
TABELA 23. OPACIDADE DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETIANA E SURFACTANTES (SDS E TWEEN).....	80
TABELA 24. PARÂMETROS (M_0 , C_G E K_B) DA EQUAÇÃO DE GAB DAS ISOTERMAS DE SORÇÃO EM DIFERENTES FORMULAÇÕES.....	105
TABELA 25. VALORES DE (Δ , PEAK, x_1 E x_2) DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO ESTEÁRICO OU ÁCIDO CAPRÓICO E SURFACTANTES (SDS E TWEEN).....	112

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM SURFACTANTE.....	13
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE UMA MICELA DE SURFACTANTE RESULTANDO UMA GOTA DE ÓLEO.	14
FIGURA 3. ESTRUTURA DO SDS.	16
FIGURA 4. ILUSTRAÇÃO DO PROCESSO DE MICELIZAÇÃO DO SDS EM SOLUÇÃO AQUOSA. NA CMC OS MONÔMEROS LIVRES ENCONTRAM-SE EM EQUILÍBRIO COM O SDS MICELIZADO.....	17
FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO GERAL DA MOLÉCULA DE TWEEN 80, ONDE R REPRESENTA O RADICAL DO ÁCIDO GRAXO E N REPRESENTA O NÚMERO DE MOLES DE ÓXIDO DE ETENO	17
FIGURA 6 ENSAIOS PRELIMINARES PARA DEFINIR AS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO CAPRÓICO E TRIACETINA.	37
FIGURA 7. ENSAIOS PRELIMINARES PARA DEFINIR AS CONCENTRAÇÕES FIXADAS PARA A TRIACETINA, ESTANDO O ÁCIDO ESTEÁRICO JÁ DEFINIDO DE ACORDO COM BERTAN, 2003.	37
FIGURA 8 FILMES ELABORADOS COM ÁCIDO ESTEÁRICO, SDS, TWEEN, MISTURA DE AMBOS, UTILIZANDO AJUSTE DE PH E PH NATURAL DA SOLUÇÃO.....	38
FIGURA 9. FILMES ELABORADOS COM ÁCIDO CAPRÓICO, SDS, TWEEN, MISTURA DE AMBOS, UTILIZANDO AJUSTE DE PH E PH NATURAL DA SOLUÇÃO.....	38
FIGURA 10. FORMULAÇÕES ELABORADAS A BASE DE GELATINA E SURFACTANTES (SDS, TWEEN, E MISTURA DE AMBOS), COM AJUSTE DE PH E COM O PH NATURAL DA SOLUÇÃO S.	39
FIGURA 11. FORMULAÇÕES FEITAS A BASE DE GELATINA, TRIACETINA E SURFACTANTES(SDS, TWEEN E MISTURA DE AMBOS), COM AJUSTE DE PH E COM O PH NATURAL DA SOLUÇÃO.....	39

FIGURA 12. SUPORTE COM RECORTE EM L, UTILIZADO PARA FIXAÇÃO DO FILME.....	44
FIGURA 13. DEFINIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTANTES EM RELAÇÃO A VARIAÇÃO DE TEMPERATURA, PH E CONCENTRAÇÃO PARA UMA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDO ESTEÁRICO, SURFACTANTE E ÁGUA.....	48
FIGURA 14. DEFINIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA MISTURA DE SURFACTANTES EM RELAÇÃO A VARIAÇÃO DE TEMPERATURA, PH E CONCENTRAÇÃO PARA UMA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDO ESTEÁRICO, MISTURA DE SURFACTANTE E ÁGUA	49
FIGURA 15. DEFINIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTANTES EM RELAÇÃO A VARIAÇÃO DE TEMPERATURA, PH E CONCENTRAÇÃO PARA UMA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDO CAPRÓICO, SURFACTANTE E ÁGUA.	50
FIGURA 16. DEFINIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MISTURA DE SURFACTANTES EM RELAÇÃO A VARIAÇÃO DE TEMPERATURA, PH E CONCENTRAÇÃO PARA UMA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDO CAPRÓICO, MISTURA DE SURFACTANTE E ÁGUA.....	51
FIGURA 17. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. (A)GELATINA-ESPESSURA; (B)GELATINA-SUPERFÍCIE; (C)GELATINA COM AJUSTE DE PH-ESPESSURA (D)GELATINA COM AJUSTE DE PH-SUPERFÍCIE.....	81
FIGURA 18. (A) GELATINA E TRIACETINA; (B) GELATINA E TRIACETINA, COM AJUSTE DE PH; (C)GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDO CAPRÓICO, (D)GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDO CAPRÓICO, COM AJUSTE DE PH; (E)GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO ESTEÁRICO;(F)GELATINA,TRIACETINA, ÁCIDO ESTEÁRICO, COM AJUSTE DE PH.....	83
FIGURA 19. (A)GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO ESTEÁRICO E 70% DE SDS - SUPERFÍCIE; (B)GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO ESTEÁRICO E 40% DE SDS - SUPERFÍCIE; (C)GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO ESTEÁRICO E 60% DE SDS, COM AJUSTE DE PH - SUPERFÍCIE; (D) GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO ESTEÁRICO E 50 DE SDS E 50% DE TWEEN -SUPERFÍCIE; (E) GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO ESTEÁRICO E 50% DE SDS E 50% DE TWEEN, COM AJUSTE DE PH - SUPERFÍCIE.	85
FIGURA 20. (A)GELATINA, TRIACETINA, CAPRÓICO E 75% DE SDS E 25% DE TWEEN (30% CONCENTRAÇÃO DO SURFACTANTE; (B) GELATINA, TRIACETINA, CAPRÓICO E 75% DE	

SDS E 25% DE TWEEN (30% CONCENTRAÇÃO DO SURFACTANTE, COM AJUSTE DE PH.....	86
FIGURA 21. MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER:.(A)GELATINA E TRIACETINA CORADAS-FITC; (B) GELATINA E TRIACETINA CORADAS-NILE RED; (C)GELATINA E TRIACETINA CORADAS-MERGE; E MICROSCOPIA ÓTICA: (D)GELATINA E TRIACETINA CORADAS..	87
FIGURA 22. MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER.(A)GELATINA E TRIACETINA, COM AJUSTE DE PH CORADAS-FITC; (B) .GELATINA E TRIACETINA, COM AJUSTE DE PH CORADAS-NILE RED; (C)GELATINA E TRIACETINA, COM AJUSTE DE PH CORADAS-MERGE; E MICROSCOPIA ÓTICA: (D)GELATINA E TRIACETINA, COM AJUSTE DE PH - CORADAS.	88
FIGURA 23. MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER.(A)GELATINA, TRIACETINA E ACIDO ESTEÁRICO CORADAS-FITC; (B) .GELATINA, TRIACETINA E ACIDO ESTEÁRICO CORADAS-NILE-RED; (C)GELATINA, TRIACETINA E ACIDO ESTEÁRICO CORADAS-MERGE; E MICROSCOPIA ÓTICA: (D)GELATINA, TRIACETINA E ACIDO ESTEÁRICO. ...	89
FIGURA 24. MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER.(A)GELATINA, TRIACETINA E ACIDO ESTEÁRICO, COM AJUSTE DE PH CORADAS-FITC; (B) .GELATINA, TRIACETINA E ACIDO ESTEÁRICO COM AJUSTE DE PH CORADAS-NILE-RED; (C)GELATINA, TRIACETINA E ACIDO ESTEÁRICO COM AJUSTE DE PH CORADAS-MERGE; E MICROSCOPIA ÓTICA: (D)GELATINA, TRIACETINA E ACIDO ESTEÁRICO - COM AJUSTE DE PH.....	90
FIGURA 25. MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER.(A)GELATINA, TRIACETINA E ACIDO CAPRÓICO CORADAS-FITC; (B) .GELATINA, TRIACETINA E ACIDO CAPRÓICO CORADAS-NILE-RED; (C)GELATINA, TRIACETINA E ACIDO CAPRÓICO CORADAS-MERGE; E MICROSCOPIA ÓTICA: (D)GELATINA, TRIACETINA E ACIDO CAPRÓICO.....	91
FIGURA 26. MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER.(A)GELATINA, TRIACETINA E ACIDO CAPRÓICO, COM AJUSTE DE PH CORADAS-FITC; (B) .GELATINA, TRIACETINA E ACIDO CAPRÓICO COM AJUSTE DE PH CORADAS-NILE-RED; (C)GELATINA, TRIACETINA E ACIDO CAPRÓICO COM AJUSTE DE PH CORADAS-MERGE; E MICROSCOPIA ÓTICA (D)GELATINA, TRIACETINA E ACIDO CAPRÓICO COM AJUSTE DE PH.	92

FIGURA 27 MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER.(A)GELATINA, TRIACETINA, ACIDO ESTEÁRICO E 70% SDS (CORADAS-FITC); (B) .GELATINA, TRIACETINA, ACIDO ESTEÁRICO E 70% SDS (CORADAS-NILE-RED); (C)GELATINA, TRIACETINA, ACIDO ESTEÁRICO E 70% SDS (CORADAS-MERGE); E MICROSCOPIA ÓTICA : (D)GELATINA, TRIACETINA, ACIDO ESTEÁRICO E 70% SDS.	93
FIGURA 28. MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER.(A)GELATINA, TRIACETINA, ACIDO ESTEÁRICO E 60% SDS, COM AJUSTE DE PH (CORADAS-FITC); (B) GELATINA, TRIACETINA, ACIDO ESTEÁRICO E 60% SDS , COM AJUSTE DE PH (CORADAS-NILE-RED); (C)GELATINA, TRIACETINA, ACIDO ESTEÁRICO E 60% SDS, COM AJUSTE DE PH (CORADAS-MERGE); E MICROSCOPIA ÓTICA (D)GELATINA, TRIACETINA, ACIDO ESTEÁRICO E 60% SDS, COM AJUSTE DE PH.	94
FIGURA 29. MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER.(A)GELATINA, TRIACETINA, ACIDO ESTEÁRICO E 40% SDS (CORADAS-FITC); (B) .GELATINA, TRIACETINA, ACIDO ESTEÁRICO E 40% SDS (CORADAS-NILE-RED); (C)GELATINA, TRIACETINA, ACIDO ESTEÁRICO E 40% SDS (CORADAS-MERGE); E MICROSCOPIA ÓTICA: (D)GELATINA, TRIACETINA, ACIDO ESTEÁRICO E 40% SDS.	95
FIGURA 30. MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER (A)GELATINA, TRIACETINA, ACIDO ESTEÁRICO E 50% SDS E 50% TWEEN 80(CORADAS-FITC); (B) .GELATINA, TRIACETINA, ACIDO ESTEÁRICO E 50% SDS E 50% TWEEN 80 (CORADAS-NILE-RED); (C)GELATINA, TRIACETINA, ACIDO ESTEÁRICO E 50% SDS E 50% TWEEN 80 (CORADAS-MERGE); E MICROSCOPIA ÓTICA: (D)GELATINA, TRIACETINA, ACIDO ESTEÁRICO E 50% SDS. E 50% TWEEN 80.	96
FIGURA 31 MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER.(A)GELATINA, TRIACETINA, ACIDO ESTEÁRICO E 50% SDS E 50% TWEEN 80, COM AJUSTE DE PH(CORADAS-FITC); (B) .GELATINA, TRIACETINA, ACIDO ESTEÁRICO E 50% SDS E 50% TWEEN 80, COM AJUSTE DE PH (CORADAS-NILE-RED); (C)GELATINA, TRIACETINA, ACIDO ESTEÁRICO E 50% SDS E 50% TWEEN 80, COM AJUSTE DE PH (CORADAS-MERGE); E MICROSCOPIA ÓTICA: (D)GELATINA, TRIACETINA, ACIDO ESTEÁRICO E 50% SDS. E 50% TWEEN 80, COM AJUSTE DE PH.	97

FIGURA 32. MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER.(A)GELATINA, TRIACETINA, ACIDO CAPRÓICO E 75% SDS E 25% TWEEN 80=30% DA CONCENTRAÇÃO DA MISTURA DO SURFACTANTE, (A) FITC; (B) NILE RED; (C) MERGE E MICROSCOPIA ÓTICA: (D)GELATINA, TRIACETINA, ACIDO CAPRÓICO E 75% SDS. E 25% TWEEN 80=30% DA CONCENTRAÇÃO DA MISTURA DO SURFACTANTE.....	98
FIGURA 33. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO, AJUSTADAS PELA EQUAÇÃO GAB, DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO ESTEÁRICO OU ÁCIDO CAPRÓICO COM E SEM O AJUSTE DE PH.....	101
FIGURA 34. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO, AJUSTADAS PELA EQUAÇÃO GAB, DOS FILMES DE GELATINA E TRIACETINA COM E SEM O AJUSTE DE PH.	101
FIGURA 35. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO, AJUSTADAS PELA EQUAÇÃO GAB, DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO ESTEÁRICO E 70% DE SDS, 40% DE SDS E 60% DE SDS (COM AJUSTE DE PH).....	102
FIGURA 36. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO, AJUSTADAS PELA EQUAÇÃO GAB, DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO ESTEÁRICO E 50% DE SDS E 50% DE TWEEN, COM E SEM O AJUSTE DE PH.....	103
FIGURA 37. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO, AJUSTADAS PELA EQUAÇÃO GAB, DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO CAPRÓICO E 75% DE SDS E 25% DE TWEEN (30% CONCENTRAÇÃO DO SURFACTANTE).....	104
FIGURA 38. TERMOGRAMA DE DSC DOS FILMES DE GELATINA E TRIACETINA.....	106
FIGURA 39. TERMOGRAMA DE DSC DOS FILMES DE GELATINA E TRIACETINA COM AJUSTE DE PH.....	106
FIGURA 40. TERMOGRAMA DE DSC DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDO ESTEÁRICO.....	107
FIGURA 41. TERMOGRAMA DE DSC DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDO ESTEÁRICO COM AJUSTE DE PH.	107
FIGURA 42. TERMOGRAMA DE DSC DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO ESTEÁRICO E 70% DE SDS.....	109

FIGURA 43. TERMOGRAMA DE DSC DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO ESTEÁRICO E 60% DE SDS COM AJUSTE DE PH.	109
FIGURA 44. TERMOGRAMA DE DSC DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO ESTEÁRICO E 50% DE SDS E 50% DE TWEEN 80.	110
FIGURA 45. TERMOGRAMA DE DSC DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA E ÁCIDO CAPRÓICO.	111
FIGURA 46. TERMOGRAMA DE DSC DOS FILMES DE GELATINA, TRIACETINA, ÁCIDO CAPRÓICO E 75% DE SDS E 25% DE TWEEN 80 (30%DA CONCENTRAÇÃO DO SURFACTANTE).	111

RESUMO

Desenvolvimento de biofilmes tem crescido devido a possibilidade de substituição parcial de materiais plásticos não degradáveis. Proteínas e polissacarídeos têm sido utilizados para a produção de filmes com boas propriedades mecânicas. Porém filmes a partir desses materiais apresentam alta permeabilidade ao vapor de água. Uma alternativa usada para diminuir a permeabilidade ao vapor de água dos filmes é a incorporação de substâncias hidrofóbicas na composição da solução filmogênica, porém a incorporação dessas substâncias na matriz filmogênica não ocorre de maneira homogênea. Com o objetivo de melhorar a incorporação das substâncias hidrofóbicas na matriz protéica do filme foram adicionados os surfactantes (SDS e Tween 80), que são compostos orgânicos constituídos por moléculas anfifílicas, contendo uma parte polar e outra apolar, com o intuito desta substância interagir na proteína e no ácido graxo, tornando a matriz filmogênica menos heterogênea. O efeito do pH também foi estudado, com a finalidade de observar se este exerce influência na homogeneidade da matriz filmogênica. Os ácidos graxos utilizados no trabalho foram o ácido capróico (6C), e o ácido esteárico (18C), com o objetivo de avaliar e comparar se o número de carbonos da cadeia do ácido graxo exerce influencia na incorporação da matriz protéica. Os filmes foram caracterizados quanto as propriedades de barreira ao vapor de água e propriedades mecânicas, solubilidade em água, opacidade, isotermas de sorção e calorimetria diferencial de varredura, podendo ser observado que a adição dos surfactantes melhorou a barreira ao vapor de água e diminuiu a resistência à tração dos filmes, não sendo observado diferenças na cor e opacidade dos filmes . Posteriormente foram analisadas as características morfológicas, através da microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser, observando que o ajuste do pH e a adição do surfactante modificam a estrutura morfológica do filme.

Palavras-chaves: Biofilmes, Gelatina, Triacetina, Ácido capróico, Ácido esteárico, SDS (Lauril sulfato de sódio), Tween 80.

ABSTRACT

Development of biofilms has grown considering the possibility of partial substitution of plastic materials not degradable. Proteins and polysaccharides have been used for the production of films with good mechanical properties. However films produced with these materials present high water vapor permeability to the water vapor. An used alternative to improve the water vapor barrier of the films is the incorporation of hydrophobic substances in the composition of the filmogenic solution, however the incorporation of these substances in the filmogenic matrix does not occur in homogeneous way. Thus with, the objective to improve the incorporation of hydrophobic substances in the protein matrix of the film surfactants had been added (SDS and Tween 80). They are organic compounds constituted by amphiphilic molecules, including a polar part and other apolar, with the intention that is substances improve the interaction between the protein and the fats acids, producing a less heterogeneous filmogenic matrix. The effect of pH also was studied, with the purpose to observe if this produce influence in the homogeneity of the filmogenic matrix. The fats acids used in this work were the caproic acid (6C), and the stearic acid (18C), with the objective to evaluate and to compare if the carbon number of the fats acids exerts influences in the incorporation on the protein matrix. The films were characterized with respect to the properties of barrier to the water vapor, solubility in water, opacity, isotherms of sorption and thermal properties, being able to be observed that the addition of the surfactants improved the water vapor permeability and decreased the tensile strength of the films, not being observed differences in the color and opacity of the films. Later the morphologic characteristics had been analyzed, through optics microscopy, scanning electron microscopy and confocal laser scanning microscopy, observing that the adjustment of pH and the addition of the surfactant modify the morphological structure of the films.

Key-word: Edible film, gelatin, triacetin, caproic acid, stearic acid, SDS (lauryl sulphate the sodium), Tween 80.

1. Introdução

Durante a última década muitos esforços têm sido realizados, na tentativa de diminuir o impacto ambiental causado pela deposição de materiais de embalagem no meio ambiente. A necessidade da redução do acúmulo de resíduos sólidos não biodegradáveis é um fator primordial, devido aos distúrbios ecológicos e as questões sociais (COLLA, 2004).

De maneira geral, são utilizadas embalagens rígidas, como latas metálicas ou recipientes de vidro, que possuem excelentes propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água e gases, garantindo proteção estrutural (mecânica) e química. 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 e FENNEMA, 1986).

Os alimentos de uma forma geral são altamente perecíveis. Deste modo, inúmeros são os problemas relacionados à conservação dos mesmos, sejam na forma *in natura* ou como produtos processados. Diversas são as técnicas de conservação de alimentos utilizadas, destacando-se: o uso de aditivos químicos, a salga e a defumação, a pasteurização, esterilização, refrigeração, congelamento, desidratação osmótica e a secagem. Geralmente, métodos combinados são utilizados, sendo indispensável uma proteção física do alimento, na forma de embalagens. (CARVALHO, 2002)

O interesse em filmes comestíveis origina-se da tentativa de desenvolver embalagens facilmente degradáveis, não agressivas ao meio ambiente, com o objetivo de melhorar a qualidade dos produtos alimentícios e proporcionar novos

mercados para matérias primas utilizadas na fabricação desses filmes (KOELSCH, 1994; CHEN, 1995)

Os biofilmes podem ser de dois tipos: coberturas, quando são aplicadas diretamente nas superfícies dos alimentos ou filmes, que são películas finas formadas sobre um suporte. Ambos podem ser definidos como uma fina camada contínua formada ou depositada no alimento, preparada a partir de materiais biológicos, que pode agir como barreira a elementos externos (umidade, óleos, gases), protegendo o alimento e aumentando sua vida de prateleira. Algumas possíveis propriedades funcionais dos filmes e coberturas são: inibir a migração de umidade, retardar o transporte de solutos, oferecer integridade estrutural adicional aos alimentos, reter compostos aromáticos e poder carregar aditivos alimentícios (KROCHTA e MULDER-JOHNSTON, 1997).

Os materiais mais utilizados para elaboração de filmes e coberturas comestíveis são misturas de lipídios, proteínas, carboidratos, plastificantes, surfactantes, aditivos e solventes, como água e álcool. Os filmes e coberturas podem ser simples, compostos ou ainda serem formados por camadas. Os filmes compostos de proteínas e lipídios apresentam a vantagem de reunir os pontos positivos de cada um, já que filmes hidrofóbicos apresentam boa barreira ao vapor de água e filmes hidrofílicos apresentam boa barreira a gases, além de propiciar boas propriedades mecânicas (AMARANTE e BANKS, 2001)

Os biofilmes compostos à base de proteínas e lipídios, têm apresentado bons resultados em relação à permeabilidade ao vapor de água, como foi observado em trabalhos anteriores (BATISTA, 2004; BERTAN 2003; FAKHOURI, 2002) embora tenha sido relatado a dificuldade de incorporação do lipídio na matriz filmogênica. A adição do surfactante pode melhorar a incorporação dos lipídios na matriz filmogênica.

Este trabalho visa a utilização do ácido esteárico (que é um ácido de alto peso molecular, 18C) e do ácido capríco (ácido graxo de baixo peso molecular com 6C), em filmes elaborados com gelatina em seu pH natural e com o pH de 7,5 aproximadamente. Adicionalmente, serão utilizados os surfactantes SDS (dodecil sulfato de sódio) e Tween 80 e misturas dos mesmos na tentativa de se favorecer uma incorporação homogênea dos compostos hidrofóbicos na matriz filmogênica.

Para este propósito as características mecânicas, de barreira, opacidade, solubilidade, morfologia (microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal), propriedades térmicas (Calorimetria Diferencial de Varredura-DSC) e Isotermas de adsorção foram estudadas.

1.1 Objetivo Geral

Desenvolver filmes compostos de gelatina tipo A, triacetina, ácido esteárico ou ácido capríco e surfactantes (SDS e TWEEN 80), para viabilizar a incorporação do ácido graxo na matriz filmogênica protéica.

1.2 Objetivos Específicos

-Desenvolver filmes à base de gelatina, triacetina, ácido esteárico e/ou ácido capríco, com e sem o ajuste de pH.

-Desenvolver filmes de gelatina triacetina, ácido esteárico e/ou ácido capríco e surfactantes (SDS e TWEEN 80).

-Caracterizar os filmes quanto a resistência mecânica, alongação, permeabilidade ao vapor de água, solubilidade, opacidade, propriedades térmicas, isotermas de sorção e características morfológicas (microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser)

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Biofilmes

Coberturas são finas camadas de material aplicadas e formadas diretamente sobre a superfície do produto, enquanto filmes são definidos como 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).

O uso de embalagens é importante, pois favorece a preservação da qualidade de um alimento. Aquelas constituídas por materiais sintéticos apresentam um período de degradação no ambiente maior quando comparadas a embalagens constituídas por proteínas, polissacarídeos e/ou lipídios, denominadas biodegradáveis (CALLEGARIN et. al., 1997).

O conceito de biofilmes como meio de proteção para alimentos foi registrado desde 1950 (SOUZA, 2001), no entanto, a aplicação de coberturas a base de ceras em frutas cítricas, para retardar a desidratação, já era utilizado na China, nos séculos XII e XIII (BALDWIN et al., 1997). A aplicação comercial de ceras (de carnaúba, de abelha e parafina) e óleos (mineral, vegetal), por sua vez, teve início em 1930, emulsões destes compostos em água, eram aspergidas sobre as frutas para melhorar sua aparência (brilho e cor) e para controlar o amadurecimento e a perda de peso (DEBEAUFORT et al., 1998; GENNADIOS et al., 1997).

Indústrias alimentícias e pesquisadores têm demonstrado interesse crescente nessas embalagens, especialmente devido a sua biodegradabilidade e ao fato de que podem ser produzidas a partir de biopolímeros como proteínas e polissacarídeos, que são recursos renováveis (SOBRAL et al., 2001; KROCHTA e MULDER-JOHNSTON, 1997). Na última década houve um grande aumento no número de pesquisas envolvendo biofilmes para prolongar a vida de prateleira e melhorar a qualidade de alimentos frescos, congelados e industrializados, devido aos seguintes fatores: preocupações ambientais sobre o descarte de materiais não renováveis de embalagem; aumento das exigências dos consumidores por alimentos frescos como frutas e vegetais minimamente processados; oportunidades para a abertura de novos mercados às matérias-primas formadoras de filmes (DIAB et al., 2001).

Por outro lado, a produção de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis também tem despertado interesse em função das possíveis aplicações adicionais tais como: habilidade em funcionar como suporte de substâncias ativas (antioxidantes, agentes antimicrobianos, etc) utilização no interior de alimentos heterogêneos funcionando como barreira seletiva ao transporte de gases e solutos (embalagens ativas). (CHERIAN et al., 1998; HAN, 2000).

A utilização dos filmes visa controlar a migração de água de um sistema alimentício, a permeabilidade ao oxigênio, ao dióxido de carbono, a migração lipídica, manter qualidades desejáveis em um alimento relacionadas à cor, sabor, aroma, doçura, acidez e textura e, ainda, podem conter aditivos alimentícios como antioxidantes e antimicrobianos, os quais visam retardar a taxa de deterioração (McHUGH e KROCHTA, 1994a ; KESTER e FENNEMA, 1986).

A formação dos filmes geralmente envolve associações inter e intramoleculares ou ligações cruzadas de cadeias de polímeros formando uma rede tridimensional semi-rígida que retém o solvente (THARAHATHAN, 2003). Qualquer que seja o processo de produção, a transformação da solução

filmogênica em filmes ou coberturas é consequência de interações intermoleculares, que se traduzem em forças estruturais (CARVALHO, 1997).

As coberturas e biofilmes a base de lipídios produzidos com ceras e óleos são efetivos como barreira à umidade e reduzem a troca de gases, devido à hidrofobicidade. As coberturas e biofilmes feitos de polissacarídeos (celulose, pectina, amido, alginatos, quitosana e gomas) possuem boa barreira a gases (O_2 e CO_2), mas não a água, provavelmente relacionada à alta polaridade do filme. As coberturas e biofilmes protéicos (caseína, gelatina, soja, zeína, glúten e albumina de ovo) são boas barreiras ao O_2 e CO_2 em ambientes com baixa umidade relativa, mas não em alta umidade devido à susceptibilidade do filme em absorver umidade e se dissolver. Filmes e coberturas compostos ou de duas camadas estão sendo investigadas, a fim de melhorar as características de permeabilidade, força, flexibilidade e valor nutricional (AMARANTE e BANKS, 2001).

Como alternativa para melhorar as propriedades de barreira dos biofilmes, a incorporação de lipídios surge como alternativa interessante e tem sido estudada por GONTARD, et al.; 1994; KAMPER, S. L., FENNEMA, 1984; YANG, L. PAULSON, A. T., 2000b). Além de diminuir a permeabilidade ao vapor de água dos biofilmes, os lipídios podem prevenir a migração de água entre os componentes do alimento. Quando se adiciona um componente hidrofóbico à suspensão formadora do filme produzem-se filmes compostos, nos quais o componente lipídico atua como barreira ao vapor de água, e a proteína ou polissacarídeo fornecem a barreira ao oxigênio e fornecem as características mecânicas necessárias (ANKER, et al., 2002)

2.2 Filmes emulsionados

Uma emulsão consiste em um sistema coloidal heterogêneo onde ocorre a mistura de dois líquidos imiscíveis, sendo um deles disperso em forma de

partículas no outro. Para estabilizar a emulsão necessária é 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).

Quando se produzem biofilmes emulsionados, atenção especial deve ser dada à etapa de emulsão, em relação a velocidade de agitação, devido a possibilidade de formação de espuma, o que pode levar a formação de estruturas heterogêneas afetando as propriedades mecânicas e de barreira dos biofilmes. Na produção de filmes emulsionados quanto menor for o diâmetro dos glóbulos de lipídios e quanto mais homogênea for sua distribuição, melhores serão as propriedades de barreira ao vapor de água (GALLO et al., 2000; BALDWIN et al., 1997). Na produção deste tipo de filme a temperatura da emulsão deve ser superior à temperatura de fusão do lipídio, mas inferior a temperatura de volatilização do solvente da rede estrutural. (ANKER et al., 2001).

A produção de filmes emulsionados apresenta como vantagem, em relação aos filmes de dupla camada, a utilização de um único estágio de secagem, já que a produção dos filmes de dupla camada requerem dois estágios de secagem, ou seja, uma camada de solução filmogênica é colocada sobre o suporte e após sua secagem uma segunda é depositada sobre ela (DEBEAUFORT; VOILLEY, 1995).

2.3 Gelatina

A gelatina é uma proteína animal, solúvel em água e resultante da hidrólise ácida ou básica do colágeno (POPPE, 1997), cujas propriedades (distribuição de massa molecular, estrutura e composição em sub-unidades) dependem do processo de obtenção e da matéria prima (BELL, 1989).Dentre os hidrocolóides utilizados atualmente, a gelatina é um dos mais populares e é amplamente utilizada na indústria alimentícia e farmacêutica. A gelatina é produzida em larga escala a preços relativamente baixos, justificando assim o grande interesse e exploração de suas propriedades funcionais (CARVALHO, 2002).

A gelatina é composta de longas cadeias de aminoácidos unidas por ligações peptídicas. É uma proteína de origem animal, solúvel em água (em temperaturas acima de 50°C), resultante da hidrólise ácida ou básica do colágeno proveniente de ossos, peles bovinas, suínas e de tecidos conectivos. Gelatinas são produzidas através da degradação de grandes estruturas, resultando assim em uma variedade de espécies peptídicas, pois em geral a degradação não é completamente uniforme, produzindo gelatinas não homogêneas no que se refere à massa molecular (JOHNSTON-BANKS, 1990).

As proteínas, segundo ARVANITTOYANNIS et al. (1998), formam bons filmes e podem ser utilizadas em coberturas de frutas e hortaliças frescas. O filme protéico mais utilizado é o colágeno, normalmente empregado como coberturas de carnes processadas. A conversão do colágeno em gelatina é a transformação essencial que ocorre na fabricação da mesma e envolve a hidrólise catalisada por ácido ou base (POPPE, 1997).

Quase que somente o couro, ossos e pele de porco são utilizados como matéria-prima na fabricação de gelatina. Gelatinas comerciais podem ser divididas em dois grupos: gelatina do tipo A, obtida por pré-tratamento ácido, possuindo

ponto isoelétrico entre 7,0 e 9,0, e gelatina do tipo B, obtida por pré-tratamento básico, com ponto isoelétrico situado entre 4,6 e 5,2 (GENNADIOS et al., 1994). A grande variedade de tipos de gelatina existentes deve-se à complexidade do colágeno e a variedade de tratamentos químicos e enzimáticos que podem ser utilizados para sua obtenção.

2.4 Ácidos graxos

São denominados ácidos graxos todos os ácidos monocarboxílicos alifáticos. No entanto, salvo algumas exceções, todos os ácidos encontrados na natureza são de alta massa molecular, em geral da cadeia linear; saturados e insaturados. Os principais ácidos graxos encontrados na natureza são o láurico, o palmítico e o esteárico. (BOBBIO e BOBBIO, 2003).

Devido à hidrofobicidade, os lipídios têm geralmente como função primária bloquear o transporte de umidade, além de reduzir a abrasão na superfície do alimento durante o manuseio e transporte (KESTER e FENNEMA, 1986). Filmes preparados com goma-laca e outras resinas polares apresentam menor permeabilidade a gases como oxigênio, dióxido de carbono e etileno se comparado a filmes preparados com ceras. Geralmente, coberturas com grupos polares possuem menor permeabilidade ao oxigênio (HAGENMANER e SHAW, 1992).

Dependendo do tamanho da cadeia carbônica, do número e da posição das duplas ligações e linearidade (estereoespecificidade, *cis* e *trans*) os lipídios têm diferentes propriedades físicas e químicas. Os ácidos graxos apresentam diferentes tamanhos de cadeia de 3 a 24 átomos de carbono. Os ácidos graxos podem ser saturados ou insaturados. Os ácidos graxos insaturados, por possuírem duplas ligações, são considerados quimicamente instáveis. Quando possuem apenas uma dupla ligação são denominados monoinsaturados; com duas ou mais duplas ligações, são chamados de polinsaturados (BELL et al, 1989)

Segundo WONG et al. (1992), a incorporação de ácidos graxos em filmes comestíveis pode promover uma redução na permeabilidade ao vapor de água dos mesmos. Vários autores pesquisaram os benefícios da adição de ácidos graxos em filmes comestíveis. A permeabilidade ao vapor de água depende da relação hidrofóbica/hidrofílica proporcionada pelos componentes do filme e da polaridade, grau de insaturação e do grau de ramificação dos lipídios presentes no filme (GONTARD et al., 1994)

Os lipídios, quando adicionados em filmes comestíveis, são considerados também plastificantes (FENNEMA, 1995). Como são insolúveis em água, interferem na solubilidade e, conseqüentemente, na permeabilidade ao vapor de água dos mesmos.

Os pontos de fusão e ebulição dos ácidos aumentam de maneira mais ou menos uniforme com o aumento da cadeia, e são influenciados pelo comprimento da cadeia e pela presença de ramificações. O ácido esteárico possui ponto de fusão de 70°C (BOBBIO e BOBBIO, 2003; MORRISON e BOYD, 1983), e o ácido capróico tem ponto de fusão de -3,2°C (Unichema international, 2002).

Os ácidos graxos estudados neste trabalho estão representados na Tabela.1.

Tabela 1. Fórmula química e fontes de ácido capróico e ácido esteárico.

	Fórmula	Fonte
Ac. capróico	$H_3C-(CH_2)_4-COOH$	Gordura do leite, óleos de coco e babaçu
Ac. esteárico	$H_3C-(CH_2)_{16}-COOH$	Gordura animal, plantas tropicais (manteiga de cacau)

Fonte: BOBBIO e BOBBIO, 2003

A adição de ácidos graxos em soluções filmogênicas visa melhorar a barreira de um filme em relação a permeabilidade ao vapor de água (McHUGH e KROCHTA, 1994a) A permeabilidade ao vapor de água depende da relação hidrofóbica / hidrofílica proporcionada pelos componentes do filme e da polaridade, grau de insaturação e de ramificação dos lipídios presentes no filme (GONTARD et. al., 1994). Ao adicionarem os ácidos esteárico, palmítico e láurico em filmes de metil celulose, AYRANCI e TUNC (2001) observaram uma redução da permeabilidade ao vapor de água dos filmes.

A natureza química dos lipídios modifica as propriedades dos biofilmes, como o comprimento da cadeia carbônica, a polaridade afeta a inclusão dos componentes hidrofóbicos na solução filmogênica, onde quanto maior o número de carbonos na estrutura lipídica, mais difícil será a incorporação dos compostos lipídicos na solução protéica, por exemplo, o ácido araquídico (22C) possui maior permeabilidade ao vapor de água que os ácidos palmítico (16C) e esteárico (18C), o que pode ser explicado pelo fato de que a cadeia longa do lipídio sugere uma estrutura mais heterogênea (MORILLON et al., 2002). Segundo BALDWIN, et. al (1997), agentes emulsionantes ou surfactantes são frequentemente necessários para melhorar a estabilidade das partículas de lipídio na matriz protéica.

2.5 Surfactantes

Os surfactantes (do inglês *surface active*) são compostos que, como o nome indica, possuem atividade na superfície da interface entre duas fases, tais como ar-água, óleo-água, e na superfície de sólidos. Também são conhecidos como *agentes tenso-ativos*. Tais compostos caracterizam-se por possuir duas regiões distintas na mesma molécula: uma região polar (hidrofílica) e outra região não-polar (hidrofóbica). (MINATTI, 2005)

A parte apolar da molécula dos compostos anfifílicos é composta por grupos hidrofóbicos, em geral hidrocarbonetos, sejam cadeias alifáticas ou grupos

aromáticos ou policíclicos. Esta parte da molécula tem uma baixa solubilidade em água devido ao “efeito hidrofóbico”, provocado não tanto pela atração entre grupos apolares, mas principalmente pela dificuldade em romper as fortes interações entre as moléculas de água. Os grupos polares não iônicos são hidrófilos mais fracos do que os grupos carregados, pelo que a sua energia de interação com a água é também inferior. Os grupos hidrofílicos são muitas vezes chamados “cabeças” e os grupos hidrofóbicos são chamados “caudas”, principalmente quando se trata de cadeias alquilo. No caso dos compostos anfifílicos não iônicos, os grupos polares não carregados são em geral maiores do que as caudas hidrofóbicas (ROCHA, 1999). A Figura 1 representa uma molécula de um surfactante.



Figura 1. Representação esquemática de um surfactante. (DHAYMERS, 2005).

Esta particularidade na estrutura química dos surfactantes é responsável pelos fenômenos de atividade na tensão superficial de interfaces, pela micelização e solubilização.

2.5.1 Classificação dos surfactantes:

Os surfactantes podem ser classificados em iônicos ou neutros. Alguns são encontrados na natureza, enquanto que outros são sintetizados em laboratório. Os *Surfactantes Aniônicos* contém geralmente um dos quatro grupo polares solúveis-carboxilato, sulfonato, sulfato ou fosfato – combinado com uma cadeia hidrocarbonada hidrofóbica. Os surfactantes catiônicos são muito utilizados em detergentes, agentes de limpeza, líquidos de lavar pratos e cosméticos em geral, e

são compostos por uma molécula lipofílica e outra hidrofílica, contendo um ou vários grupos amônio terciários ou quaternários. Os surfactantes não iônicos não se dissociam em íons hidratados em meios aquosos. As propriedades hidrofílicas são observadas pela hidratação dos grupos amida, amina, éteres e hidroxilas (KIRK, 1997).

2.5.2 Formação de micela:

As moléculas ou os íons de surfactantes tendem a se aglomerar em micelas, grupos de molécula de tamanho coloidal. As caudas hidrofóbicas tendem a se reunir umas as outras enquanto as cabeças hidrofílicas proporcionam película externa protetora (ATKINS, 1997), conforme pode ser observado na Figura 2.

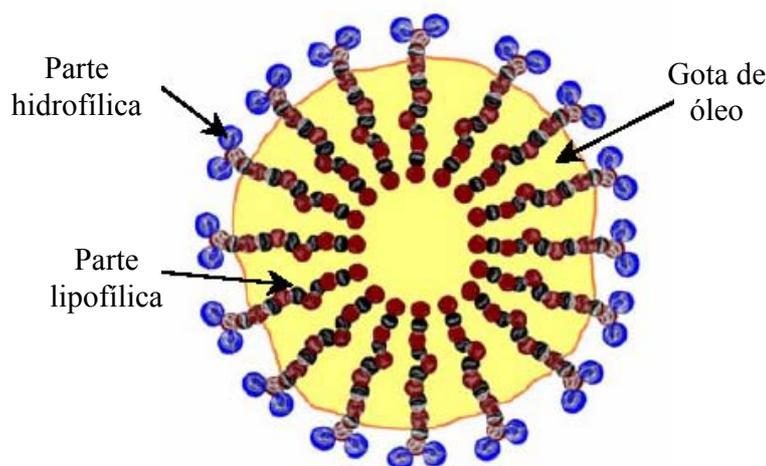


Figura. 2. Representação gráfica de uma micela de surfactante resultando uma gota de óleo. (DHYAMERS, 2005)

As micelas só se formam acima de uma concentração micelar crítica (CMC) e acima da temperatura de Kraft. A CMC é percebida pela descontinuidade pronunciada nas propriedades físicas da solução, especialmente pela descontinuidade da condutância molar. O interior hidrocarbônico de uma micela é semelhante a uma gotícula de óleo (ATKINS, 1997).

2.5.3 Sistema HLB

Dependendo dos grupos polares da molécula, esta pode ser solúvel em água ou em óleo (ou dispersível). Este conceito é quantificado pelo cálculo do valor HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance), que é um sistema de balanço hidrofílico-lipofílico. Pode-se determinar um valor numérico para um agente tensoativo, representando sua propriedade hidrofílica e lipofílica. (DHAYMERS, 2005)

Para obter uma medida do balanço de tamanho e intensidade das partes hidrofílica e hidrofóbica de um agente tensoativo não iônico, GRIFFIN, (1949) introduziu uma quantidade empírica arbitrária, designada “balanço hidrofílico-lipofílico” (HLB). A quantificação desta grandeza, que pode ser avaliada a partir da estrutura média do tensoativo, ajuda a prever a utilidade deste para aplicações particulares. Os compostos mais hidrofóbicos têm um baixo valor de HLB (1 – 10) e um aumento no valor de HLB corresponde a um aumento no caráter hidrofílico, (ROCHA,1999).

Os valores teóricos do HLB vão de 1 até aproximadamente 50. Quanto mais hidrofílico for o emulsionante, maior o seu valor do HLB, partindo de 10, enquanto que quanto mais lipofílico for o emulsionante, terá valores do HLB de 1 a 10. Como regra geral, emulsionantes com valores do HLB de 4 a 6 conferem emulsões água/óleo (w/o); valores entre 8 a 18 conferem emulsões óleo/água (o/w) (DHAYMERS, 2005)

Quando a concentração de monômero atinge um valor crítico, o surfactante adicionado começa a associar-se na forma de micelas. As micelas são definidas como agregados coloidais termodinamicamente estáveis, formadas espontaneamente por compostos anfífilos acima de uma determinada concentração, designada concentração micelar crítica (CMC), a temperaturas superiores à temperatura micelar crítica. Esta é a menor temperatura na qual as micelas se formam, o que pode ser observado pela transparência instantânea

adquirida por uma suspensão cristalina turva. Para soluções onde a concentração de surfactante é a concentração micelar crítica a temperatura na qual ocorre a transparência designa-se por ponto de “Kraft” que, para a maioria dos surfactantes, é sinônimo da temperatura micelar crítica (ROCHA, 1999).

2.5.4 Dodecil Sulfato de sódio (HLB=40)

Dodecil sulfato de sódio (Figura 3), cujo nome oficial é mono dodecil sulfato de sódio, de fórmula: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{-CH}_2\text{-O-(SO}_3\text{)}^1\text{-Na}^{1+}$, tem forma de pequenos cristais brancos ou amarelados com leve odor característico. Solúvel em dez partes de água, formando uma solução ligeiramente opaca. é parcialmente solúvel em álcool e quase insolúvel em clorofórmio e em éter. O SDS possui uma cadeia alquílica longa, praticamente insolúvel em água, ligada covalentemente a um grupo iônico, o sulfato de sódio. Usado como tensoativo nos produtos de limpeza doméstico (ROSSETTI, 2004).

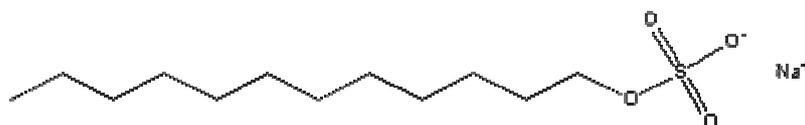


Figura 3. Estrutura do SDS (<http://gmc.ufsc.br/gmcweb/micela/>, 2005)

A concentração onde inicia o processo de formação das micelas (micelização) é chamada de *concentração crítica micelar*, CMC é uma propriedade intrínseca e característica do surfactante. Na Figura 4 pode-se observar um esquema do processo de micelização do SDS:

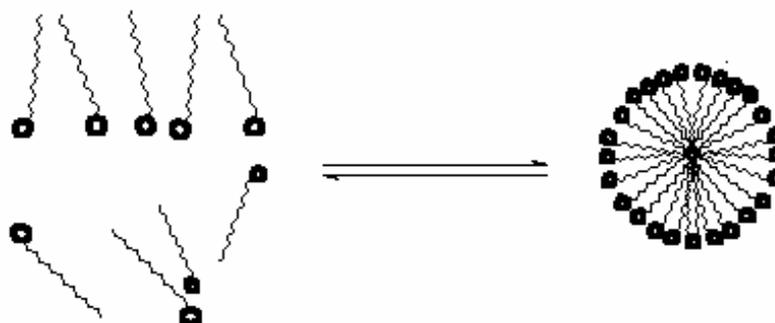


Figura.4. Ilustração do processo de micelização do SDS em solução aquosa. Na CMC os monômeros livres encontram-se em equilíbrio com o SDS micelizado. (MINATTI, 2005).

O lauril sulfato de sódio (LSS), sodium laureth sulfate (SLES) ou sodium lauryl sulfate (SLS), é um produto químico utilizado em diversos cosméticos e produtos de higiene pessoal como xampus, removedores de maquiagem, géis, sais de banho, banhos de espuma, pasta de dentes etc. Tem propriedade detergente, pois apresenta ação emulsificante e, por isso, remove a gordura e o óleo do chão, do cabelo, da pele etc. (<http://www.inca.gov.br/conteudo>, 2005)

2.5.5 Tween 80 (Monooleato de sorbitanEtoxilado (HLB=15))

O Tween é composto por ésteres de sorbitan etoxilados derivados da reação de sorbitol com ácidos graxos e óxido de eteno, sendo representado pela seguinte fórmula geral:

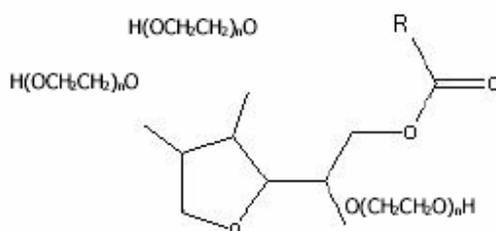


Figura 5. Representação geral da molécula de TWEEN 80, onde r representa o radical do ácido graxo e n representa o número de moles de óxido de eteno

De acordo com o tipo de ácido graxo de origem e do grau de etoxilação, obtêm-se produtos com diferentes valores de HLB (balanço hidrófilo-lipófilo), o que permite a escolha ideal para cada aplicação (OXITENO, 2003)

Os derivados etoxilados de sorbitana são conhecidos como TWEENS. Se o OE (óxido de etileno) é ligado primeiro ao sorbitol e depois a esterificação ocorre, o derivado etoxilado terá propriedades diferentes dos TWEENS (PORTER, 1991; TADROS, 2005).

Os produtos da linha TWEEN são tensoativos hidrófilos, ou seja, têm elevados valores de HLB. A presença da cadeia de polioxietileno torna os produtos da linha TWEEN solúveis ou dispersíveis em água, o que favorece a sua aplicação em emulsões do tipo óleo em água (O/A), como coemulsionantes em emulsões do tipo água em óleo (A/O), como dispersantes ou solubilizantes de óleos e essências, e como co-tensoativos em xampus (OXITENO, 2003). Suas principais características são fornecidas na Tabela. 2.

Tabela 2. Características físico químicas do Tween 80.

Características	TWEEN 80
Aparência	Líquido amarelado
Peso molecular, mol/g	1309
Índice de acidez, mgKOH/g, máx.	2,0
Índice de hidroxila, mgKOH/g	65-80
Índice de saponificação, mgKOH/g	45-55
Água, %p, máx.	3,0
Densidade, 25/4°C	1,08
Viscosidade, 25°C, cP, aprox.	425
Ponto de fulgor, °C, aprox.	>149
Solubilidade	
água	solúvel
etanol	solúvel
propilenoglicol	dispersível
óleo mineral	insolúvel
HLB calculado	15,0

Fonte: OXITENO, 2003

A distribuição das substâncias hidrofóbicas afetam as propriedades físico-químicas dos filmes comestíveis emulsionados, e depende fortemente do comportamento e estabilidade da emulsão durante a secagem. Filmes emulsionados contendo o surfactante glicerol monoestearato, mostrou uma redução na permeabilidade ao vapor de água, comparada com filmes de metilcelulose sem substâncias hidrofóbicas; sendo assim o efeito da barreira é muito dependente da natureza e concentração do surfactante (DEBEAUFORT, VOILLEY, 1995). Outros trabalhos utilizando surfactante em filmes de gelatina sem a incorporação de ácidos graxos foram desenvolvidos por TREZZA; KROCHTA, (2000).; PATEL et. al, (1996).; BALDWIN et. al,(1997).

2.6 Características dos filmes

Algumas características importantes particulares no desenvolvimento dos biofilmes, são: espessura, textura, sabor e aroma, cor e opacidade.

2.6.1 Espessura

Segundo GENNADIOS et. al. (1993) o controle da espessura dos filmes é importante para manter sua uniformidade, permitindo a repetitividade das propriedades analisadas e assim validar as comparações entre as propriedades dos filmes. Quando alíquota da solução filmogênica é depositada em suporte para secagem, é importante controlar o nível do local onde o mesmo é mantido (por exemplo, estufas ou bancadas), para evitar diferenças na espessura dos filmes, provocadas pelo desnível do suporte. A espessura é um importante parâmetro de medida, pois é a base para várias propriedades dos filmes, incluindo as mecânicas e as de permeabilidade (XIE et. al., 2002)

2.6.2 Textura/ Aparência

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)

2.6.3 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 por lipídios ou derivados, os quais podem apresentar algum sabor residual (GONTARD e GUILBERT, 1996).

Em certos casos pode haver interesse tecnológico em adicionar componentes que promovam sabor e/ou aroma nos biofilmes que são aplicados em alimentos. Ao contrário, se os filmes ou coberturas apresentassem sabor ou aroma que altere as características originais de um produto alimentício, pode tornar-se indesejável sua utilização (BATISTA, 2004).

2.6.4 Cor e opacidade

A avaliação da opacidade de um material demonstra sua maior ou menor transparência. A baixa transparência de um material é caracterizada pelo bloqueio da passagem de luz. Para a elaboração de biofilmes que visam ser utilizados como embalagens ou ainda como coberturas para alimentos, uma maior transparência tende a ser melhor (YANG e PAULSON, 2000 b; GONTARD et. al. 1994) quando se deseja manter as características originais do produto, como a cor, por exemplo.

Os filmes devem apresentar opacidade e coloração atrativas, e não devem 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 conseqüência 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 e FENNEMA, 1984). GALLO et. al. (2000) concluíram que filmes emulsionados de metilcelulose eram cinco vezes menos

transparentes que o filme controle sem lipídios. YANG e PAULSON (2000b) observaram um aumento na opacidade de filmes de gelatina proporcional a concentração de ácido esteárico-palmítico adicionada.

2.7 Propriedades mecânicas e de barreira dos biofilmes

Entre as principais propriedades dos biofilmes se encontram as propriedades de barreira ao vapor de água, propriedades mecânicas (resistência a ruptura e a alongação) e a solubilidade em água.

2.7.1 Propriedades de barreira

A permeabilidade ao vapor de água é definida pela ASTM E-96-90 como a taxa de transmissão de vapor de água por unidade de área através do filme, de espessura conhecida, induzida por um gradiente de pressão entre duas superfícies específicas, de temperatura e umidade relativa especificada (ASTM, 1990).

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

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 dos filmes e sua conseqüente dispersão no ar (KESTER e FENNEMA, 1986).

A eficiência de barreira ao vapor de água é desejável para retardar a desidratação da superfície dos produtos frescos (carnes, frutas e verduras) ou congelados. O controle das trocas gasosas particularmente do oxigênio, permite o melhor controle da maturação das frutas ou a redução da oxidação de alimentos sensíveis ao oxigênio e a rancidez de gorduras poliinsaturadas, por exemplo. A transferência de vapores orgânicos deve ser diminuída a fim de reter os compostos aromáticos no produto durante a estocagem ou prevenir a penetração de solventes no alimento (GENNADIOS e WELLER, 1990).

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 substancia hidrofóbica for capaz de se ligar de maneira adequada à matriz protéica, o transporte de água é diminuído.

Segundo BATISTA, (2004) em relação ao tipo de ácido graxo utilizado nos filmes de pectina, ácidos láurico, palmítico e esteárico, os resultados revelaram que o aumento da cadeia carbônica dos ácidos graxos (AL-12 carbonos; AP-16 carbonos e AE-18 carbonos) promoveu uma diminuição da permeabilidade, sendo neste caso, o ácido esteárico (18 C), a 6%, o que menor PVA apresentou.

De acordo com AYRANCI; TUNC (2001), o teor de ácido esteárico acrescentado aos filmes de metilcelulose (MC) (5g AE/100g MC) promoveu uma redução da permeabilidade ao vapor de água de 40% quando comparado com os filmes sem a presença de ácido.

Num estudo sobre a adição de ácidos graxos em filmes de quitosana WONG et. al. (1992), observaram que a incorporação de ácido láurico reduziu a permeabilidade ao vapor de água em até 49%, comparado ao filme controle,

enquanto que os outros ácidos adicionados não tiveram o mesmo efeito. Foi observado pelos mesmos autores que a adição de ácido palmítico aumentou a permeabilidade ao vapor de água dos filmes de quitosana, ao contrário do esperado, pois os ácidos com cadeias de carbono mais longas, como o ácido esteárico e palmítico, poderiam gerar filmes mais resistentes a permeabilidade ao vapor de água.

2.7.2 Propriedades mecânicas

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 intramolecular na estrutura filmogênica entre as cadeias de proteínas (CUQ; GONTARD e GUILBERT, 1998). Alguns lipídios, como acetoglicerídeos, 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).

As principais propriedades mecânicas dos filmes são a resistência à tração, que expressa a tensão máxima desenvolvida pelo filme durante um teste de tração, e a alongação, que é a capacidade do filme em esticar. Para os filmes, segundo GONTARD et al., (1994), uma alta resistência à tensão é requerida, enquanto que o valor da alongação depende do tipo de aplicação do filme, já que para manter a sua integridade e propriedades de barreira, um filme deve tolerar a tensão normal encontrada durante a sua aplicação, além do transporte e manuseio.

Um filme com propriedades de barreira adequadas pode ser ineficiente se as propriedades mecânicas não permitirem a manutenção da integridade do filme

durante o processo de manipulação, empacotamento e transporte. Os biofilmes devem ser resistentes à ruptura e à abrasão, fazendo com que o alimento não perca sua proteção por manuseio ou armazenamento (SARMENTO, 1999). Assim, a resistência mecânica e a deformabilidade dos biofilmes deve ser determinada. Os testes utilizados para medir a força mecânica são o teste de tração, onde podem ser derivadas as propriedades de resistência à tração, alongação e módulo de elasticidade, e o teste de perfuração, do qual pode-se obter valores de força e deformação de ruptura. A resistência à tração e ruptura são medidas pela força máxima de tração e de perfuração que o filme pode sustentar, respectivamente. Alongação é geralmente tirada do ponto de quebra, no teste de tração, sendo expressa como percentual de aumento do comprimento original da amostra. De maneira análoga, a deformação é obtida no teste de perfuração. O módulo de elasticidade ou módulo de “young” também mede a resistência do filme. Os testes mecânicos são geralmente conduzidas de acordo com métodos padrão para determinação de propriedades mecânicas de filmes plásticos finos (ASTM, 1993).

A adição de lipídios pode promover uma modificação na matriz filmogênica, resultando na diminuição da resistência a tração, conforme verificado por CHEN (1995). Esse efeito pode estar relacionado com a substituição parcial dos polímeros por lipídios na matriz do filme (YANG e PAULSON, 2000a), também como o ocorrido em filmes compostos de gelatina e lipídios. Resultado semelhante foi observado por BATISTA (2004), onde as propriedades mecânicas dos filmes foram afetadas pelo aumento no teor de ácidos graxos. Os resultados indicaram que o aumento de 6% para 18% de ácidos graxos nos filmes provocou redução da resistência à tração.

Segundo FAKHOURI (2002), observou para filmes a base de gelatina e ácidos graxos que a adição de lipídios provocou uma diminuição da resistência mecânica dos filmes. A redução da resistência mecânica relacionada ao aumento

da concentração de ácidos graxos nos filmes de gelatina, foi também observado por YANG e PAULSON (1999), PEREZ-GAGO e KROCHTA (2000), entre outros.

SHELLHAMMER e KROCHTA (1997) observaram um aumento na alongação dos filmes de proteína do soro do leite com o aumento da concentração de lipídios, o que segundo os autores, foi causado pelo efeito plastificante do lipídio. BATISTA (2004) observou que a alongação dos filmes estudados apresentou comportamentos diferentes em relação ao tipo de ácido graxo utilizado. A adição de ácido láurico nos filmes promoveu um aumento da alongação, sendo o mesmo resultado verificado nos filmes com ácido esteárico, porém em oposição a esses resultados, o filme contendo ácido palmítico apresentou uma redução da alongação com o aumento do teor de ácido de 6% para 18%.

2.7.3 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 (PEREZ-GAGO e KROCHTA, 2001).

Segundo GONTARD et. al. (1992), a solubilidade em água é uma importante propriedade dos filmes comestíveis, tanto nas suas aplicações, como na proteção dos alimentos onde a atividade de água é alta, ou ainda quando o filme entra em contato com a água durante o processamento do alimento embalado. A solubilidade, além disso, também influencia a propriedade de barreira ao vapor de água dos filmes. Para se obter uma baixa permeabilidade ao vapor de água (dentro de uma grande faixa de umidade relativa), torna-se necessário a utilização de material insolúvel ou pouco solúvel em água (FAKHOURI, 2002).

2.7.4 Isotermas de sorção

As propriedades funcionais de biofilmes sofrem grande influência das condições ambientais, temperatura e umidade relativa. As proteínas são sensíveis à umidade devido a característica hidrofílica das macromoléculas, que tornam as propriedades funcionais dos biofilmes dependentes da umidade relativa do ambiente. As isotermas de sorção dos biofilmes comestíveis, produzidos com proteína do amendoim, e glúten de trigo, variam de acordo com suas propriedades de permeabilidade ao vapor de água e natureza hidrofílica. As isotermas de sorção obtidas de dados experimentais resultam em uma estimativa do conteúdo de umidade em equilíbrio, que é necessário para prever as propriedades dos filmes em diferentes ambientes em suas aplicações (JANGCHUD e CHINNAN, 1999).

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)

Polímeros hidrofílicos, como filmes a base de proteínas que são compostos por grupos polares, podem absorver água do ambiente ou ainda do material embalado (KIM e USTUNOL, 2001) alterando as propriedades de barreira a gases e vapor de água. Isotermas de adsorção obtidas a partir de dados experimentais permitem determinar o conteúdo de umidade no equilíbrio e estimar as propriedades de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis em diferentes condições ambientais e suas possíveis aplicações (JANGCHUD e CHINNAN, 1999). A caracterização de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis em função de isotermas

de adsorção têm sido amplamente empregada (KIM e USTUNOL, 2001; SOUZA, 2001; WILLES et. al., 2000; MORILLON et. al., 2000)

Geralmente, sistemas com alto teor protéico apresentam maior incidência na forma sigmoidal, como as da proteína do trigo (GONTARD; GUILBERT e CUQ, 1993). LIM, MINE e TUNG, (1999) relataram que o formato sigmoidal 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.

Segundo BERTAN (2003), a adição de substâncias hidrofóbicas provoca diminuição do teor de umidade na monocamada. 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.

Inúmeras equações são utilizadas para representar as curvas de sorção de alimentos e entre elas o modelo GAB (Guggenheim-Anderson-De Bôer) e o modelo BET (Brunauer-Emmett-Tetter). O modelo BET é o mais utilizado e fornece um bom ajuste de dados para muitos diferentes sistemas físico-químicos na região de atividade de água $0,05 < a_w < 0,35 - 0,5$ (CHIRIFE e IGLESIAS, 1978). O modelo GAB tem sido avaliado como o mais versátil modelo de sorção disponível na literatura, tendo sido adotado pelo projeto europeu Cost 90-propriedades físicas de alimentos (RIZVI, 1995).

2.7.5 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

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_m (fusão), esta relacionada a um movimento significativo das cadeias moleculares, isto é, uma relaxação primária (LUCAS, SOARES; MONTEIRO, 2001)

BERTAN (2003), observou que os filmes de gelatina simples apresentaram apenas uma fusão, enquanto que os filmes compostos com ácidos graxos, apresentaram duas fusões. A temperatura de fusão da gelatina tanto nos filmes simples como dos compostos apresentaram-se na faixa de 85, 62 – 91,87°C. Resultados semelhantes aos valores de “temperatura de *melting*” foram encontrados por SOBRAL (2000) para os filmes de gelatina de couro bovino e suíno plastificados com sorbitol.

2.7.6 Microscopia confocal de varredura a laser

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 das 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 (SMAILLI, 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 (LAMPRECHT; SCHAFER; LEHR e 2000). 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 e KASSNER, 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Gelatina tipo A (bloom = 240, viscosidade 35 mps, umidade = 9,8% e granulometria = 6 mesh), gentilmente cedida pela empresa **GELITA DO BRASIL**; triacetina cedida pela **RHODIA**, ácidos esteárico e caprótico (Vetec), lauril sulfato de sódio; (Sigma) e Tween 80: (Vetec).

3.2 Ensaios preliminares

Foram realizados ensaios preliminares com o objetivo de encontrar a melhor forma de incorporar o ácido graxo à solução de gelatina, sendo assim foram testados a princípio a solução filme formadora sob intensa agitação mecânica com Ultra Turrax T18 IKA em velocidades de 22.000 rpm e 14.000 rpm, e avaliados no microscópio óptico o aspecto e tamanho das gotas de emulsão formadas. Esses ensaios foram descartados devido a formação intensa de espuma na solução filme formadora. Para diminuir essa incorporação de ar devido a alta rotação a solução foi passada por um sistema de vácuo, que entretanto não provocou melhora pois a redução da temperatura provocou aumento da viscosidade impedindo seu manuseio, e portanto, esses ensaios foram excluídos do trabalho. A concentração de triacetina inicialmente foi fixada em 15% de acordo com BERTAN (2003), porém quando utilizada para identificar a melhor concentração do ácido caprótico, observou-se exsudação na superfície dos filmes e portanto foram feitos novos ensaios com diferentes concentrações de triacetina (5% e 15%), definindo-se a concentração de 10% como a melhor para a continuidade dos experimentos. Para definir uma concentração de ácido caprótico foram feitos ensaios preliminares com diferentes concentrações (2,5%, 5% e 10%) e os filmes produzidos foram caracterizados com relação as propriedades mecânicas (tensão na ruptura e alongação) e permeabilidade ao vapor de água. A concentração de ácido esteárico foi definida de acordo com BERTAN (2003).

Após essa etapa foram realizados novos testes com variação no pH, temperatura e concentração de surfactante. A primeira variação estudada foi a de pH. O pH natural das formulações situou-se em torno de 4,5 e foi ajustado a 7,5 com NaOH 0,1N. Foram testadas duas “soluções” filmogênicas contendo gelatina (10g para 100 ml de água destilada), triacetina (10g/100g de gelatina) e ácido esteárico (10%) em relação a massa seca de gelatina ou gelatina (10g/100 ml de água destilada), triacetina (10% em relação a massa seca de gelatina) e ácido capróico (5%, em relação a massa seca de gelatina). Estes estudos preliminares foram feitos a pH 4,5 e a pH 7,5. Em cada uma das situações os sistemas foram aquecidos gradualmente (25, 30, 35, 40, 45, 50 e 80°C) e observados para avaliar se os compostos lipídicos eram solubilizados de forma a produzir uma “solução” transparente sem a presença de partículas insolúveis. Esta avaliação foi feita visualmente.

Para as combinações utilizadas procurou-se manter a espessura final do filme seco constante. Para que isto fosse possível, cada formulação requereu um ajuste de volume para a produção do filme, de forma a manter a espessura final constante.

Após esses testes foram realizados novos testes com variação nas temperaturas (25, 30, 35, 40, 45, 50 e 80°C), pH (pH inicial da solução 4,5, e pH final 7,5) e diferentes concentrações dos surfactantes SDS e Tween 80 individualmente (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%) e mistura de ambos (75% SDS e 25% Tween, 75% Tween e 25% SDS e 50% SDS e 50% Tween) para definir as melhores concentrações de surfactantes em cada formulação. Foram elaborados após esses testes, filmes contendo somente gelatina e a concentração desejada de surfactante e filmes contendo gelatina, triacetina e surfactante, para efeito de comparação com os filmes completos (gelatina, triacetina, ácido graxo e surfactante). Para escolha das melhores formulações os sistemas foram avaliados visualmente para identificar a melhor solubilização dos compostos hidrofóbicos, isto é, nas situações em que as soluções filmogênicas encontravam-se transparentes.

Definidas as condições de temperatura, pH e concentração de surfactantes, os biofilmes foram caracterizados com relação as propriedades mecânicas (tensão na ruptura e alongação), permeabilidade ao vapor de água, cor e opacidade e microscopia eletrônica de varredura. Após essas análises, as melhores formulações foram observadas por microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura, microscopia confocal. Para estes filmes também foram determinadas as isotermas de sorção e propriedades térmicas através da calorimetria diferencial de varredura (DSC).

3.3 Elaboração dos filmes

As Figuras 6, 7, 8, 9, 10 e 11 apresentam os fluxogramas para a elaboração de todos os filmes estudados na fase preliminar deste trabalho.

3.3.1 Elaboração dos filmes a base de gelatina e triacetina sem e com ajuste de pH

A solução filme formadora foi obtida hidratando-se 10g de gelatina em 100 ml de água destilada, por 1 hora, em temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi solubilizada a 90°C, em banho termostático, por 10 minutos. Após completa solubilização, foi adicionada a triacetina (5, 10 e 15% em relação ao peso da massa seca de gelatina). Em seguida a solução foi levada a outro banho-maria a 50-60°C, por 30 minutos, sob agitação leve para evitar a incorporação de bolhas de ar na amostra, sendo mantido o pH natural das soluções. No caso dos filmes com ajuste de pH, após esta etapa o pH da solução filmogênica foi ajustado em 7,5 utilizando o hidróxido de sódio 0,1N. A solução foi aplicada sobre placas plaxiglass de 15 cm X 15 cm. O controle da espessura para mantê-la constante foi feito através do ajuste do volume da solução filmogênica. A secagem foi realizada à temperatura ambiente (aproximadamente 25-30°C) por 24 horas. Após a secagem, os filmes permaneceram em dessecadores mantidos a 25°C e $52 \pm 2\%$ de umidade relativa (URE), durante 48 h antes do início das análises.

3.3.2 Elaboração dos filmes a base de gelatina, triacetina e ácido esteárico sem e com o ajuste de pH.

A solução filme formadora foi obtida hidratando-se 10g de gelatina em 100 ml de água destilada, por 1 hora, em temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi solubilizada a 90°C, em banho termostático, por 10 minutos. Após completa solubilização, foram adicionados a triacetina (10% em relação ao peso da massa seca de gelatina) e o ácido esteárico (10% em relação ao peso da massa seca de gelatina). No caso de filmes com ajuste de pH da solução filmogênica foi ajustado para 7,5 usando-se NaOH 0,1N, nesta etapa. Após essa etapa o processo ocorreu da mesma forma ao utilizado em 3.3.1.

3.3.3 Elaboração dos filmes a base de gelatina, triacetina e ácido caprício sem e com o ajuste de pH.

A solução filme formadora foi obtida hidratando-se 10g de gelatina em 100 ml de água destilada, por 1 hora, em temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi solubilizada a 90°C, em banho termostático, por 10 minutos. Após completa solubilização, foram adicionados a triacetina (10% em relação ao peso da massa seca de gelatina) e o ácido caprício (5% em relação ao peso da massa seca de gelatina). No caso de filmes com ajuste de pH, o pH da solução foi ajustado nesta etapa. Após essa etapa o processo ocorreu da mesma forma ao utilizado em 3.3.1.

3.3.4 Elaboração dos filmes de gelatina, triacetina, lauril sulfato de sódio e ácido esteárico sem e com o ajuste de pH.

A solução filme formadora foi obtida hidratando-se 10g de gelatina em 100 ml de água destilada, por 1 hora, em temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi solubilizada a 90°C, em banho termostático, por 10 minutos. Após

completa solubilização, foram adicionados a triacetina (10% em relação a masa seca de gelatina), o lauril sulfato de sódio (10%, e 70% em relação a massa seca de gelatina) e o ácido esteárico (10% em relação a massa seca de gelatina). Para os filmes com ajuste de pH, o pH da solução filmogênica foi ajustado em 7,5 usando-se NaOH, 0,1N. Após essa etapa o processo ocorreu da mesma forma ao utilizado em 3.3.1.

3.3.5 Elaboração dos filmes de gelatina, triacetina, ácido esteárico e Tween 80 com ajuste de pH.

A solução filme formadora (SFF) foi obtida pelo mesmo processo utilizado em 3.3.8 diferindo apenas com relação ao tipo de surfactante. O surfactante utilizado neste processo foi o Tween 80 (100% em relação a massa seca da gelatina).

3.3.6 Elaboração dos filmes de gelatina, triacetina, ácido esteárico e misturas de lauril sulfato de sódio e Tween 80.

A solução filme formadora foi obtida da mesma forma que na etapa 3.3.7, sendo utilizado neste processo a mistura dos dois surfactantes (Lauril Sulfato de Sódio e o Tween 80), variando suas concentrações: 75%SDS e 25%Tween; 50% SDS e 50% Tween; 25% SDS e 75% Tween (100% de surfactante em relação ao peso de massa seca da gelatina).

3.3.7 Elaboração dos filmes de gelatina, triacetina, ácido capróico e mistura de lauril sulfato de sódio e Tween 80.

A solução filme formadora foi obtida da mesma forma que na etapa 3.3.5, sendo utilizado neste processo a mistura dos dois surfactantes (Lauril Sulfato de

Sódio e o Tween 80),variando suas concentrações: 75% SDS e 25%Tween (10% e 30% de surfactante); 50% SDS e 50% Tween (10%, 20% e 40% de surfactante).

3.3.8 Elaboração dos filmes de gelatina, triacetina, ácido capróico e mistura de lauril sulfato de sódio e Tween 80 com ajuste de pH.

A solução filme formadora foi obtida da mesma forma que na etapa 3.3.5, sendo utilizado neste processo a mistura dos dois surfactantes (Lauril Sulfato de Sódio e o Tween 80),variando as concentrações de surfactante em relação ao peso de massa seca da gelatina em 75% SDS e 25% Tween (30% de surfactante);50% SDS e 50% Tween (40% de surfactante) e 25%SDS e 75% Tween (10% e 100% de surfactante).

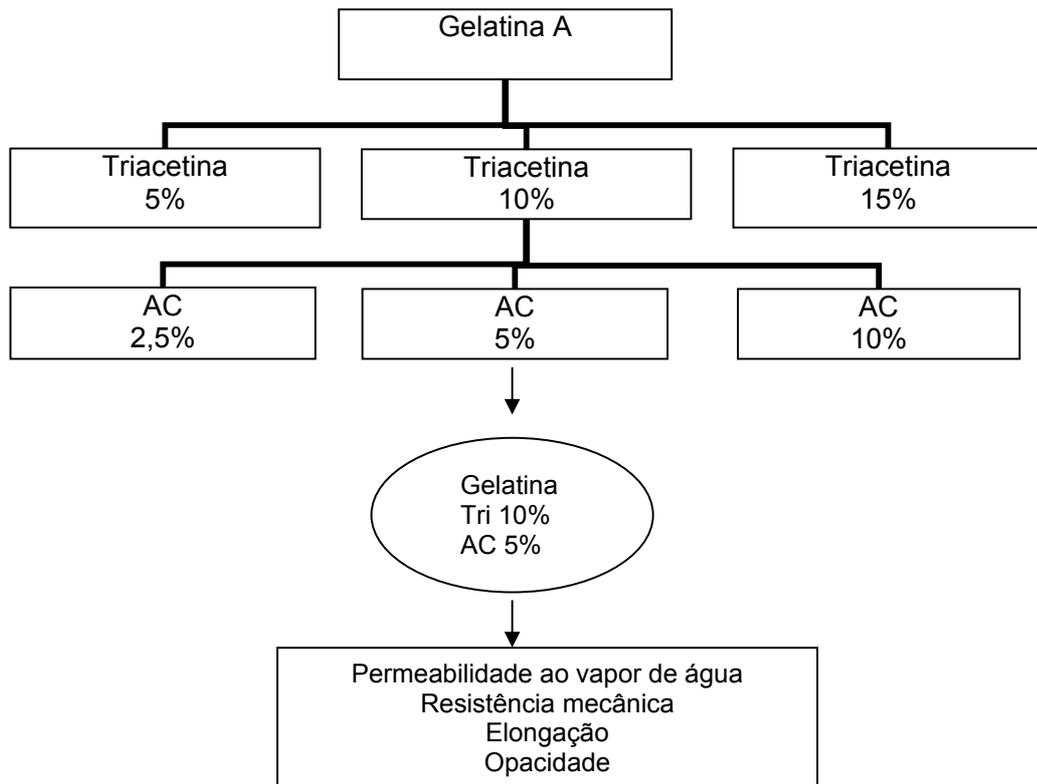


Figura 6. Ensaios preliminares para definir as concentrações de ácido capríco e triacetina.

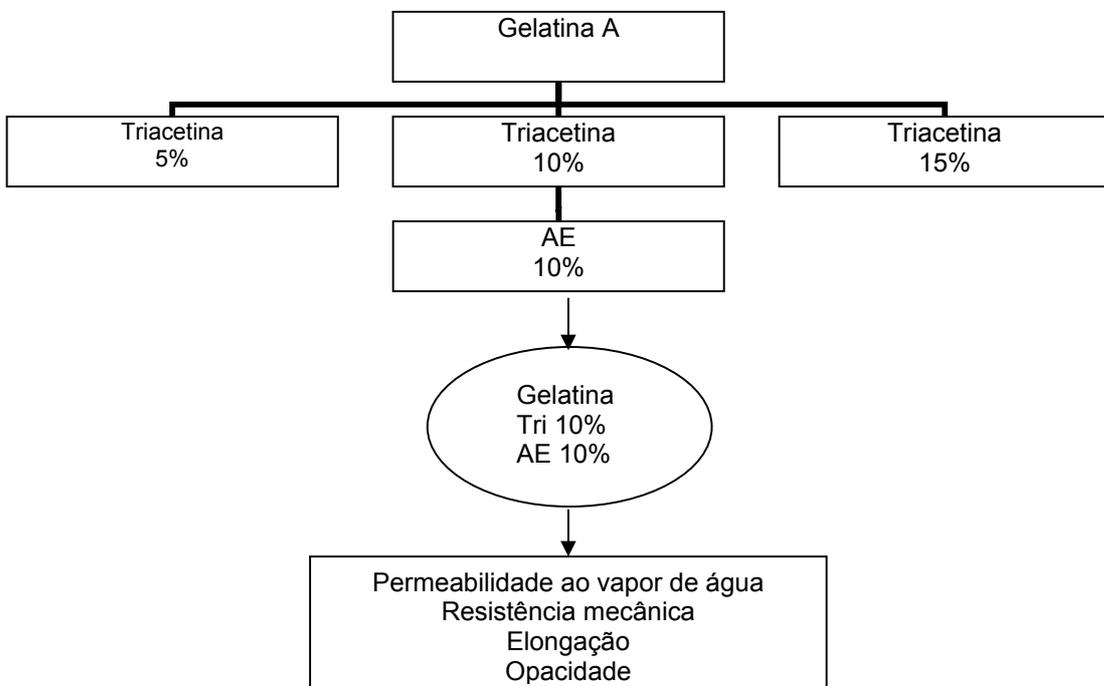


Figura 7. Ensaios preliminares para definir as concentrações fixadas para a triacetina, estando o ácido esteárico já definido de acordo com BERTAN, 2003.

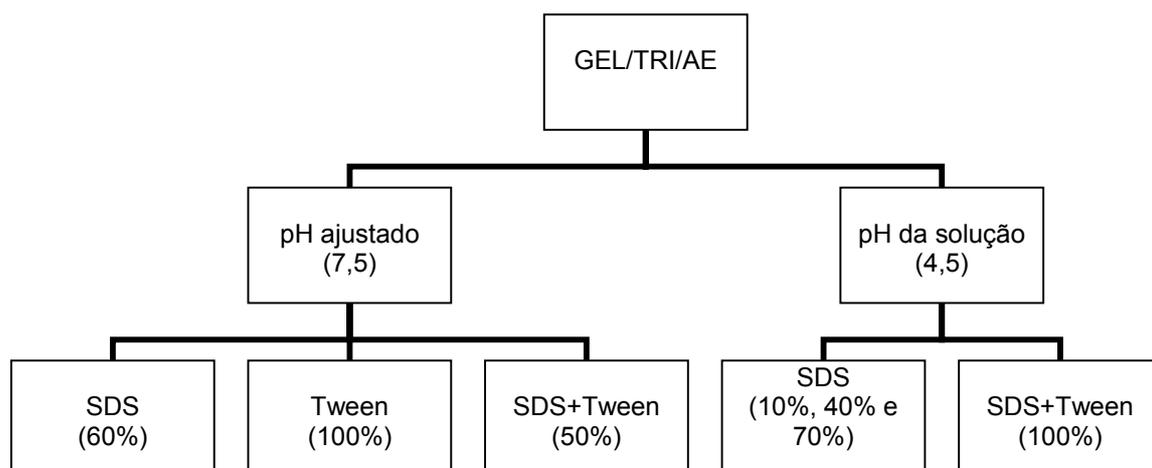


Figura 8. Filmes elaborados com ácido esteárico, SDS, Tween, mistura de ambos, utilizando ajuste de pH e pH natural da solução.

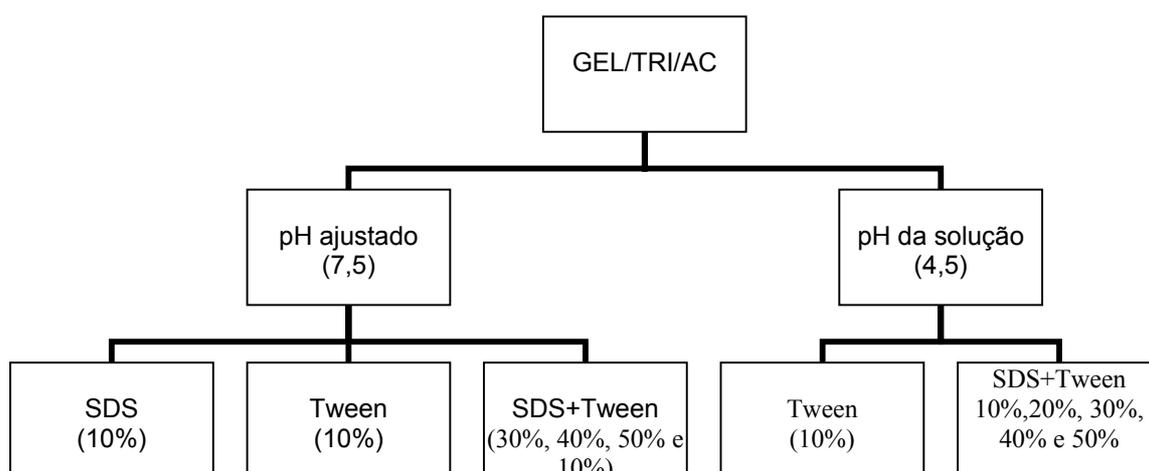


Figura 9. Filmes elaborados com ácido capríco, SDS, Tween, mistura de ambos, utilizando ajuste de pH e pH natural da solução.

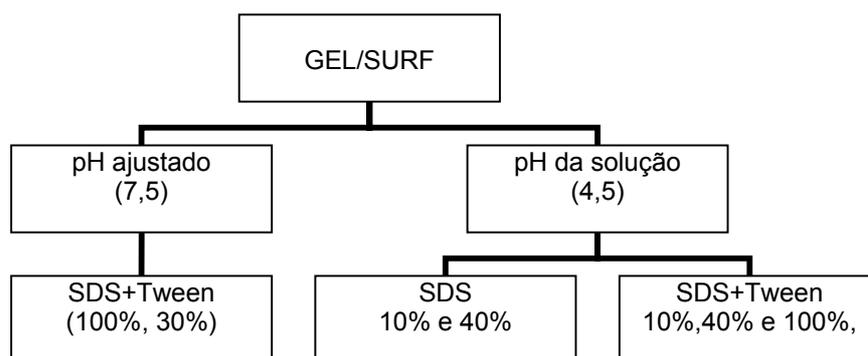


Figura 10. Formulações elaboradas a base de gelatina e surfactantes (SDS, Tween, e mistura de ambos), com ajuste de pH e com o pH natural da solução.

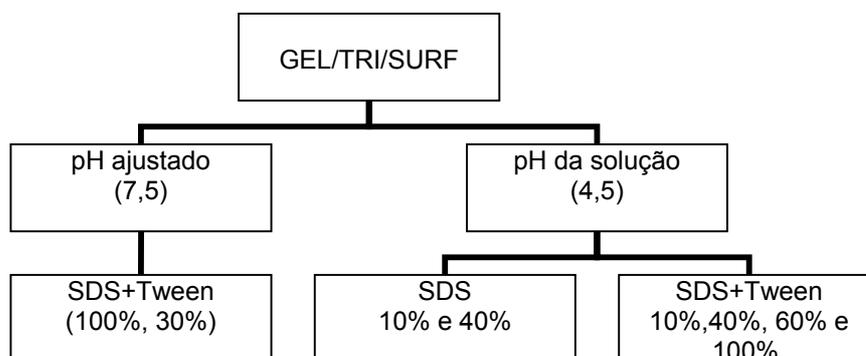


Figura 11. Formulações feitas a base de gelatina, triacetina e surfactantes(SDS, Tween e mistura de ambos), com ajuste de pH e com o pH natural da solução.

3.4 Caracterização dos filmes

3.4.1 Aspecto visual

Após a secagem dos filmes foram realizadas análises visuais e táteis para cada tipo de filme elaborado, visando utilizar apenas os filmes que fossem homogêneos em relação a coloração, espessura, sem a presença de partículas insolúveis e oleosidade e que fossem contínuos, isto é, sem apresentar rupturas ou zonas quebradiças, e facilidade na retirada dos filmes do suporte,

apresentando boa manuseabilidade. Os filmes e formulações que não apresentaram essas características foram descartados.

3.4.2 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada utilizando-se um micrômetro digital (modelo MDC-25M, Mitutoyo, MFG, Japão). 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 a temperatura de 25°C, 52 ± 2% de umidade relativa, durante 48 h.

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). As amostras de cada filme foram seladas com parafina em células de permeação de alumínio, contendo cloreto de cálcio. Essas células foram acondicionadas em dessecadores a 25°C e 75% UR. O ganho de massa do sistema, medido em intervalos de 24h, durante 7 dias. As análises foram realizadas em triplicata. A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinado através da equação 1.

$$PVA = \frac{M_p \times e}{A \times t \times \Delta p} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

PVA = permeabilidade ao vapor de água

M_p = diferença de peso (quantidade de permeante que atravessa o filme) (g)

A = área exposta do filme (m²)

Δp = diferença de pressão de vapor de água a 75% UR e 0% UR, ambos a 25°C (Pa)

e = espessura (mm)

t = tempo no qual ocorre ganho de massa (h)

3.6 Solubilidade em água

A análise de solubilidade (SOL) em água dos filmes foi realizada em triplicata seguindo o método proposto por GONTARD et al. (1992). Inicialmente, três discos de cada amostra de filme com 2 cm de diâmetro, foram imersos em 50 ml de água destilada, mantidos sob agitação lenta e periódica por 24 h à temperatura ambiente (25°C) em banho-maria (Tecnal, TE057). Os fragmentos de filme restante foram então retirados do banho e secos em estufa (105°C, 24 h) para determinação da massa seca final dos mesmos. O cálculo da solubilidade foi realizado de acordo com a seguinte equação da seguinte forma:

$$SOL = \frac{M_i - M_f}{M_i} \cdot 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Onde:

SOL: porcentagem de material solubilizado (%)

M_i : massa inicial da amostra (g)

M_f : massa final da amostra (g)

3.7 Propriedades mecânicas

A tensão na ruptura e a 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 25 mm de largura. A distância inicial de separação das garras e velocidade de realização do teste foram fixadas em 50 mm e 3 mm/s, respectivamente.

A tensão na ruptura foi calculada dividindo-se a força máxima no rompimento do filme, pela área de secção transversal de acordo com a Equação

2. 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 e CHINNAN, 1999). A média das espessuras requeridas para o cálculo da área seccional foi determinada utilizando-se 5 medidas obtidas ao longo do filme, após o período de acondicionamento a temperatura de 25°C, 52 ± 2% de umidade relativa, durante 48 h.

Equação (3)

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

Onde:

TR = Tensão na ruptura (MPa)

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

A : área de secção transversal (m²)

Equação (4)

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

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 (5cm)

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

3.8 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 padrão branco e um padrão preto. A opacidade foi determinada através da equação (Hunterlab, 1997):

$$Op = \left(\frac{Op_N}{Op_B} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação (5)}$$

Onde:

O_p = opacidade do filme (%)

O_{p_N} = opacidade do filme sobreposto a um fundo preto

O_{p_B} = opacidade do filme sobreposto a um fundo branco.

3.9 Microscopia ótica

A morfologia de superfície dos filmes foram observadas utilizando-se microscópio ótico JENVAL (MO 03.01.B), com objetiva de 25x . A captação de imagens foi realizada pelo software “GLOBAL LAB IMAGE”. Os filmes após o período de acondicionamento, foram cortados retangularmente (2 cm x 1 cm) e fixados na lâmina com fita adesiva e então a lâmina foi observada diretamente .

3.10 Microscopia eletrônica de varredura

A microestrutura dos filmes foi avaliada utilizando-se microscópio eletrônico de varredura (JEOL SCANNING MICROSCOPE – JMS-5800LV) a 10 kV (BERTAN, 2003). Os filmes foram colocados em dessecadores contendo sílica gel (25°C), por um período de sete dias, após os quais foram fragmentados. As amostras dos filmes fragmentadas 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, Baltec, Lichtenstein, Áustria), a 25°C e pressão de 2×10^5 Torr por 180s. As amostras recobertas foram observadas em microscópio eletrônica de varredura a 10 kv. Foram realizadas observações na espessura e na superfície dos filmes. Para observar a espessura dos filmes, estes foram colocados sob suportes com recorte em L, (Figura 12) permitindo que a espessura do filme pudesse ser observada.

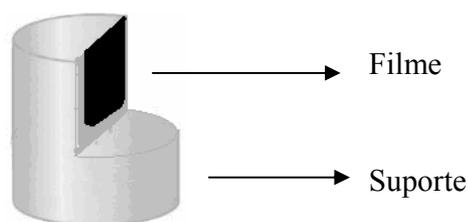


Figura 12. Suporte com recorte em L, utilizado para fixação do filme.

3.11 Microscopia confocal de varredura a laser (MCLV)

A microestrutura dos filmes foi avaliada utilizando-se microscopia de varredura laser confocal, de acordo com a metodologia proposta por SCHREIBER e HAIMOVICH (1983) utilizando-se microscópio confocal Olympus LSM-Fluoview versão 3.2 (Olympus, Tóquio, Japão). A gelatina solubilizada após hidratação foi corada com o corante FITC (isotiocianato de fluoresceína) específico para proteína, com a concentração modificada (50 μ l/2,5g de proteína). Após a adição, a solução de proteína contendo o corante foi homogeneizada sob agitação magnética lenta na temperatura de 40°C por uma hora. Em seguida a triacetina; e os ácidos graxos esteárico (10%) e capríco (5%) foram corados com o corante “NILE RED” (1mg/30g de substância hidrofóbica), segundo a metodologia proposta por LAMPRECHT; SCHAFER; LEHR (2000). Passado o tempo necessário para reagir o 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 coradas foram levadas a outro banho maria a 50-60°C por 30 minutos sob agitação leve. A solução filme formadora foi aplicada então sobre as placas plaxiglass e o controle da espessura, secagem e armazenamento foram realizados como na etapa 3.3.1. As condições utilizadas para a microscopia confocal se encontram no anexo 1. As observações foram feitas na metade da espessura dos filmes.

3.12 Isotermas de sorção

As isotermas de sorção para os filmes à base de gelatina, triacetina, ácidos graxos (esteárico ou capróico) e surfactantes (SDS e Tween 80), foram determinadas gravimetricamente de acordo com (JOWITT et al., 1983) na temperatura de 25°C (LIM et al., 1999)

Os biofilmes foram colocados em dessecadores com sílica gel durante sete dias para serem secos, após esta etapa foram cortados em pedaços pequenos (aproximadamente 2 x 2 cm), pesados (cerca de 0,5 g) e acondicionados em recipientes com diferentes umidades relativas conhecidas (Tabela 1) em câmaras de temperatura controlada a 25°C (BOD TECNAL, MODELO TE-390). As soluções salinas saturadas foram escolhidas de modo a abranger uma ampla faixa de atividade de água (0,114 a 0,904). Uma vez alcançado o equilíbrio, num período de aproximadamente 30 dias, os filmes foram pesados para se obter o peso final e construir as isotermas de sorção. Os testes de adsorção foram feitos em triplicata.

Tabela 3. Atividade de água das soluções salinas saturadas a 25°C

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

Fonte: Labuza; Kanane; Chen, 1986.

Os modelos GAB (Guggenheim-Anderson-De Bôer) foi utilizado para representação das isotermas de sorção dos filmes (Equação 6) e foram ajustados aos dados experimentais através do programa Water Analyser Series – Isoterm//GAB program version 2.05p. (Macintosh) para estimar as constantes do modelo.

$$GAB X = \frac{xm.c.k.aw}{(1-k.aw)(1-k.aw+c.k.aw)} \quad \text{Equação (6)}$$

X= teor umidade do filme (em base seca)

Xm= teor de umidade da monocamada

c e k = constantes do modelo de isothermas de sorção relacionadas a energia de interação de moléculas adsorvidas no primeiro e no mais externo sítio individual de adsorção

aw = atividade de água

3.13 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A determinação da temperatura de fusão e da entalpia (ΔH) foram realizadas por análise calorimétrica de varredura, utilizando-se um DSC TA 7/DX, marca (Perkin Elmer) com resfriamento intracooler. As amostras (10,0 a 18,0 mg) foram acondicionadas em cápsulas de alumínio mantidos em dessecadores com sílica gel por um período de sete dias. Após esse período as cápsulas foram novamente pesadas e seladas hermeticamente. As análises foram feitas em duplicata, utilizando taxa de aquecimento de 10°C/min, entre 0 a 130°C. A referência foi sempre uma cápsula vazia. O equipamento foi calibrado com Indium.

3.14 Análise Estatística

As análises estatísticas de variância (ANOVA) foram realizadas utilizando-se o programa estatístico "Statistical Analytical System" (SAS, 1992). As diferenças significativas entre as médias foram identificadas através do teste de Tukey ($p < 0,05$).

4. Resultados e Discussão

4.1 Ensaio preliminares para a definição da concentração de surfactantes e suas misturas

Em trabalhos anteriores como o de BERTAN (2003), foi observado que os filmes de gelatina, triacetina e ácidos graxos tiveram uma boa distribuição da substância hidrofóbica, embora tenha ficado evidente que não ocorreu uma incorporação homogênea dos componentes hidrofóbicos na matriz protéica. Com o objetivo de melhorar a incorporação das substâncias hidrofóbicas na matriz protéica foram adicionados os surfactantes que são compostos que possuem duas regiões distintas na mesma molécula, uma região polar e outra não polar, podendo assim melhorar a estabilidade das substâncias hidrofóbicas na matriz protéica. Segundo MORRILON et. al., (2002), quanto maior o número de carbonos na estrutura lipídica, mais difícil será a incorporação dos compostos hidrofóbicos na solução protéica. Sendo assim foram utilizados neste trabalho dois ácidos graxos, o ácido capróico (6C) e o ácido esteárico (18C). Para a escolha das melhores concentrações dos surfactantes SDS e Tween 80, e suas respectivas misturas, foram feitos vários testes com variação na temperatura, pH e quantidade de surfactante. A maioria das formulações escolhidas foram as que apresentaram-se transparentes nas menores temperaturas, devido a dificuldade de secagem dos filmes a temperaturas altas.

As Figuras 13, 14, 15 e 16 apresentam os resultados que definiram a concentração de surfactantes. Eles foram obtidos baseado na metodologia já descrita em materiais e métodos com variação na temperatura e variação de surfactante/mistura, e o resultado (opaco/transparente) observado visualmente.

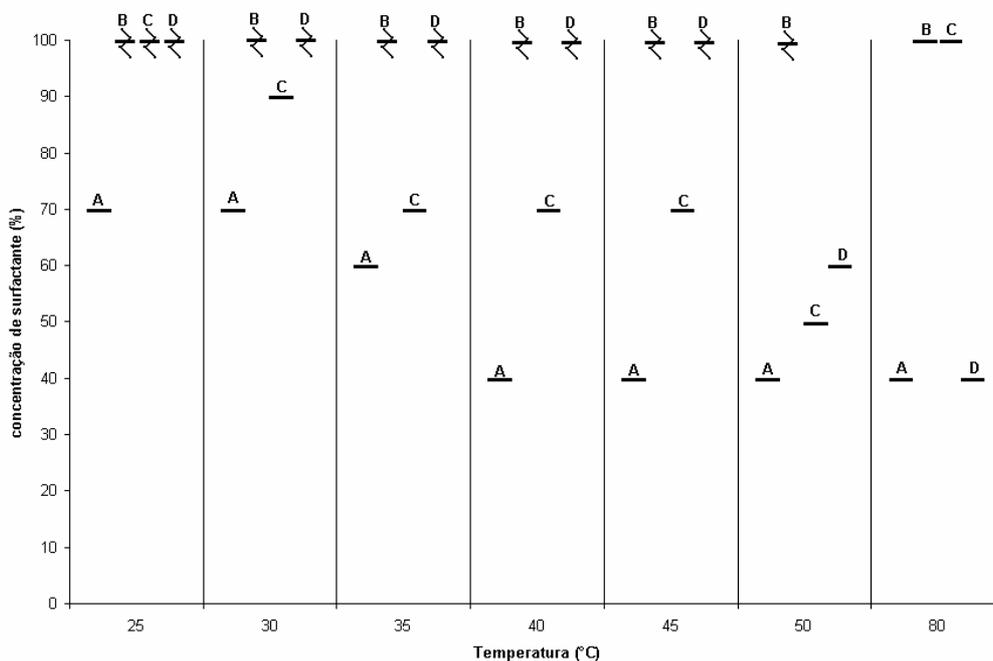


Figura 13. Definição da concentração de surfactantes em relação à variação de temperatura para uma mistura de ácido esteárico, surfactante e água (com ou sem ajuste de pH). As pequenas barras horizontais (—) representam o primeiro binômio de Concentração de surfactante X Temperatura no qual a mistura passou de opaca (abaixo da barra) para transparente (acima da barra). As barras horizontais com um traço no meio (↔) representam os tratamentos nos quais, mesmo com a adição de 100% de surfactantes (em relação a gelatina, em base seca), não observou-se transparência. Os tratamentos são discriminados pelas letras maiúsculas: **A** –SDS; **B** –Tween 80; **C** –Tween 80, com ajuste de pH; **D** –SDS, com ajuste de pH

Para o SDS em temperaturas mais baixas foi necessário a adição de uma maior quantidade de surfactantes para que a solução se tornasse transparente. Para este surfactante com ajuste de pH foi observado o mesmo comportamento. O Tween só apresentou soluções transparentes para 100% de surfactante a temperatura de 80°C e com o ajuste de pH as soluções transparentes foram obtidas nas condições 50°C/60% de Tween e 80°C/40% de Tween (Figura 13).

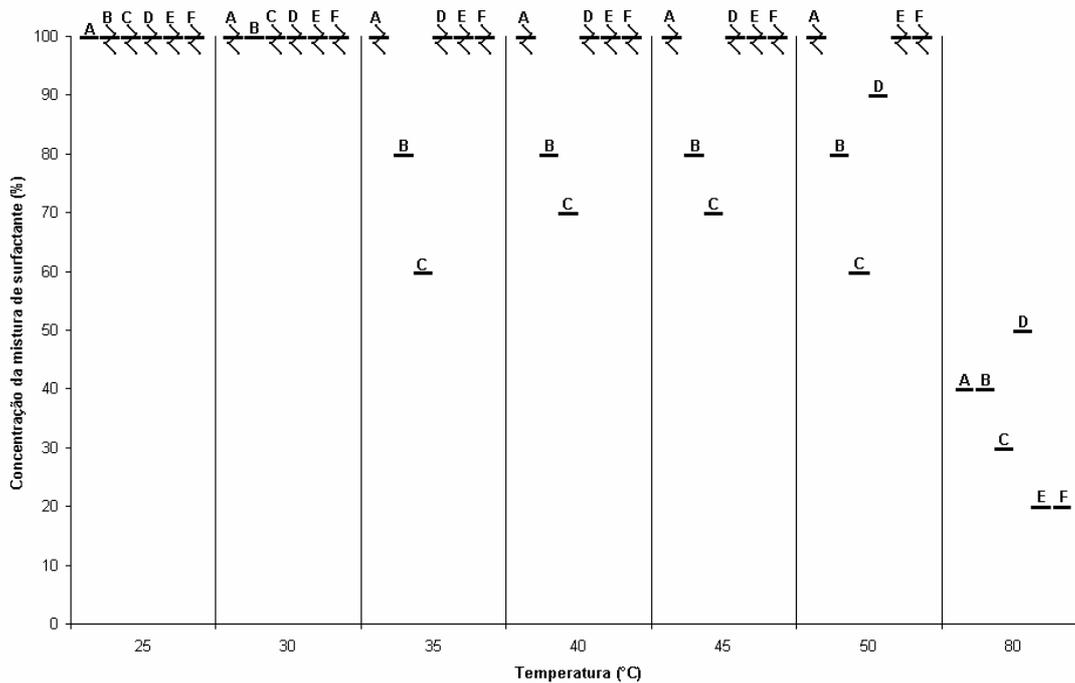


Figura 14. Definição da concentração de surfactantes em relação a variação de temperatura para uma mistura de ácido esteárico, surfactante e água (com ou sem ajuste de pH). As pequenas barras horizontais (—) representam o primeiro binômio de Concentração de surfactante X Temperatura no qual a mistura passou de opaca (abaixo da barra) para transparente (acima da barra). As barras horizontais com um traço no meio (≡) representam os tratamentos nos quais, mesmo com a adição de 100% de surfactantes (em relação a gelatina, em base seca), não observou-se transparência. Os tratamentos são discriminados pelas letras maiúsculas: **A** – 25% SDS e 75% Tween; **B** – 50% SDS e 50% Tween 80; **C** – 75% SDS e 25% Tween 80; **D** – 25% SDS e 75% Tween 80, com ajuste de pH; **E** – 75% SDS e 25% Tween 80, com ajuste de pH e **F** – 50% SDS e 50% Tween 80, com ajuste de pH.

Entre as temperaturas de 25°C e 50°C foram necessárias adições de misturas de surfactantes acima de 60% para obtenção de soluções transparentes contendo ácido esteárico, água e proporções dessas misturas. Na temperatura de 80°C foi observada uma redução considerável na quantidade de surfactante adicionado para obtenção de soluções transparentes (inferiores a 50%). O ponto de fusão de 70°C do ácido esteárico provavelmente tenha sido o principal responsável por esse comportamento observado. O ajuste de pH proporcionou as duas menores concentrações das misturas (Figura 14).

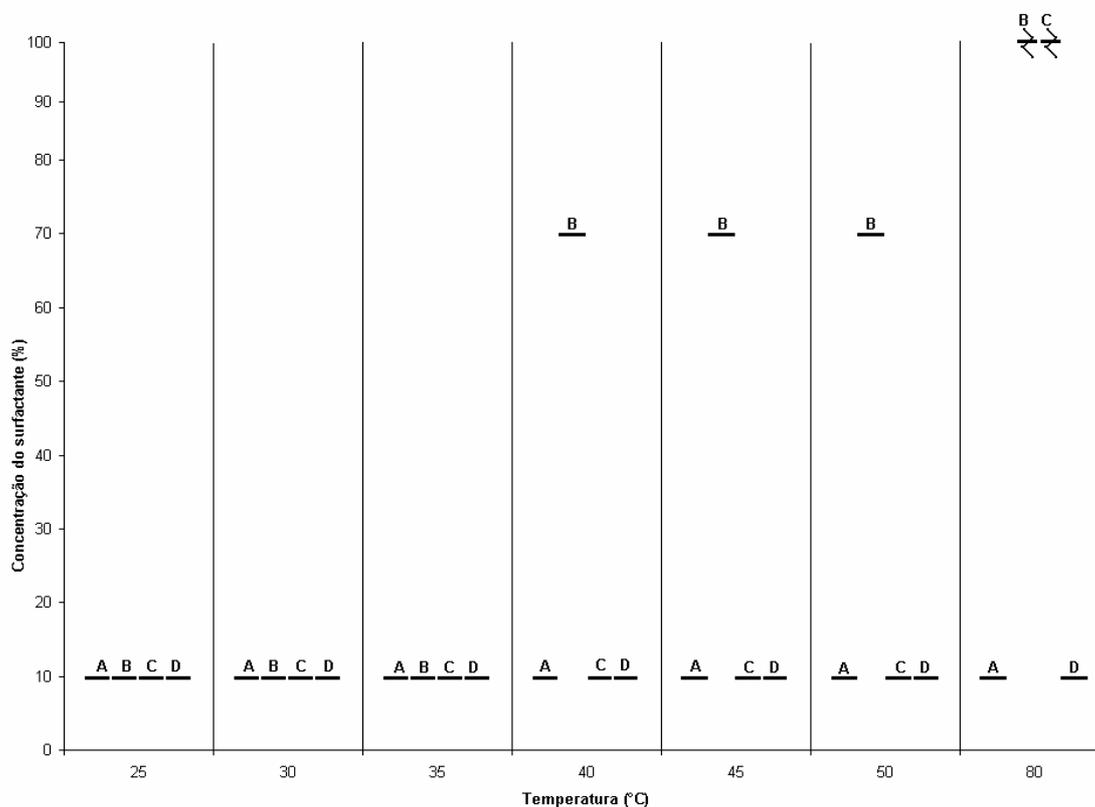


Figura 15. Definição da concentração de surfactantes em relação a variação de temperatura para uma mistura de ácido capróico, surfactante e água (com ou sem ajuste de pH). As pequenas barras horizontais (—) representam o primeiro binômio de Concentração de surfactante X Temperatura no qual a mistura passou de opaca (abaixo da barra) para transparente (acima da barra). As barras horizontais com um traço no meio (≡) representam os tratamentos nos quais, mesmo com a adição de 100% de surfactantes (em relação a gelatina, em base seca), não observou-se transparência. Os tratamentos são discriminados pelas letras maiúsculas: **A** –SDS; **B** –Tween 80; **C** –Tween 80, com ajuste de pH; **D** –SDS, com ajuste de pH

Para a utilização do SDS com o ácido capróico foi observado que para qualquer temperatura estudada, a adição de 10% desse surfactante foi suficiente para obtenção de soluções transparentes. Para o surfactante Tween adicionado ao ácido capróico foi observado que nas temperaturas de 25, 30, 35°C foi necessário a adição de 10% da concentração de surfactante para a solução se tornar transparente e para as temperaturas de 40, 45 e 50°C foi necessário a adição de 70% de surfactante. O ajuste do pH apresentou soluções transparentes em concentrações baixas de surfactantes (Figura 15).

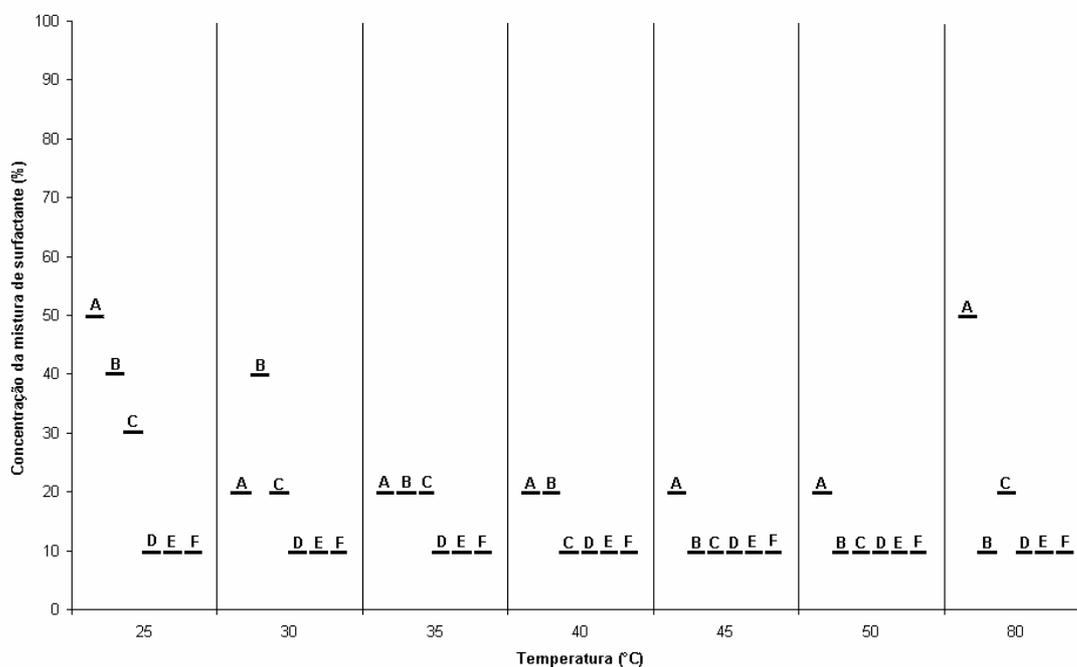


Figura 16. Definição da concentração de surfactantes em relação a variação de temperatura para uma mistura de ácido capróico, surfactante e água (com ou sem ajuste de pH). As pequenas barras horizontais (—) representam o primeiro binômio de Concentração de surfactante X Temperatura no qual a mistura passou de opaca (abaixo da barra) para transparente (acima da barra). As barras horizontais com um traço no meio (≡) representam os tratamentos nos quais, mesmo com a adição de 100% de surfactantes (em relação a gelatina, em base seca), não observou-se transparência. Os tratamentos são discriminados pelas letras maiúsculas: **A** – 25% SDS e 75% Tween; **B** – 50% SDS e 50% Tween 80; **C** – 75% SDS e 25% Tween 80; **D** – 25% SDS e 75% Tween 80, com ajuste de pH; **E** – 50% SDS e 50% Tween 80, com ajuste de pH. **F** – 75% SDS e 25% Tween 80, com ajuste de pH e

Para a composição contendo ácido capróico, mistura de surfactantes e água foi observado que o aumento da quantidade de SDS na mistura permitiu a utilização de uma menor quantidade de mistura dos surfactantes. Para todas as soluções contendo misturas de surfactantes com ajuste de pH a adição de surfactante necessária para torná-las transparentes foi de 10% (Figura 16).

Após esses ensaios foram selecionadas as melhores formulações, de acordo com a temperatura, pH e concentração de surfactante, que foram analisadas no decorrer do trabalho.

4.2 Aspecto visual dos filmes

Os filmes selecionados apresentaram aspecto uniforme e uma certa maleabilidade, que os tornavam fáceis ao manuseio além de permitirem fácil remoção do suporte. Os filmes que não apresentaram essas características foram excluídos do trabalho.

4.3 Espessura dos filmes

Os filmes foram elaborados a partir de alíquotas que os deixaram com espessuras semelhantes entre si, na faixa de 0,087 a 0,095 (Tabelas 4, 5, 6, 7 e 8). O controle da espessura foi importante para manter a uniformidade dos filmes e assegurar as comparações realizadas entre suas diversas propriedades.

4.4 Permeabilidade ao vapor de água

Os resultados de permeabilidade ao vapor de água dos biofilmes à base de gelatina, triacetina e ácidos esteárico ou capróico sem e com o ajuste de pH podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4. Permeabilidade ao vapor de água (PVA), para filmes à base de gelatina, triacetina e ácidos esteárico ou capríco com e sem o ajuste de pH.

Formulações	Espessura (mm)	PVA(g.mm/m ² d.KPa)
Gel	0,089 ± 0,002	6,1 ± 0,41 ^c
Gel (pH)*	0,087 ± 0,003	6,6 ± 0,58 ^c
Gel/tri	0,089 ± 0,004	6,0 ± 0,37 ^c
Gel/tri (pH)*	0,088 ± 0,005	5,9 ± 0,42 ^c
Gel/tri/AE	0,093 ± 0,002	8,2 ± 0,35 ^b
Gel/tri/AE (pH)*	0,091 ± 0,002	2,4 ± 0,29 ^d
Gel/tri/AC	0,089 ± 0,001	9,5 ± 0,51 ^a
Gel/tri/AC (pH)*	0,088 ± 0,002	7,1 ± 0,34 ^{b c}

Gel: Gelatina, Tri: triacetina. Media e desvio das triplicatas.*-Correção de pH. Nota: Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

Os filmes de gelatina e gelatina e triacetina não apresentaram permeabilidades ao vapor de água diferentes ($p \leq 0,05$), mesmo com o ajuste de pH, obtendo-se valores intermediários entre 6,6 e 5,9. De acordo com BERTAN (2003) os filmes de gelatina e triacetina mostraram-se mais permeáveis ao vapor de água que os filmes compostos de gelatina e ácidos graxos. Isso deve-se ao caráter hidrofílico da gelatina, que induz a interação com a água, aumentando desta forma a permeabilidade ao vapor de água.

O ajuste de pH para filmes adicionados de ácidos graxos afetou os valores de PVA. A alteração do pH de 4,5 para 7,5 provocou a diminuição significativa ($p \leq 0,05$), da PVA dos filmes contendo ácido esteárico e ácido capríco, sendo que a redução mais acentuada ocorreu para o filme adicionado de ácido esteárico que apresentou valores de 8,2g.mm/m²KPa, sem ajuste de pH, e 2,4 g.mm/m²KPa com o pH ajustado.

De acordo com YOSHIDA (2002), o aumento da hidrofobicidade, representada pela concentração de ácido esteárico, provocou a redução na permeabilidade ao vapor de água, com valores menores para filmes obtidos em pH básico (9,0) do que em pH neutro. A presença de ácido esteárico reduziu a

mobilidade protéica, que formou um filme viscoelástico na interface lipídio-água, diminuindo a difusividade da água através da proteína interfacial, promovendo um menor valor de permeabilidade ao vapor de água (McHUGH e KROCHTA, 1994c).

Os filmes compostos com ácido esteárico (18C) apresentaram permeabilidade ao vapor de água menor que os filmes compostos com ácido capríco (6C). Segundo McHUGH e KROCHTA (1994), com o aumento das cadeias de ácidos graxos a porção apolar de cada molécula também aumenta, resultando em menor permeabilidade ao vapor de água dos filmes emulsionados. PEROVAL et. al. (2002), também constataram que a permeabilidade ao vapor de água dos filmes de arabinosilana com ácido esteárico foi menor que a dos filmes com a adição de ácido palmítico.

McHUGH e KROCHTA (1994) e SHELLHAMMER e KROCHTA (1997), verificaram que a redução da permeabilidade ao vapor de água em filmes compostos por concentrado protéico de soro de leite e cera de abelha estava diretamente relacionada com o tamanho da partícula lipídica, onde o decréscimo no tamanho promoveu uma melhor interação da proteína com a cera.

Por outro lado, o aumento no pH, pode provocar uma saponificação dos ácidos graxos, melhorando a incorporação e conseqüentemente redução da permeabilidade ao vapor de água. A maior redução observada para o ácido esteárico pode ser decorrência do tamanho de sua cadeia por ter sido utilizado em maior quantidade na elaboração dos filmes.

Inicialmente todas as formulações deveriam ser feitas com e sem o ajuste de pH. No entanto para muitas delas o ajuste de pH produziu filmes inadequados o que impossibilitou sua comparação para várias formulações.

Na Tabela 5 pode-se observar os resultados da permeabilidade ao vapor de água, para filmes à base de gelatina, gelatina e triacetina, gelatina, triacetina, ácidos graxos e surfactantes

Tabela 5. Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina, triacetina e ácido caprótico com adição de surfactantes.

Formulações	Espessura (mm)	PVA (g.mm/m ² d.Kpa)
Gel/tri/AC	0,089 ± 0,001	9,5 ± 0,58 ^{a b}
Gel/tri/AC(pH)	0,088 ± 0,002	7,1 ± 0,68 ^{c d}
Gel/tri/AC/10%tween 80*	0,090 ± 0,003	6,7 ± 0,47 ^{c d e}
Gel/tri/AC/10%tween 80(pH) ^{***}	0,089 ± 0,002	4,4 ± 0,62 ^f
Gel/tri/AC/10%SDS(pH) ^{***}	0,090 ± 0,001	4,7 ± 0,36 ^f
Gel/tri/AC/(75%SDSe25%tween 80)=30%**	0,092 ± 0,004	2,4 ± 0,49 ^g
Gel/tri/AC/(75%SDSe25%tween 80)=30%** (pH) ^{***}	0,091 ± 0,002	5,3 ± 0,53 ^{e f}
Gel/tri/AC/(75%SDSe25%tween 80)=10%**	0,089 ± 0,004	8,2 ± 0,48 ^{b c}
Gel/tri/AC/(75%SDSe25%tween 80)=10%** (pH) ^{***}	0,090 ± 0,005	4,8 ± 0,35 ^f
Gel/tri/AC/(50%SDSe50%tween)=40%**	0,093 ± 0,002	3,7 ± 0,61 ^{f g}
Gel/tri/AC/(50%SDSe50%tween)=40%** (pH) ^{***}	0,092 ± 0,003	5,2 ± 0,54 ^{e f}
Gel/tri/AC/25%SDSe75%tween=50%**	0,094 ± 0,002	11,2 ± 0,38 ^a
Gel/tri/AC/(25%SDSe75%tween)=50%** (pH) ^{***}	0,092 ± 0,001	8,3 ± 0,45 ^{b c}
Gel/tri/AC/(50%SDSe50%tween)=20%**	0,092 ± 0,003	5,4 ± 0,63 ^{d e f}
Gel/tri/AC/25%SDSe75%tween=10%** (pH) ^{***}	0,093 ± 0,001	6,7 ± 0,42 ^{c d e}
Gel/tri/AC/(50%SDSe50%tween)=10%**	0,091 ± 0,002	9,5 ± 0,51 ^{a b}
Gel/tri/AC/25%SDSe75%tween=10%**	0,090 ± 0,002	10,1 ± 0,39 ^a

Gel: Gelatina, Tri: triacetina, AC: ácido caprótico. Media e desvio das triplicatas. . *%de surfactante total adicionado em relação a quantidade de gelatina (base seca). **% de cada surfactante da mistura. ***Ajuste de pH Nota: Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

Para as formulações com adição de 10% de Tween 80 foi observado que houve uma redução significativa ($p \leq 0,05$) da permeabilidade para os filmes com pH 7,5. Quando o Tween 80 foi substituído pelo SDS (Gel/tri/AC/10%tween 80). Nos filmes produzidos no pH 7,5 observou-se que as permeabilidades ao vapor de água foram muito próximas. Segundo DEBEAUFORT e VOILLEY, (1995), a eficiência dos emulsificantes dependem principalmente da natureza química do surfactante e do valor de HLB. A permeabilidade dos filmes

comestíveis depende fortemente da estrutura do filme, do número e homogeneidade da distribuição dos glóbulos de gordura no filme .

Para as formulações contendo misturas dos surfactantes com concentrações maiores de SDS, (75%SDS e 25% Tween 80), foi verificado que o ajuste de pH provocou aumento significativo ($p \leq 0,05$). Na permeabilidade ao vapor de água. Resultados semelhantes foram observados por PEREZ-GAGO e KROCHTA (1999), onde foram encontrados maiores permeabilidades ao vapor de água em filmes no pH 7,0, porém a redução do pH provocou aumento para concentrações de 10% de surfactantes.

Já nas formulações com misturas de concentração de surfactantes iguais entre si (50% SDS e 50% Tween 80), não foi observado diferença significativa quando o pH foi ajustado. Para os filmes com a mesma concentração de mistura de surfactantes (50%SDS e 50% Tween 80) nas concentrações de 10% e 20%, sem o ajuste de pH, verificou-se que a permeabilidade ao vapor de água foi significativamente inferior para concentrações de 10% de surfactantes.

Para as formulações de misturas de surfactantes, onde a quantidade de SDS é menor do que a de Tween 80 (25% SDS e 75% Tween 80) verificou-se que a permeabilidade ao vapor de água foi significativamente inferior que a permeabilidade dos filmes produzidos no pH natural das soluções filmogênicas.

A Tabela 6 apresenta os valores de permeabilidade ao vapor de água para filmes produzidos com gelatina, triacetina, ácido esteárico e surfactantes (SDS e Tween 80).

Tabela 6. Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina, triacetina e ácido esteárico, com diferentes concentrações e tipos de surfactantes.

Formulações	Espessura(mm)	PVA(g.mm/m ² d.Kpa)
Gel/tri/AE	0,093 ± 0,002	8,8 ± 0,56 ^a
Gel/tri/AE(pH) ^{***}	0,091 ± 0,002	2,4 ± 0,25 ^e
Gel/tri/AE/70%SDS*	0,095 ± 0,006	1,9 ± 0,38 ^e
Gel/tri/AE/40%SDS*	0,093 ± 0,002	2,9 ± 0,62 ^{d e}
Gel/tri/AE/10%SDS*	0,092 ± 0,004	4,7 ± 0,25 ^{b c}
Gel/tri/AE/60%SDS(pH)	0,093 ± 0,004	2,5 ± 0,49 ^{d e}
Gel/tri/AE/(75SDS/25%tween 80)=100%	0,091 ± 0,003	3,9 ± 0,29 ^{c d}
Gel/tri/AE/(50%SDS/50%tween 80)=100%	0,090 ± 0,002	2,5 ± 0,43 ^{d e}
Gel/tri/AE/50%SDS/50%tween 80(pH)=100%	0,092 ± 0,003	2,6 ± 0,61 ^{d e}
Gel/tri/AE/(25%SDSe75%tween 80)**=100%	0,091 ± 0,002	5,6 ± 0,37 ^b
Gel/tri/AE/100%tween 80	0,094 ± 0,005	8,3 ± 0,42 ^a

Gel: Gelatina, Tri: triacetina, AE: ácido esteárico. Média e desvio das triplicatas. *%de surfactante total adicionado em relação a quantidade de gelatina (base seca). **% de cada surfactante da mistura. ***Ajuste de pH. Nota: Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

Os filmes de gelatina, triacetina, ácido esteárico e SDS produzidos com maiores concentrações (Gel/tri/AE/70%SDS, Gel/tri/AE/40%SDS e Gel/tri/AE/60%SDS (pH)), apresentaram reduzida permeabilidade ao vapor de água, quando comparada aos demais filmes. Porém ao se comparar estas formulações com concentrações menores de SDS (Gel/tri/AE/10%SDS) observa-se aumento significativo ($p \leq 0,05$) na PVA. O aumento do pH parece não ter sido determinante quando o surfactante foi adicionado as formulações.

O filme contendo gelatina, triacetina, ácido esteárico e 70%SDS apresentou reduzido valor de PVA (1,92 g.mm/m²d.Kpa) enquanto o mesmo filme contendo 60%SDS e pH 7,5 teve a PVA elevada para 2,53 g.mm/m²d.Kpa, um valor ainda baixo entre os obtidos para formulações similares. Estes dois valores não apresentam diferença significativa.

O efeito da adição de surfactantes sobre a permeabilidade ao vapor de água de filmes produzidos apenas com gelatina estão apresentados na tabela 7. A adição de SDS nas concentrações de (10% e 40% em relação a massa seca de gelatina) provocou redução significativa ($p \leq 0,05$) da permeabilidade ao vapor de água. Segundo RHIM et al., (2002), filmes contendo 10% ou mais de SDS apresentaram valores de permeabilidade ao vapor de água inferiores aos dos filmes controle de isolado protéico de soja, melhorando assim a funcionalidade dos filmes de isolado protéico de soja.

Tabela 7. Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina e surfactantes (SDS e Tween).

Formulações	Espessura(mm)	PVA(g.mm/m ² d.Kpa)
Gel/10%SDS*	0,092 ± 0,003	8,8 ± 0,36 ^a
Gel/40%SDS*	0,094 ± 0,004	3,2 ± 0,61 ^c
Gel/50%SDSe50%tween 80(pH)=100%*	0,089 ± 0,002	1,9 ± 0,39 ^c
Gel/50%SDSe50%tween 80=40%*	0,091 ± 0,004	3,2 ± 0,54 ^c
Gel/50%SDSe50%tween 80=100%*	0,087 ± 0,001	4,6 ± 0,32 ^b
Gel/75%SDSe25%tween80=30%(pH)***	0,093 ± 0,002	4,2 ± 0,61 ^{b c}
Gel/75%SDSe25%tween 80=10%**	0,0092 ± 0,001	9,0 ± 0,29 ^a

Gel: Gelatina. Media e desvio das triplicatas. *%de surfactante total adicionado em relação a quantidade de gelatina (base seca). **% de cada surfactante da mistura. ***Ajuste de pH. Nota: Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

A substituição de parte do SDS por Tween 80 (75% de SDS e 25% Tween 80) para uma adição total de 10% de surfactantes, não afetou estatisticamente o valor da permeabilidade ao vapor de água ($p \leq 0,05$), o mesmo ocorreu para uma adição de 40% de surfactantes com substituição de 50% do SDS por Tween 80 (50%SDS e 50% Tween 80).

O ajuste de pH da solução de gelatina produziu um filme com permeabilidade ao vapor de água estatisticamente menor que o da solução sem o ajuste de pH, para uma mistura de surfactantes de 50% SDS e 50% Tween 80.

As permeabilidades ao vapor de água dos biofilmes produzidos com gelatina, triacetina e surfactantes, sem a presença de ácidos graxos são apresentadas na tabela 8.

Tabela 8. Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina, triacetina e surfactantes (SDS e Tween)

Formulações	Espessura	PVA(g.mm/m ² d.Kpa)
Gel/tri/(75%SDSe25%tween 80)=10%*	0,087 ± 0,001	8,4 ± 0,69 ^a
Gel/tri/10%SDS*	0,088 ± 0,003	6,8 ± 0,61 ^b
Gel/tri/50%SDSe50%tween 80**=100%*	0,090 ± 0,004	1,5 ± 0,35 ^e
gel/tri/(50%SDSe50%tween 80)**=40%*	0,089 ± 0,002	4,4 ± 0,42 ^c
Gel/tri/(75%SDSe25%tween80)**=30%*(pH)***	0,0086 ± 0,005	2,5 ± 0,34 ^{d e}
Gel/tri/40%SDS*	0,087 ± 0,004	3,4 ± 0,61 ^{c d}
Gel/tri/(50%SDSe50%tween80)**(pH)***	0,0080 ± 0,005	2,0 ± 0,45 ^e
Gel/tri/(75%SDSe25%tween80)**=60%*	0,085 ± 0,002	2,0 ± 0,28 ^e

Gel: Gelatina, Tri: triacetina. Media e desvio das triplicatas. *-% de surfactante total adicionado a formulação. *-Proporção entre SDS e Tween 80 usados na misturas. ***Ajuste de pH. Nota: Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

O aumento da concentração de SDS de 10 para 40% em filmes contendo apenas Gelatina/triacetina/10%SDS e Gelatina/triacetina/40%SDS provocou uma diminuição da permeabilidade ao vapor de água, comportamento já observado para as mesmas adições aos filmes produzidos com gelatina pura. Segundo BERTAN (2003), os filmes apenas de gelatina e triacetina mostraram-se mais permeáveis ao vapor de água que os filmes compostos com gelatina, triacetina e ácidos graxos. A adição dos surfactantes, no entanto, parece ter possibilitado uma maior incorporação da triacetina ao filme de gelatina, produzindo filmes (Tabela 8) com menores permeabilidades ao vapor de água que os filmes contendo somente a gelatina e os surfactantes (Tabela 7). Os filmes obtidos com adição crescente

das misturas de surfactantes (75%SDS e 25% Tween 80) e (50% SDS e 50% Tween 80) apresentaram diminuição da PVA ($p \leq 0,05$) corroborando a possibilidade de melhor incorporação da triacetina na matriz filmogênica protéica.

A substituição de 25% do SDS por Tween 80 (comparação entre Gel/tri/10%SDS e Gel/tri/75%SDS e 25% Tween 80=10%), para uma concentração total de surfactantes de 10%, implicou em aumento significativo ($p \leq 0,05$) da permeabilidade ao vapor de água.

A correção de pH, para filmes produzidos com uma relação fixa de surfactantes de 50% SDS e 50% Tween 80, com 100% de adição em relação a gelatina, não interferiu significativamente nas permeabilidades ao vapor de água.

4.5 Solubilidade

Na Tabela 9 pode-se observar os valores de solubilidade e umidade obtidos para os filmes produzidos com gelatina, triacetina, ácido esteárico ou caprótico com e sem o ajuste de pH.

Tabela 9. Solubilidade e umidade dos filmes de gelatina, triacetina, ácidos esteárico, ácido caprótico com e sem o ajuste de pH.

Formulações	Solubilidade (%)	Umidade(%)
Gel/tri/AE	35,35 ± 0,25 ^g	16,23 ± 0,21 ^{b c d}
Gel/tri/AE(pH) ^{***}	29,33 ± 0,36 ⁱ	15,14 ± 0,18 ^{b c d e}
Gel/tri/AC	30,30 ± 0,69 ^{h i}	16,82 ± 0,36 ^{a b}
Gel/tri/AC (pH) ^{***}	38,68 ± 0,59 ^f	14,72 ± 0,28 ^{b c d e}

Gel: Gelatina, Tri: triacetina. Media e desvio das triplicatas. ^{***}Ajuste de pH Nota: Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

A solubilidade da proteína em água parece estar relacionada com a hidrofiliabilidade e a estrutura da matriz protéica resultante. A incorporação de um composto hidrofóbico na formulação de filmes protéicos reduz a capacidade da matriz filmogênica para ligar-se com moléculas de água (McHUGH e KROCHTA, 1994). A solubilidade é considerada uma propriedade importante na aplicação de filmes comestíveis como proteção de alimentos com alta atividade de água ou quando os filmes devem estar em contato com a água durante o processamento de cobertura do alimento (GONTARD, et. al., 1992; PEREZ-GAGO e KROCHTA, 2001).

A solubilidade em água dos filmes de gelatina, triacetina e ácido esteárico, apresentaram diferença significativa quando o pH foi ajustado, observando-se menor solubilidade com o ajuste de pH. Resultado semelhante foi encontrado por YOSHIDA (2002), que observou que quanto maior o pH da solução filmogênica, menor a solubilidade protéica, ou seja, ocorreu uma melhor formação da matriz filmogênica (proteína-lipídio) em pH 9,0, associados a menor quantidade de monômeros de proteína que não participaram da formação da matriz. Porém os resultados obtidos da solubilidade para o ácido capróico foram opostos ao do ácido esteárico, pois a formulação sem o ajuste de pH apresentou solubilidade menor que a formulação com o pH ajustado.

Na Tabela 10 estão apresentados os valores de solubilidade e umidade para filmes produzidos com gelatina, triacetina, ácido esteárico com e sem o ajuste de pH e surfactantes SDS e Tween 80.

Tabela 10. Solubilidade e Umidade dos filmes de gelatina, triacetina, ácido esteárico e surfactante (SDS e Tween 80).

Formulações	Solubilidade (%)	Umidade(%)
Gel/tri/AE	35,35 ± 0,39 ^h	16,23 ± 0,54 ^{cde}
Gel/tri/AE(pH) ^{***}	29,33 ± 0,26 ^j	15,14 ± 0,35 ^{cdef}
Gel/tri/AE/70%SDS*	91,85 ± 0,29 ^b	14,83 ± 0,36 ^{cdef}
Gel/tri/AE/40%SDS*	72,68 ± 0,46 ^k	15,14 ± 0,65 ^{cdef}
Gel/tri/AE/10%SDS*	53,43 ± 0,38 ^e	23,59 ± 0,26 ^a
Gel/tri/AE/(75SDS/25%tween 80)**=100%*	100,00 ± 0,0 ^a	12,26 ± 0,38 ^f
Gel/tri/AE/(50%SDS/50%tween 80)**=100%*	59,39 ± 0,36 ^d	12,80 ± 0,25 ^{ef}
Gel/tri/AE/(50%SDS/50%tween80)**=100%(pH) ^{***}	88,44 ± 0,69 ^c	16,33 ± 0,39 ^{cd}

Gel: Gelatina, Tri: triacetina, AE: ácido esteárico. Média e desvio das triplicatas. *%de surfactante total adicionado em relação a quantidade de gelatina (base seca). **% de cada surfactante da mistura. ***Ajuste de pH. Nota: Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

A solubilidade em água dos filmes de gelatina, triacetina, ácido esteárico e surfactantes, aumentou com a adição dos surfactantes. Nos filmes com o surfactante SDS verificou-se que o aumento da quantidade deste surfactante, provoca aumento da solubilidade dos filmes, isso pode ser devido a propriedade desnaturante que o SDS apresenta. Nas formulações com a adição das misturas do SDS e Tween, a formulação que o SDS (75%) se encontra em maior quantidade que o Tween (25%), os filmes foram totalmente solúveis. Para mistura de 50% de SDS e 50% de Tween, foi observado que o ajuste de pH aumentou a solubilidade do filme, resultado contrário ao observado para a formulação sem a adição do surfactante, onde o ajuste de pH diminuiu a solubilidade do filme resultante.

De um modo geral, a umidade dos filmes produzidos não variou significativamente, exceto para a formulação com adição de 10% de SDS, onde houve um aumento significativo de umidade 23,6% foi observado.

A Tabela 11 apresenta os valores de Solubilidade e Umidade para filmes produzidos com gelatina, triacetina, ácido capróico com e sem o ajuste de pH e surfactantes SDS e Tween 80.

Tabela 11. Solubilidade e Umidade dos filmes de gelatina, triacetina, ácido capróico e surfactante (SDS e Tween 80).

Formulações	Solub (%)	Umidade(%)
Gel/tri/AC	30,30 ± 0,61 ^{1j}	16,82 ± 0,29 ^{bc}
Gel/tri/AC (pH) ^{***}	38,68 ± 0,29 ^g	14,72 ± 0,38 ^{cde f}
Gel/tri/AC/(75%SDSe25%Tween) ^{**} =10%*	32,80 ± 0,35 ^{hi}	20,16 ± 0,28 ^{ab}
Gel/tri/AC/(75%SDSe25%Tween80) ^{**} =30%*(pH) ^{***}	42,85 ± 0,54 ^f	16,51 ± 0,41 ^{cd}
Gel/tri/AC/(50%SDSe50%tween 80) ^{**} =40%*	28,98 ± 0,31 ^j	13,07 ± 0,34 ^{def}

Gel: Gelatina, Tri: triacetina. Média e desvio das triplicatas. *%de surfactante total adicionado em relação a quantidade de gelatina (base seca). **% de cada surfactante da mistura. ***Ajuste de pH
 Nota: Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

Em relação solubilidade dos filmes de gelatina, triacetina, ácido capróico e surfactantes, foi observado que conforme o pH foi ajustado a solubilidade ficou maior, tanto para os filmes apenas com o ácido capróico, como também para os filmes com a adição da misturas dos surfactantes. Por outro lado a formulação com a maior concentração de surfactante e sem o ajuste de pH apresentou a menor solubilidade.

Para as umidades destes filmes não foi observado diferença significativa entre ambos, apenas o filme com 75% de SDS e 25% de Tween (com porcentagem de apenas 10% total de surfactante) apresentou umidade maior em relação aos outros filmes.

A Tabela 12 apresenta os valores de solubilidade para filmes produzidos com gelatina e surfactantes (SDS e Tween 80).

Tabela 12. Solubilidade e Umidade dos filmes de gelatina e surfactantes (SDS e Tween).

Formulações	Solub(%)	Umid(%)
Gel/10%SDS*	40,98 ± 0,061 ^d	15,10 ± 0,31 ^c
Gel/40%SDS*	34,80 ± 0,35 ^e	24,87 ± 0,32 ^a
Gel/(50%SDSe50%tween 80)**=100%	93,13 ± 0,39 ^a	19,70 ± 0,42 ^b
Gel/(50%SDSe50%tween 80)**=40%*	50,84 ± 0,31 ^c	16,05 ± 0,38 ^{b,c}
Gel/(50%SDSe50%tween 80)**=100%* (pH)***	93,93 ± 0,62 ^a	16,42 ± 0,34 ^{b,c}
Gel/(75%SDSe25%tween80)**=30%*(pH)***	77,28 ± 0,54 ^b	19,80 ± 0,51 ^b
Gel/(75%SDSe25%tween 80)**=10%*	49,15 ± 0,36 ^c	19,28 ± 0,39 ^{b,c}

Gel: Gelatina, Tri: triacetina. Media e desvio das triplicatas. *%de surfactante total adicionado em relação a quantidade de gelatina (base seca). **% de cada surfactante da mistura. ***Ajuste de pH
 Nota: Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

Para a solubilidade dos filmes de gelatina e surfactantes sem a adição dos ácidos graxos e de triacetina, foi observado que para os filmes contendo o surfactante SDS na concentração de (10% e 40%), a solubilidade diminuiu com a ausência dos ácidos graxos e da triacetina, porém nos filmes com a misturas dos surfactantes (SDS e Tween), sem a adição dos ácidos graxos e da triacetina, houve um aumento da solubilidade comparado com os filmes contendo os ácidos graxos (ácido esteárico e ácido capróico) e triacetina.

A Tabela 13 apresenta os valores de Solubilidade para filmes produzidos com Gelatina, Triacetina e surfactantes (SDS e Tween 80).

Tabela 13. Solubilidade e umidade dos filmes de gelatina, triacetina e surfactantes (SDS e Tween)

Formulações	Solub	Umíd
Gel/tri/75%SDSe25%tween 80**	36,43 ± 0,69 ^e	16,99 ± 0,36 ^{b c}
Gel/tri/10%SDS*	52,92 ± 0,29 ^c	10,08 ± 0,61 ^d
Gel/tri/50%SDSe50%tween 80**	70,08 ± 0,43 ^a	26,79 ± 0,41 ^a
Gel/tri/50%SDSe50%tween 80**=40%	35,33 ± 0,36 ^e	18,83 ± 0,52 ^b
Gel/tri/75%SDSe25%tween=30%** (pH)***	68,73 ± 0,81 ^a	23,89 ± 0,39 ^a
Gel/tri/40%SDS*	44,93 ± 0,65 ^d	12,76 ± 0,28 ^{c d}
Gel/tri/50%SDSe50%tween** (pH)***	29,96 ± 0,74 ^f	12,82 ± 0,68 ^{c d}
Gel/tri/75%SDSe25%tween=60%**	63,38 ± 0,45 ^b	16,65 ± 0,46 ^{b c}

Gel: Gelatina, Tri: triacetina. Média e desvio das triplicatas. *%de surfactante total adicionado em relação a quantidade de gelatina (base seca). **% de cada surfactante da mistura. ***Ajuste de pH
 Nota: Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

A adição da triacetina (Tabela 13) nos filmes contendo o surfactante SDS (10% e 40%) provocou um aumento na solubilidade dos filmes em relação aos filmes sem a triacetina (Tabela 12). Para os filmes contendo as misturas dos surfactantes (SDS e Tween 80) a adição da triacetina favoreceu a redução da solubilidade dos filmes, o que pode ter sido produto da melhor incorporação da triacetina a solução protéica pela ação das misturas de surfactantes presentes.

4.6 Propriedades Mecânicas

Os resultados de tensão na ruptura e alongação dos biofilmes produzidos nas diferentes formulações testadas são apresentadas nas tabelas a seguir.

Na Tabela 14 pode-se observar os valores de tensão na ruptura e alongação para filmes produzidos com gelatina, triacetina e ácidos esteárico ou ácido capróico.

Tabela 14. Tensão na ruptura (TR) e alongação (E) dos filmes de gelatina, triacetina e ácidos esteárico e capríco (filmes básicos)

Formulações	Espessura (mm)	TR(MPa)	E(%)
Gel	0,089 ± 0,002	82,04 ± 1,56 ^e	3,7 ± 0,64 ^e
Gel (pH)***	0,087 ± 0,003	99,16 ± 1,53 ^c	5,1 ± 0,95 ^{bc}
Gel/tri	0,089 ± 0,004	89,01 ± 0,69 ^d	5,3 ± 0,75 ^{bc}
Gel/tri (pH)***	0,088 ± 0,005	81,67 ± 1,45 ^e	3,9 ± 0,56 ^{de}
Gel/tri/AE	0,093 ± 0,002	53,41 ± 1,36 ^g	3,6 ± 0,89 ^e
Gel/tri/AE (pH)***	0,091 ± 0,002	65,88 ± 0,65 ^f	4,7 ± 0,79 ^{cd}
Gel/tri/AC	0,089 ± 0,001	124,38 ± 1,45 ^a	7,0 ± 0,58 ^a
Gel/tri/AC (pH)***	0,088 ± 0,002	112,38 ± 0,52 ^b	5,6 ± 0,45 ^b

Gel: Gelatina, Tri: triacetina. Media e desvio das triplicatas. *%de surfactante total adicionado em relação a quantidade de gelatina (base seca). **% de cada surfactante da mistura. ***Ajuste de pH
 Nota: Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

Verificou-se que nos filmes de gelatina, sem a adição de surfactantes, a tensão na ruptura foi significativamente superior para os filmes produzidos com pH ajustado. O mesmo ocorreu com os filmes de Gelatina/Triacetina/AE, sendo mais resistentes os biofilmes com pH ajustado.

A adição de ácido esteárico (18C) provocou diminuição na tensão na ruptura, em oposição, a adição do ácido capríco (6C) provocou um aumento significativo da resistência mecânica quando as formulações básicas são comparadas (Tabela 6). Isso possivelmente ocorreu devido ao tamanho das cadeias de carbono dos ácidos graxos, e a menor quantidade de ácido capríco adicionado a solução filmogênica em comparação com o ácido esteárico, onde o ácido de menor cadeia pode ter desestruturado menos a matriz polimérica levando a uma maior resistência mecânica. A diminuição da tensão na ruptura com o aumento da concentração de ácido esteárico foi associada por YANG e PAULSON (2000), aos grupos carboxil presentes nas moléculas de ácido esteárico, que competem com as moléculas de proteína, reduzindo as interações

entre os polímeros e conseqüentemente enfraquecendo a tensão de ruptura do filme.

Para as formulações básicas dos filmes de Gel; Gel/tri; gel/tri/AE; Gel/tri/AC, ambas com e sem o ajuste de pH (Tabela 14), foram observados valores de alongação diferentes estatisticamente ($p \leq 0,05$) dos filmes quando ocorre o ajuste do pH. As mudanças nesta propriedade caracterizam modificações na organização tridimensional, decrescendo a densidade e reversibilidade das interações intermoleculares ocorridas na rede protéica formadora do filme e aumentando o volume vazio e a mobilidade da cadeia (GALLIETTA et. al., 1998).

Segundo YOSHIDA (2002), o tamanho, o número de carbonos na cadeia e o número de grupos hidroxila funcionais nas moléculas de plastificante influenciam as propriedades mecânicas, favorecendo a ligação com moléculas de água, que atua como plastificante na matriz filmogênica, aumentando a porcentagem de alongação e diminuindo a tensão na ruptura. O efeito da concentração de proteína e pH na alongação também foi analisado, sendo que, quanto maior o valor de pH (básico), maior foi a alongação dos filmes protéicos a base de soro de leite. A diminuição do pH promoveu uma insolubilidade parcial das proteínas, provocando um desenvolvimento estrutural limitado, tornando os filmes mais frágeis.

No filme de gelatina, o ajuste do pH, torna o valor da alongação maior, o mesmo ocorre com o filme de Gel/tri/AE, apresentando maior alongação, quando o pH é corrigido. Na formulação com Gel/tri, o ajuste de pH reduz o valor da alongação, da mesma forma que ocorre com o filme de Gel/tri/AC, observando-se diminuição na alongação quando o pH é ajustado.

SHELLHAMMER e KROCHTA (1997), observaram um aumento na alongação dos filmes de proteína do soro do leite com o aumento da concentração do lipídio. Em contraposição, PEROVAL et. al., (2002) observaram uma diminuição da alongação ao incorporar ácidos graxos aos filmes de arabinóxilana.

Os mesmos autores relataram que alguns lipídios foram incapazes de formar uma matriz contínua e coesa, causando assim, uma menor alongação.

A Tabela 15. apresenta os valores de tensão na ruptura e alongação para filmes produzidos com gelatina, triacetina, ácido capróico e surfactantes (SDS e Tween 80).

Tabela 15. Tensão na ruptura (TR) dos filmes de gelatina, triacetina e ácido capróico.

Formulações	Espessura (mm)	RT (MPa)	Elong (%)
Gel/tri/AC	0,089 ± 0,001	124,4 ± 0,68 ^a	7,0 ± 0,95 ^{ab}
Gel/tri/AC(pH) ^{***}	0,088 ± 0,002	112,4 ± 0,59 ^c	5,9 ± 0,68 ^{abcd}
Gel/tri/AC/10%tween 80*	0,090 ± 0,003	100,4 ± 1,23 ^e	4,4 ± 1,25 ^d
Gel/tri/AC/10%tween 80*(pH) ^{***}	0,089 ± 0,002	101,3 ± 1,45 ^e	6,3 ± 0,58 ^{abcd}
Gel/tri/AC/10%SDS(pH)	0,090 ± 0,001	114,5 ± 1,59 ^{bc}	6,9 ± 0,23 ^{ab}
Gel/tri/AC/(75%SDSe25%tween 80)**=30%*	0,092 ± 0,004	53,8 ± 0,98 ^j	7,2 ± 0,36 ^a
Gel/tri/AC/(75%SDSe25%tween80)**=30%*(pH) ^{***}	0,091 ± 0,002	41,9 ± 0,77 ^k	6,7 ± 0,64 ^{ab}
Gel/tri/AC/(75%SDSe25%tween 80)**=10%*	0,089 ± 0,004	115,2 ± 1,46 ^b	5,9 ± 0,95 ^{abcd}
Gel/tri/AC/(75%SDSe25%tween80)**=10%*(pH) ^{***}	0,090 ± 0,005	68,7 ± 0,95 ^g	6,1 ± 0,79 ^{abcd}
Gel/tri/AC/(50%SDSe50%tween)**=40%*	0,093 ± 0,002	61,8 ± 0,75 ^h	6,3 ± 0,82 ^{abcd}
Gel/tri/AC/(50%SDSe50%tween)=40%*(pH) ^{***}	0,092 ± 0,003	60,2 ± 1,42 ^{hi}	5,7 ± 0,72 ^{abcd}
Gel/tri/AC/(25%SDSe75%tween)**=50%*	0,094 ± 0,002	40,4 ± 1,06 ^k	6,5 ± 0,65 ^{abc}
Gel/tri/AC/(25%SDSe75%tween)**=50%*(pH) ^{***}	0,092 ± 0,001	59,5 ± 0,87 ⁱ	5,5 ± 0,87 ^{abcd}
Gel/tri/AC/(50%SDSe50%tween)**=10%*	0,091 ± 0,002	83,1 ± 0,74 ^f	6,9 ± 0,57 ^{ab}
Gel/tri/AC/(50%SDSe50%tween)=20%*	0,092 ± 0,003	53,3 ± 0,96 ^j	6,3 ± 0,65 ^{abcd}
Gel/tri/AC/(25%SDSe75%tween)**=10%*	0,090 ± 0,002	82,1 ± 1,54 ^f	4,7 ± 0,81 ^{cd}
Gel/tri/AC/(25%SDSe75%tween)**=10%*(pH) ^{***}	0,093 ± 0,001	105,4 ± 1,23 ^d	5,1 ± 0,98 ^{bcd}

Gel: Gelatina, Tri: triacetina. Media e desvio das triplicatas. *%de surfactante total adicionado em relação a quantidade de gelatina (base seca). **% de cada surfactante da mistura. ***Ajuste de pH
 Nota: Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

Filmes à base de Gel/tri/AC, sem a adição de surfactantes (SDS e Tween 80), apresentaram diferença significativa, com uma resistência mecânica maior para o filme sem ajuste de pH. Em algumas situações quando o surfactante é adicionado à solução filmogênica, o efeito ocorre de maneira oposta, onde filmes com ajuste de pH, apresentaram-se mais resistentes que os filmes sem o pH ajustado (Gel/tri/AC/10%Tween 80 (pH); Gel/tri/AC/25% SDS e 75% Tween 80=50%(pH); Gel/tri/AC/25%SDS e 75% Tween =10% (pH)). Isso possivelmente pode ter ocorrido devido a maior solubilidade e homogeneidade de incorporação dos compostos hidrofóbicos na matriz polimérica com o ajuste do pH produzindo melhor estruturação, entretanto o comportamento não foi generalizado para todos os surfactantes utilizados (Tabela 15).

Verificou-se que o aumento na concentração do surfactante reduziu a resistência mecânica dos filmes, com diferença significativa ($p \leq 0,05$). Este efeito foi anteriormente observado por RHIM, et. al., (2002), onde a adição de 40% de SDS reduziu substancialmente as propriedades de tensão dos filmes de isolado protéico de soja.

Para as formulações de Gel/tri/AC/surfactante, (Tabela 15), foi observado, de uma forma geral, que as elongações destes filmes não apresentaram diferenças significativas quando os valores médios da elongação foram comparados, observando-se apenas diferença significativa entre as elongações das formulações (gel/tri/AC/75%SDS e 25%Tween 80) e (Gel/tri/AC/10% Tween).

A Tabela 16 apresenta os valores de tensão na ruptura e elongação para filmes produzidos com gelatina, triacetina, ácido esteárico e surfactantes (SDS e Tween 80).

Tabela 16. Tensão na ruptura e alongação dos filmes de gelatina, triacetina, ácidos esteárico e surfactante (SDS e Tween 80).

Formulações	Espessura (mm)	TR (MPa)	Elong(%)
Gel/tri/AE	0,093 ± 0,002	53,4 ± 1,25 ^c	3,6 ± 0,39 ^{de}
Gel/tri/AE(pH) ^{***}	0,091 ± 0,002	65,9 ± 1,45 ^b	4,7 ± 0,25 ^{de}
Gel/tri/AE/70%SDS*	0,095 ± 0,006	31,1 ± 0,98 ^e	3,3 ± 0,95 ^{de}
Gel/tri/AE/40%SDS*	0,093 ± 0,002	44,9 ± 0,76 ^d	3,7 ± 0,63 ^{de}
Gel/tri/AE/10%SDS*	0,092 ± 0,004	95,1 ± 0,97 ^a	5,6 ± 0,24 ^d
Gel/tri/AE/60%SDS*(pH) ^{***}	0,093 ± 0,004	12,1 ± 1,24 ^h	1,7 ± 0,58 ^e
Gel/tri/AE/(75SDS/25%tween 80) **	0,091 ± 0,003	15,8 ± 1,06 ^g	12,9 ± 0,74 ^c
Gel/tri/AE/(50%SDS/50%tween 80) ^{**}	0,090 ± 0,002	14,0 ± 1,65 ^{gh}	60,4 ± 0,59 ^a
Gel/tri/AE/(50%SDS/50%tween80) ^{**} (pH) ^{***}	0,092 ± 0,003	12,9 ± 1,08 ^h	18,5 ± 0,45 ^b
Gel/tri/AE/(25%SDSe75%tween 80) ^{**}	0,091 ± 0,002	16,1 ± 1,04 ^g	20,6 ± 1,25 ^b
Gel/tri/AE/100%tween 80*	0,094 ± 0,005	21,1 ± 0,98 ^f	3,8 ± 1,08 ^{de}

Gel: Gelatina, Tri: triacetina. Media e desvio das triplicatas. *%de surfactante total adicionado em relação a quantidade de gelatina (base seca). **% de cada surfactante da mistura. ***Ajuste de pH
Nota: Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

A adição de ácido esteárico a formulação filmogênica com ou sem ajuste de pH ou surfactantes produziu filmes mais frágeis que os produzidos com a adição de ácido capróico (Tabelas 14, 15 e 16).

Para as formulações de Gel/tri/AE com SDS nas concentrações de 70%, 40%, 10% e 60%(pH), foi observado diferença significativa entre os valores de resistência mecânica, sendo verificado que a maior resistência mecânica ocorreu no filme com 10% de SDS (menor concentração de SDS), com diminuição da resistência, conforme aumentou-se a concentração do SDS na formulação, todas sem o ajuste de pH. Na formulação de 60%SDS (pH), onde foi efetuado o ajuste de pH, observou-se que a resistência mecânica diminuiu de maneira significativa, sendo a formulação com o menor valor determinado entre as formulações contendo o ácido esteárico.

Para a mistura de surfactantes (50% SDS e 50% Tween 80) com e sem o ajuste de pH, observou-se que não houve diferença significativa na tensão na ruptura.

A formulação com apenas o surfactante Tween 80, na concentração de 100% (em relação a gelatina - base seca) de surfactante apresentou uma resistência mecânica intermediária com diferença significativa entre os outros filmes, porém menores valores foram observados quando o Tween 80 entra como componente nas misturas de surfactantes utilizados.

A homogeneização do lipídio na solução protéica é uma etapa muito importante, pois o diâmetro da gota lipídica e sua distribuição homogênea na matriz polimérica estão diretamente relacionados com a tensão na ruptura e a porcentagem de alongação, onde quanto menor o diâmetro mais homogênea a distribuição, formando-se filmes com uma matriz mais contínua, regular e estável (DEBEAUFORT e VOILLEY, 1997). Se o surfactante melhorar a incorporação na matriz o efeito na resistência mecânica pode ser bom e ao contrário em alguns casos sua adição parece prejudicar a incorporação lipídica na matriz filmogênica.

Nos filmes a base de Gel/tri/AE/surfactante, as formulações com concentrações de 40%, 70%(sem ajuste de pH) e 60%(com ajuste de pH) de SDS, apresentam alongação estatisticamente iguais, observando mesmo efeito para as concentrações de 10%, 40% e 70% de SDS sem ajuste de pH. Comparação entre a formulação contendo 10% de SDS (sem ajuste de pH) com a formulação de 60% de SDS (com ajuste de pH), mostrou diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Entre as misturas de surfactantes na concentração de 50% de SDS e 50% de tween 80, estando uma com pH ajustado e a outra não, foi observado que a formulação sem o ajuste de pH, apresentou uma alongação significativamente maior do que a formulação com o pH ajustado.

Para as misturas de SDS e Tween 80 com (75% de SDS e 25% Tween) e (25% de SDS e 75% Tween 80), verificou-se que a alongação do filme com

menores concentrações de SDS em relação à de Tween (25% SDS e 75% de Tween), foi significativamente superior, em relação ao filme com 75%SDS e 25% Tween 80.

Tabela 17. Resistência mecânica dos filmes de gelatina e surfactantes (SDS e Tween 80)

FORMULAÇÕES	Espessura (mm)	TR(MPa)	E(%)
Gel/10%SDS*	0,092 ± 0,003	114,2 ± 0,85 ^a	5,1 ± 0,92 ^{de}
Gel/40%SDS*	0,094 ± 0,004	64,8 ± 0,95 ^c	3,9 ± 0,54 ^{de}
Gel/(50%SDSe50%tween 80) (pH)***=100%*	0,089 ± 0,002	23,2 ± 0,64 ^e	65,2 ± 0,65 ^b
Gel/(50%SDSe50%tween 80)=40%**	0,091 ± 0,004	41,5 ± 1,25 ^d	7,0 ± 0,36 ^c
Gel/(50%SDSe50%tween 80)=100%*	0,087 ± 0,001	23,7 ± 1,28 ^e	89,3 ± 0,67 ^a
Gel/(75%SDSe25%tween80)=30%** (pH)***	0,093 ± 0,002	39,5 ± 1,56 ^e	3,5 ± 0,36 ^e
Gel/(75%SDSe25%tween 80)=10%**	0,0092 ± 0,001	96,5 ± 1,05 ^b	5,5 ± 0,49 ^{cd}

Gel: Gelatina, Tri: triacetina. Media e desvio das triplicatas. *%de surfactante total adicionado em relação a quantidade de gelatina (base seca). **% de cada surfactante da mistura. ***Ajuste de pH
Nota: Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

Entre as formulações compostas apenas de gelatina e SDS, foi observado que o aumento da concentração desse surfactante de 10 para 40%, provocou uma diminuição significativa na tensão de ruptura. A substituição da metade da concentração de SDS por Tween 80 (Gel/tri/50%SDS e 50%tween 80), também provocou diminuição na resistência mecânica com diferença estatística para as proporções testadas.

O lauril sulfato de sódio (SDS), não quebra pontes dissulfeto, mas impede as interações hidrofóbicas entre as moléculas de proteína. Isto ocorre através da ligação da porção não polar do SDS aos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Resultados semelhantes foram obtidos para filmes de isolado protéico de soja contendo SDS, em relação aos filmes produzidos apenas com isolado, conforme observado por RHIM, et. al., (2002).

Para filmes produzidos com mistura de surfactantes (50% de SDS e 50% de Tween 80), o aumento da concentração total de surfactante de 40 para 100%, acarretou redução significativa ($p \leq 0,05$) na tensão da ruptura.

A característica de alongação dos filmes de Gel/surfactante, compostos apenas pelo SDS, nas concentrações de 10% e 40% não apresentou valores com diferença significativa entre eles. Para as misturas de surfactantes SDS e Tween 80 na concentração de 50% de SDS e 50% de Tween 80 (com e sem o ajuste de pH) foi observado que o ajuste de pH aumentou a alongação e diminuiu a tensão na ruptura. Para a adição de 40% de surfactante total, a substituição de parte do SDS por Tween gel/40%SDS e gel/50%SDS e 50%Tween = 40% provocou um aumento significativo nos valores de alongação. Para essa mesma proporção entre os surfactantes (50%SDS e 50% Tween) o aumento da adição total de 40% para 100% (em relação a gelatina em base seca) provocou um acentuado aumento no valor da alongação que passou de 7,04 para 89,33%. Ainda para essa proporção com adição de 100% de surfactante (em relação a gelatina em base em seca), o ajuste de pH provocou uma redução significativa da alongação. Para as misturas SDS e Tween 80 (75% SDS e 25% Tween), nas concentrações de 30%(com ajuste de pH) e 10% (sem ajuste de pH), os filmes com menor concentração total de surfactante e sem o ajuste de pH, apresentou maior alongação.

Na Tabela 18 pode-se observar os valores de Tensão na ruptura e alongação para filmes produzidos com gelatina, triacetina e surfactantes (SDS e Tween 80).

Tabela 18. Resistência mecânica dos filmes de gelatina, triacetina e surfactantes (SDS e Tween)

Formulações	Espessura (mm)	TR(MPa)	E(%)
Gel/tri/(75%SDSe25%tween 80)=100%*	0,087 ± 0,001	96,7 ± 0,97 ^a	5,1 ± 0,36 ^c
Gel/tri/10%SDS*	0,088 ± 0,003	62,8 ± 0,86 ^b	5,6 ± 0,37 ^c
Gel/tri/(50%SDSe50%tween 80)**=100%*	0,090 ± 0,004	17,8 ± 0,92 ^f	25,0 ± 0,95 ^b
Gel/tri/(50%SDSe50%tween 80)**=40%*	0,089 ± 0,002	53,9 ± 1,24 ^c	48,5 ± 0,58 ^a
Gel/tri/(75%SDSe25%tween 80)=30%(pH)	0,0086 ± 0,005	44,7 ± 1,05 ^e	7,4 ± 0,27 ^c
Gel/tri/40%SDS	0,087 ± 0,004	50,1 ± 1,36 ^d	5,7 ± 0,49 ^c
Gel/tri/(50%SDSe50%tween)**=100%*(pH)***	0,0080 ± 0,005	18,5 ± 1,41 ^f	12,3 ± 0,75 ^{bc}
Gel/tri/(75%SDSe25%tween80)**=60%*	0,085 ± 0,002	52,9 ± 0,98 ^{cd}	5,3 ± 0,82 ^c

Gel: Gelatina, Tri: triacetina. Media e desvio das triplicatas. *%de surfactante total adicionado em relação a quantidade de gelatina (base seca). **% de cada surfactante da mistura. ***Ajuste de pH
 Nota: Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

Nas formulações com Gel/tri/surfactantes (SDS e Tween 80), sem a presença de ácidos graxos, para os filmes com 10% e 40% do surfactante SDS, foi observado que o aumento da adição na concentração de surfactante, diminuiu significativamente a resistência mecânica. A mistura de surfactantes na concentração de 50% de SDS e 50% de Tween 80, com e sem pH, não tiveram diferença significativa entre si, portanto o pH parece não ter influenciado a resistência mecânica destes filmes. Quando a mesma mistura de surfactante foi utilizada, mas em concentração inferior, o efeito resultou em aumento significativo da resistência mecânica. O mesmo tipo de efeito foi observado para a mistura de 75% de SDS e 25% Tween 80 com concentração total de 30% de surfactante resultando em maior resistência mecânica do que adição da mesma mistura em maior concentração (60%). O aumento da concentração de surfactante total, independente de ser SDS puro ou mistura de SDS com Tween 80, implicou na diminuição da resistência mecânica. Por outro lado os filmes compostos de gelatina, triacetina e surfactantes, foi observada diferença significativa na elongação entre as formulações de 50% de SDS e 50% de Tween 80 (100% de adição de surfactantes), sendo uma com o pH ajustado e a outra sem, indicando

que, nesse caso, o ajuste de pH provocou diferença entre as amostras. Entre as demais formulações todas apresentam-se estatisticamente iguais quanto os valores de alongação.

4.7 Opacidade

Na Tabela 19 pode-se observar os valores da opacidade para os filmes produzidos com gelatina, triacetina, ácido esteárico ou ácido capríco (filmes básicos). Todos os filmes utilizados para a análise da opacidade foram comparados com o filme comercial de policloreto de vinila (PVC).

Tabela 19. Opacidade (OP) dos filmes de gelatina, triacetina e ácidos esteárico e capríco (filmes básicos).

Formulações	OP
Padrão -PVC	12,16 ^d
Gel	12,76 ± 0,24 ^d
Gel (pH) ^{***}	13,17 ± 0,15 ^d
Gel/tri	13,11 ± 0,29 ^d
Gel/tri (pH) ^{***}	13,18 ± 0,36 ^d
Gel/tri/AE	19,14 ± 0,15 ^a
Gel/tri/AE (pH) ^{***}	17,17 ± 0,28 ^b
Gel/tri/AC	14,51 ± 0,37 ^{c d}
Gel/tri/AC (pH) ^{***}	16,20 ± 0,46 ^{b c}

PVC: policloreto de vinila; Gel: Gelatina, Tri: triacetina. Média e desvio das triplicatas. ^{***}Ajuste de pH Nota: Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

Para os valores de opacidade dos filmes básicos foi observada diferença significativa quando o ácido graxo foi adicionado a formulação, tanto para o ácido esteárico como para o capríco. Ambos tiveram sua opacidade elevada, quando comparados aos filmes sem a adição do ácido graxo. Efeito semelhante foi

encontrado por BATISTA (2003), que observou a opacidade dos filmes combinados de pectina e gelatina, com a adição de lipídios apresentaram-se mais opacos com a adição dos ácidos graxos. RHIM et. al. (2002), obtiveram filmes de isolado protéico de soja com maior opacidade ao incorporar ácidos graxos (láurico, palmítico e esteárico) na formulação, com maior efeito provocado pela adição de ácido palmítico. A adição dos ácidos graxos tornou os filmes mais opacos em relação ao filme de PVC. O ajuste do pH produziu efeitos opostos na opacidade comparados aos filmes sem ajuste de pH. Filmes contendo ácido esteárico com o pH ajustado apresentaram diminuição da opacidade, enquanto a adição do ácido capróico com ajuste de pH tiveram a opacidade aumentada.

A Tabela 20 apresenta os valores de opacidade (OP) para filmes produzidos com Gelatina, Triacetina ácido capróico e surfactantes (SDS e Tween 80).

Tabela 20. Opacidade dos filmes de Gelatina, Triacetiana, ácido caprótico e surfactantes (SDS e Tween 80).

Formulações	OP
Padrão –PVC	12,16 ^g
Gel/tri/AC	14,51 ± 0,26 ^{d e f}
Gel/tri/AC(pH) ^{***}	16,20 ± 0,58 ^{c d}
Gel/tri/AC/10%tween 80*	13,23 ± 0,35 ^{e f g}
Gel/tri/AC/10%tween 80*(pH) ^{***}	14,22 ± 0,24 ^{d e f}
Gel/tri/AC/10%SDS*	15,03 ± 0,34 ^{c d e}
Gel/tri/AC/(75%SDSe25%tween 80)**=30%*	20,46 ± 0,38 ^a
Gel/tri/AC/(75%SDSe25%tween 80)**=30%*(pH) ^{***}	11,55 ± 0,25 ^g
Gel/tri/AC/(75%SDSe25%tween 80)**=10%*	12,65 ± 0,42 ^{f g}
Gel/tri/AC/(75%SDSe25%tween 80)**=10%*(pH) ^{***}	21,19 ± 0,43 ^b
Gel/tri/AC/(50%SDSe50%tween) ^{**} =40%*	17,04 ± 0,15 ^c
Gel/tri/AC/(50%SDSe50%tween) ^{**} =10%*	14,03 ± 0,36 ^{d e f}
Gel/tri/AC/(50%SDSe50%tween) ^{**} =10% (pH)*	14,03 ± 0,54 ^{d e f}
Gel/tri/AC/(50%SDSe50%tween) ^{**} =20%*	17,04 ± 0,25 ^c
Gel/tri/AC/(25%SDSe75%tween) ^{**} =50%*	11,50 ± 0,43 ^g
Gel/tri/AC/(25%SDSe75%tween) ^{**} =50%*(pH) ^{***}	11,50 ± 0,41 ^g
Gel/tri/AC/(25%SDSe75%tween) ^{**} =10%*	13,53 ± 0,38 ^{e f g}
Gel/tri/AC/(25%SDSe75%tween) ^{**} =10%*(pH) ^{***}	13,31 ± 0,29 ^{e f g}

PVC: policloreto de vinila; Gel: Gelatina, Tri: triacetina. Media e desvio das triplicatas. %de surfactante total adicionado em relação a quantidade de gelatina (base seca). **% de cada surfactante da mistura. ***Ajuste de pH Nota: Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

Em relação a opacidade dos filmes de gelatina, triacetina, ácido caprótico e surfactantes, foi observado que a opacidade dos filmes com Gel/tri/AC/50%SDS/50%Tween 80 foi estatisticamente superior a todos os outros filmes. As misturas de surfactantes de 75% de SDS e 25% Tween 80, com concentrações de 10% e 30% apresentaram-se iguais estatisticamente, porém diferentes das demais formulações. Além da adição do ácido caprótico, em geral a

adição dos surfactantes tendem também a aumentar a opacidade exceto, as formulações contendo misturas dos surfactantes onde o Tween 80 estava presente em maior proporção.

Os valores de Opacidade para os filmes produzidos com gelatina, triacetina, ácido esteárico e surfactantes (SDS e Tween 80) são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Opacidade (OP) dos filmes de gelatina, triacetina, ácidos esteárico e surfactante (SDS e Tween 80).

Formulações	OP
Padrão –PVC	12,16
Gel/tri/AE	19,14 ± 0,28 ^{c d e f}
Gel/tri/AE(pH)***	17,17 ± 0,15 ^{d e f}
Gel/tri/AE/70%SDS*	24,37 ± 0,68 ^b
Gel/tri/AE/40%SDS*	20,63 ± 0,29 ^{b c d}
Gel/tri/AE/10%SDS*	20,16 ± 0,48 ^{b c d}
Gel/tri/AE/60%SDS*(pH)***	22,02 ± 0,57 ^b
Gel/tri/AE/(75SDS/25%tween 80)**=100%*	15,69 ± 0,48 ^f
Gel/tri/AE/(50%SDS/50%tween80)**=100%*	29,45 ± 0,29 ^a
Gel/tri/AE/(50%SDS/50%tween 80)**=100**(pH)***	28,61 ± 0,19 ^a
Gel/tri/AE/(25%SDSe75%tween 80)**=100%*	15,69 ± 0,42 ^f
Gel/tri/AE/100%tween 80*	16,83 ± 0,44 ^{e f}

PVC: policloreto de vinila; Gel: Gelatina, Tri: triacetina. Media e desvio das triplicatas. *%de surfactante total adicionado em relação a quantidade de gelatina (base seca). **% de cada surfactante da mistura. ***Ajuste de pH Nota: Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

Novamente o comportamento anteriormente observado se repete onde a adição do ácido esteárico produz um valor mais alto comparado a adição do ácido capróico (Tabela 20) e adicionalmente a opacidade torna-se maior em relação ao filme de PVC, conforme os surfactantes são adicionados.

A Tabela 22 apresenta os valores de opacidade para filmes produzidos com gelatina e surfactantes (SDS e Tween 80). Os valores de opacidade são mais próximos aos do filme de PVC, em função da ausência da adição dos ácidos graxos. Pequenos aumentos de opacidade podem ser observados pela adição dos surfactantes.

Tabela 22. Opacidade (OP) dos filmes de gelatina e surfactantes (SDS e Tween).

Formulações	OP
Padrão -PVC	12,16
Gel/10%SDS*	12,73 ± 0,28 ^{c d}
Gel/40%SDS*	15,40 ± 0,19 ^a
Gel/50%SDSe50%tween 80)**=100%*	14,37 ± 0,11 ^{a b}
Gel/(50%SDSe50%tween 80)**=40%*	13,33 ± 0,36 ^{b c}
Gel/(50%SDSe50%tween 80)**=100%*	13,28 ± 0,28 ^{b c d}
Gel/75%SDSe25%tween80=30%*(pH)***	11,89 ± 0,14 ^d
Gel/75%SDSe25%tween 80)**=10%*	12,63 ± 0,31 ^{c d}

PVC: policloreto de vinila; Gel: Gelatina, Tri: triacetina. Média e desvio das triplicatas. *%de surfactante total adicionado em relação a quantidade de gelatina (base seca). **% de cada surfactante da mistura. ***Ajuste de pH Nota: Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

Segundo RHIM et al.,(2002), filmes contendo grandes quantidades de SDS (10%, 20% e 40%) diminuíram a transparência dos filmes de isolado protéico de soja, apresentando-se com uma aparência mais amarelada.

A Tabela 23 apresenta os valores de opacidade para filmes produzidos com gelatina, triacetina e surfactantes (SDS e Tween 80)

Tabela 23. Opacidade dos filmes de gelatina, triacetina e surfactantes (SDS e Tween)

Formulações	OP
Padrão -PVC	12,16 ^b
Gel/tri/(75%SDSe25%tween 80)**=100%	12,26 ± 0,36 ^b
Gel/tri/10%SDS*	15,10 ± 0,25 ^{a b}
Gel/tri/(50%SDSe50%tween 80)**=100%*	14,29 ± 0,31 ^{a b}
Gel/tri/(50%SDSe50%tween 80)**=40%*	15,77 ± 0,19 ^a
Gel/tri/(75%SDSe25%tween)**=30%*(pH)***	14,10 ± 0,21 ^{a b}
Gel/tri/40%SDS*	15,10 ± 0,23 ^{a b}
Gel/tri/(50%SDSe50%tween)**=100%*(pH)	13,57 ± 0,35 ^{a b}
Gel/tri/(75%SDSe25%tween)**=60%*	13,27 ± 0,26 ^{a b}

PVC: policloreto de vinila; Gel: Gelatina, Tri: triacetina. Media e desvio das triplicatas. %de surfactante total adicionado em relação a quantidade de gelatina (base seca). **% de cada surfactante da mistura. ***Ajuste de pH Nota: Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

A Opacidade de uma maneira geral, aumentou com a adição crescente dos surfactantes e da triacetina.

Inicialmente a cor dos filmes foi também avaliada através da medida dos parâmetros **L**, **a** e **b** do sistema Hunter, porém as diferenças foram pequenas e pouco relevantes para a comparação entre os filmes e desta forma não foram incluídas no trabalho.

4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os filmes de gelatina com e sem o ajuste de pH apresentaram algum alinhamento em sua estrutura, na forma de fibras quando a espessura do filme é observada (Figura 17 A e C) características dos filmes de gelatina tipo A, como já foi observado em trabalhos anteriores (CHAMBI, 2004 e CARVALHO, 2002). Na imagem da superfície dos filmes não foi possível observar diferença entre os filmes de gelatina com e sem o ajuste de pH (Figura 17B e 17D).

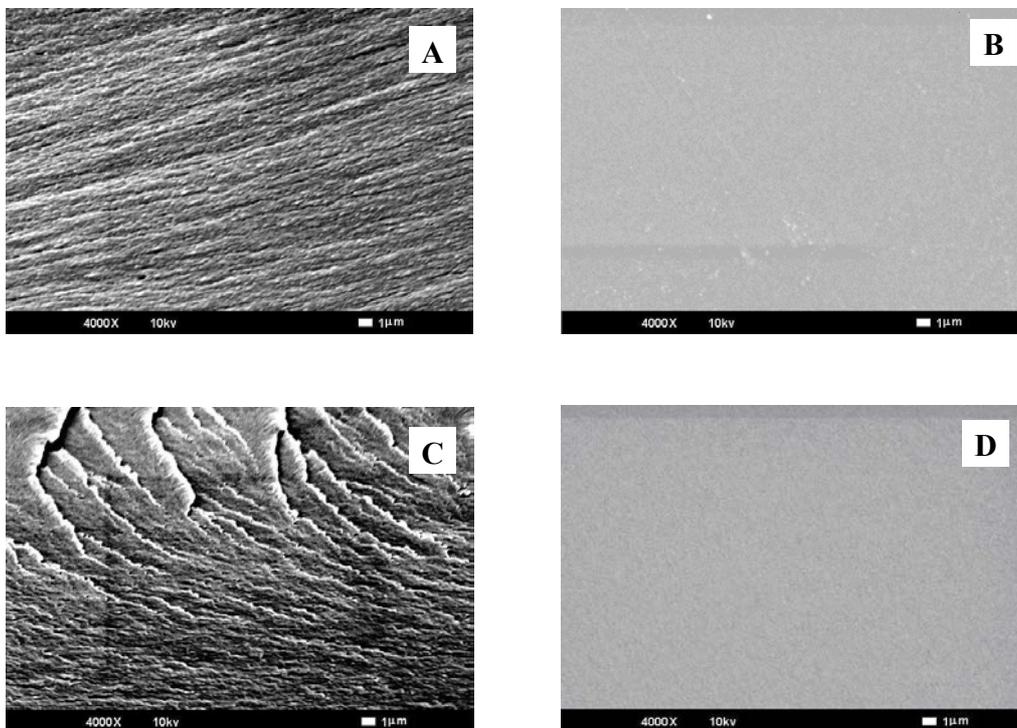


Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura. (A)Gelatina-espessura; (B)Gelatina-superfície; (C)Gelatina com ajuste de pH-espessura (D)Gelatina com ajuste de pH-superfície

Para os filmes com a adição da triacetina (Figura 18) foi possível observar claramente a presença das gotículas desse material na matriz filmogênica indicando a não incorporação da triacetina à matriz protéica (18A). O ajuste de pH para esta mesma formulação indicou alguma mudança morfológica da superfície do filme (Figura 18B).

Na superfície dos filmes de gelatina, triacetina e ácido capróico, com e sem o ajuste de pH (18C e 18D) foi possível observar também gotículas dispersas, causando irregularidades na matriz filmogênica (Figura 18).

Para o filme de gelatina, triacetina e ácido esteárico, sem o ajuste de pH (18E, 18F), a morfologia de superfície apresentou claramente a presença das gotas de óleo na matriz filmogênica, evidenciando a não incorporação do ácido esteárico na matriz protéica. O ajuste do pH, por sua vez, melhorou a dispersão da substância hidrofóbica na matriz, com diminuição nítida do tamanho das gotas de gordura (Figura 18F). WONG et. al., (1992) trabalhando com a adição de ácidos graxos em soluções filmogênicas de quitosana observaram que a adição de compostos hidrofóbicos provocava modificação na morfologia de superfície dos filmes e em decorrência alterações na permeabilidade à água dos filmes resultantes.

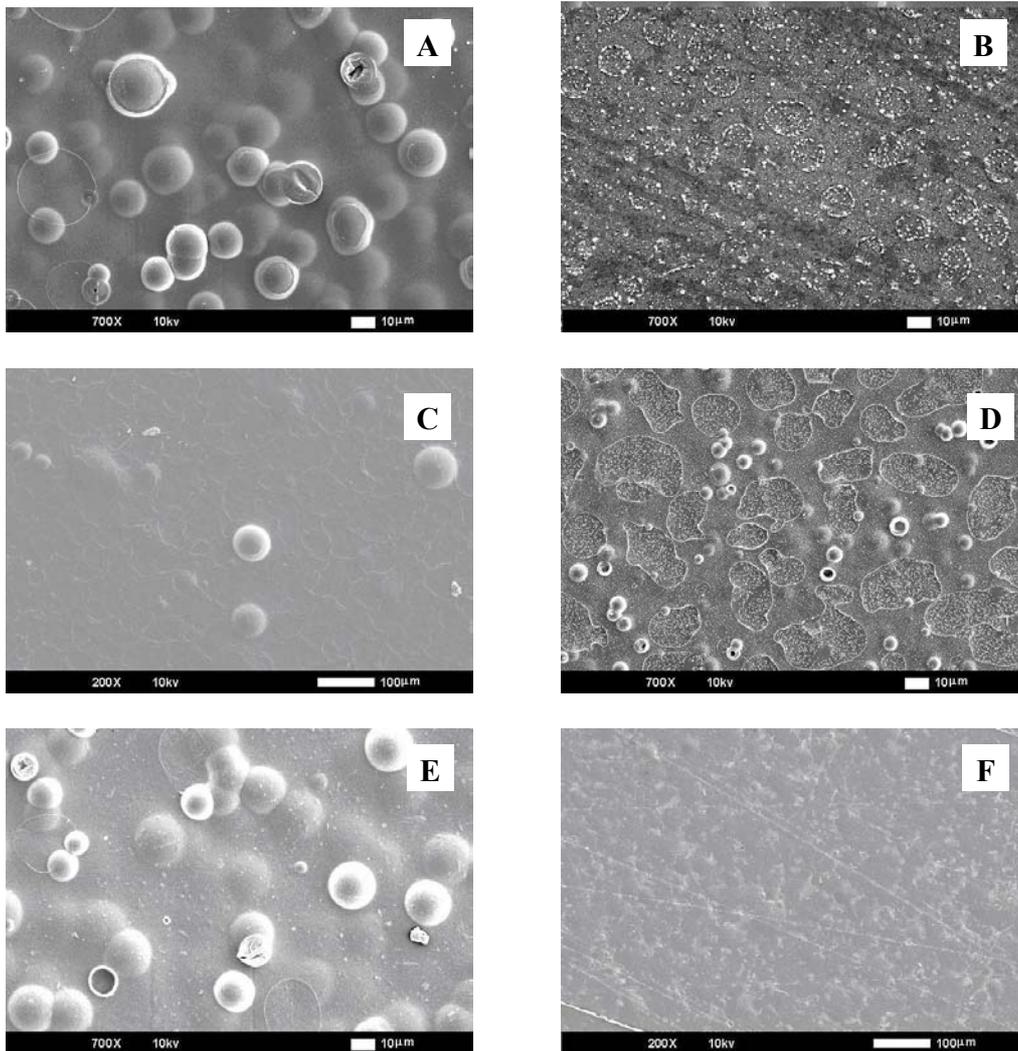


Figura 18. (A) Gelatina e triacetina; (B) Gelatina e triacetina, com ajuste de pH; (C)gelatina, triacetina e ácido caprónico, (D)gelatina, triacetina e ácido caprónico, com ajuste de pH; (E)Gelatina, triacetina, ácido esteárico;(F)Gelatina, triacetina, ácido esteárico, com ajuste de pH.

Após a adição dos surfactantes nos filmes de gelatina, triacetina, ácido esteárico, foi possível observar uma mudança estrutural nas matrizes filmogênicas, em relação as matrizes sem a adição dos tensoativos. Para o filme de gelatina, triacetina, ácido esteárico e 70% de SDS (19A), a matriz polimérica apresenta-se sem gotas de gordura, quando comparada com as formulações sem a adição deste surfactante.

Na imagem (19B), onde a adição do SDS foi menor (40%), a matriz filmogênica apresentou pequenas estruturas arredondadas em formas de gotas de substâncias hidrofóbicas, sendo possível observar que a maior quantidade do surfactante SDS melhora a incorporação e homogeneidade da matriz filmogênica. Na imagem (19C), o filme de gelatina, triacetina, ácido esteárico e 60% de SDS (com ajuste de pH) apresentou uma mudança na morfologia, não sendo visível as gotas de gordura, compatível com a baixa permeabilidade ao vapor de água obtida para este filme. O filme de gelatina triacetina, ácido esteárico e 50% de SDS e 50% de Tween, apresentou morfologia semelhante a da formulação anterior contendo 60% de SDS (com ajuste de pH), não apresentando também gotas de substâncias hidrofóbicas na matriz filmogênica. O ajuste de pH desta formulação favoreceu a diminuição e maior dispersão das estruturas observadas nesta matriz filmogênica.

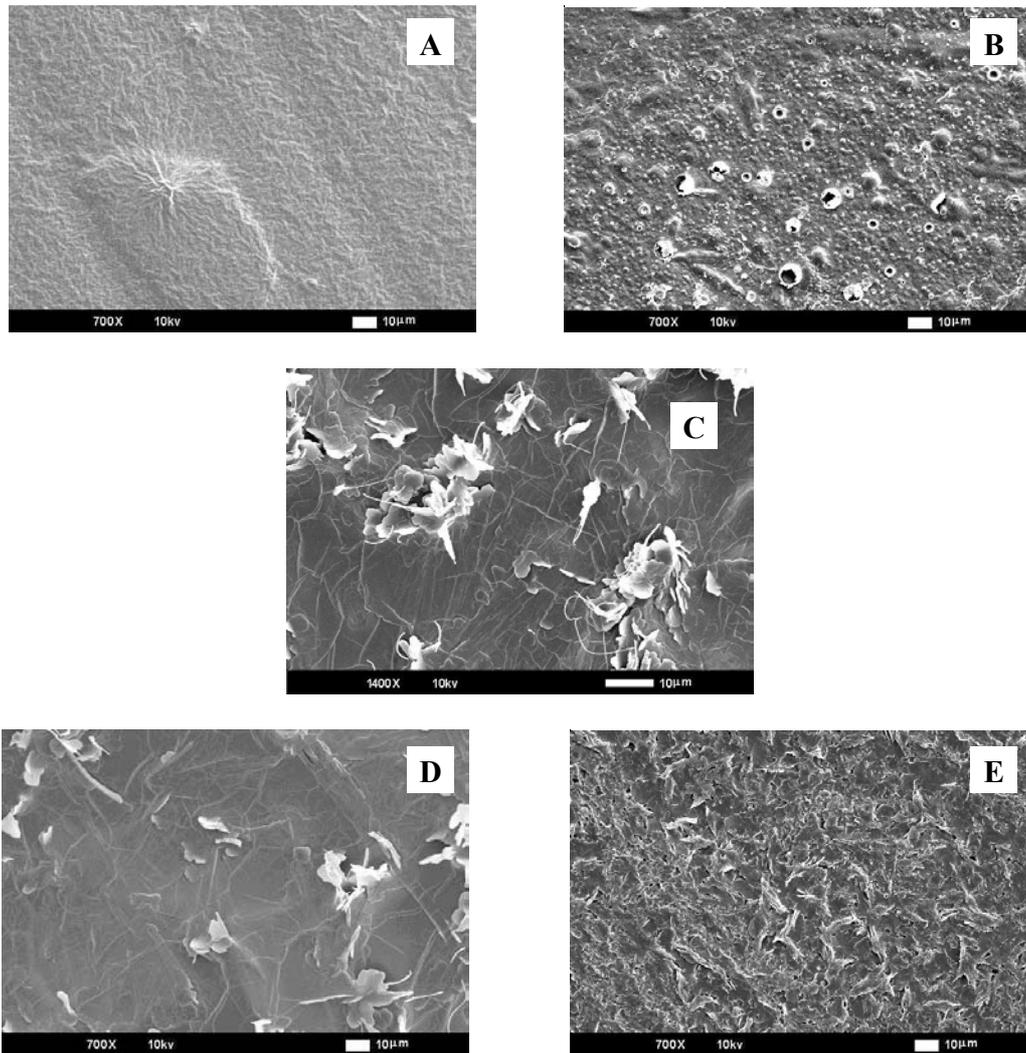


Figura 19.(A)Gelatina, triacetina, ácido esteárico e 70% de SDS - superfície; (B)gelatina, triacetina, ácido esteárico e 40% de SDS - superfície; (C)Gelatina, triacetina, ácido esteárico e 60% de SDS, com ajuste de pH - superfície; (D) Gelatina, triacetina, ácido esteárico e 50 de SDS e 50% de Tween -superfície; (E) Gelatina, triacetina, ácido esteárico e 50% de SDS e 50% de Tween, com ajuste de pH - superfície.

A adição da mistura de surfactante (75% SDS e 25% Tween 80 = 30% de surfactante em relação a massa seca de gelatina) ao filme de gelatina, triacetina, ácido caprótico, com e sem ajuste de pH produziu morfologias de superfície visualmente diferentes conforme pode ser observado na figura 20. A adição dos surfactantes parece ter propiciado uma maior homogeneização entre os constituintes formadores do filme (Figura 20).

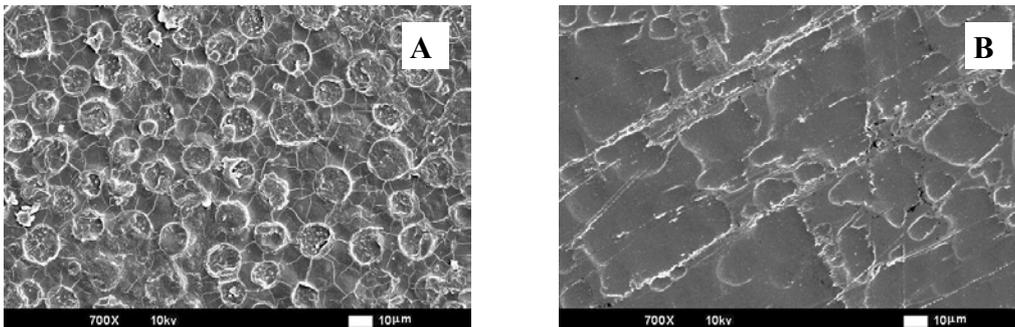


Figura 20.(A)Gelatina, triacetina, caprótico e 75% de SDS e 25% de Tween (30% concentração do surfactante); (B) Gelatina, triacetina, caprótico e 75% de SDS e 25% de Tween (30% concentração do surfactante, com ajuste de pH).

1.1 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCLV) e Microscopia Ótica

A análise por microscopia confocal permitiu uma melhor visualização da matriz filmogênica, sendo possível, devido à especificidade dos corantes utilizados. localizar as proteínas e as substâncias hidrofóbicas e seu arranjo estrutural tanto por superfície como por profundidade no interior da matriz filmogênica). Neste trabalho foram utilizadas três tipos de captação na microscopia confocal: FITC (Isotiocianato de fluorescência) – confocal com a proteína corada; NILE RED – confocal com substâncias hidrofóbicas coradas e no modo Merge – onde as imagens são superpostas a partir das imagens obtidas com os corantes FITC e NILE RED. Foi também realizada tentativamente a microscopia ótica da superfície dos mesmos filmes, permitindo alguma comparação com a microscopia confocal.

Na figura 21, a imagem A, apresenta o filme onde a proteína foi colorida com FITC, a imagem (B) representa o composto hidrofóbico (triacetina) colorido com NILE RED, a imagem (C) representa a sobreposição de ambas no modo merge e a imagem (D) a captação por microscopia ótica. Nas imagens dos filmes compostos de gelatina e triacetina foi observado que não houve boa incorporação da substância hidrofóbica (triacetina) na proteína, sendo visível os glóbulos da triacetina não incorporadas homogeneamente na matriz protéica.

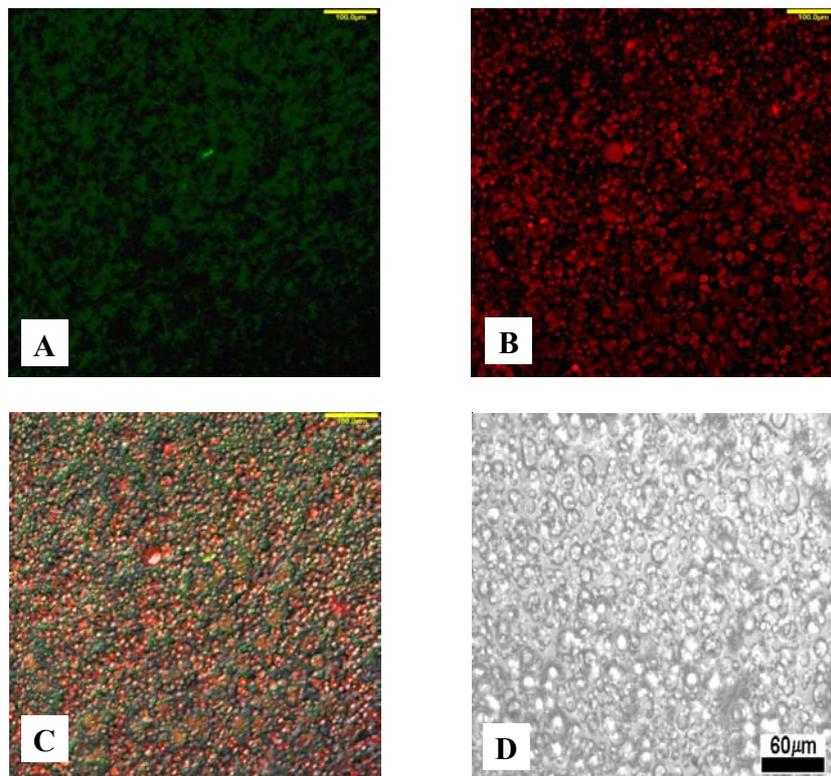


Figura 21. Microscopia confocal a laser: (A) Gelatina e Triacetina coradas-FITC; (B) gelatina e triacetina coradas-Nile Red; (C) gelatina e triacetina coradas-Merge; e Microscopia ótica: (D) gelatina e triacetina coradas.

Nas imagens obtidas dos filmes compostos de gelatina e triacetina com ajuste de pH, (Figura 22C-confocal e 22D-ótica), pode-se notar uma melhor distribuição entre as gotas de triacetina na matriz filmogênica. Embora mais homogêneo, a captação da imagem da superfície do filme por microscopia ótica indicou que mesmo com o ajuste de pH ocorreu a separação de fase (triacetina-gelatina; 22D), sugerindo que o ajuste do pH tenha sido responsável pela melhor homogeneização dos compostos na matriz filmogênica.

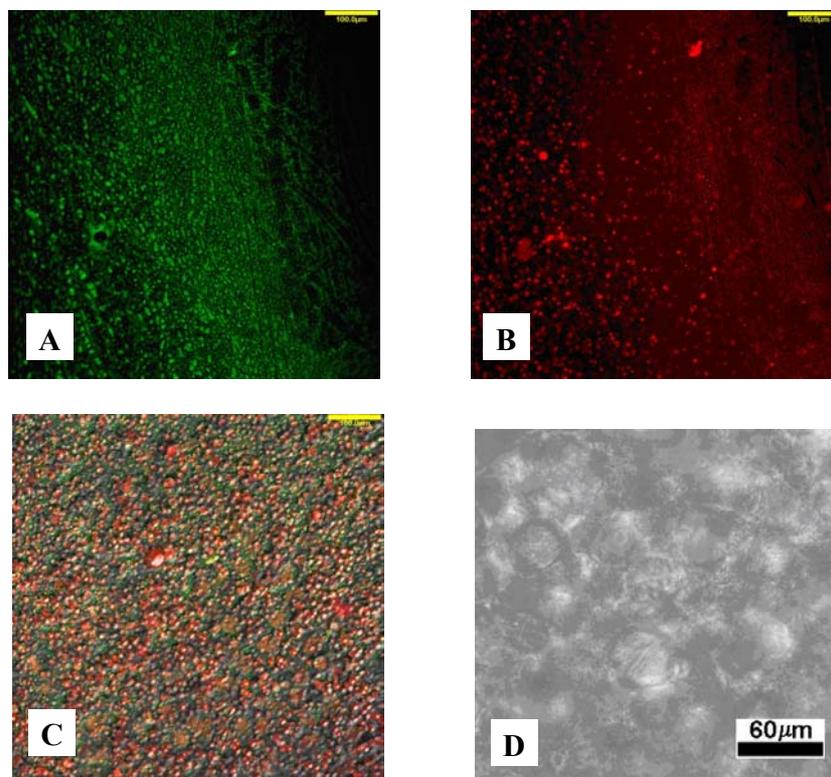


Figura 22. Microscopia confocal a laser.(A)Gelatina e Triacetina, com ajuste de pH coradas-FITC; (B) .Gelatina e Triacetina, com ajuste de pH coradas-Nile Red; (C)Gelatina e Triacetina, com ajuste de pH coradas-Merge; e Microscopia ótica: (D)Gelatina e Triacetina, com ajuste de pH - coradas.

Os biofilmes compostos de gelatina, triacetina e ácido esteárico, ilustrados na figura 23 apresentam dispersão de gotas de óleo na matriz filmogênica, onde o ácido esteárico pode ser observado indicando a heterogeneidade do filme. Isso foi também observado pela microscopia ótica (Figura 23D) e também confirmado pela microscopia eletrônica de varredura (Figura 18E) e pelo alto valor na permeabilidade ao vapor de água obtido para este filme (Tabela 6). Resultados semelhantes foram observados por BERTAN (2003), onde nas imagens dos filmes compostos (gelatina, triacetina e ácidos esteárico e palmítico), gotas dos ácidos graxos foram observadas separadas na matriz, sugerindo um material heterogêneo, contendo duas fases, a matriz polimérica e a fase de ácidos graxos.

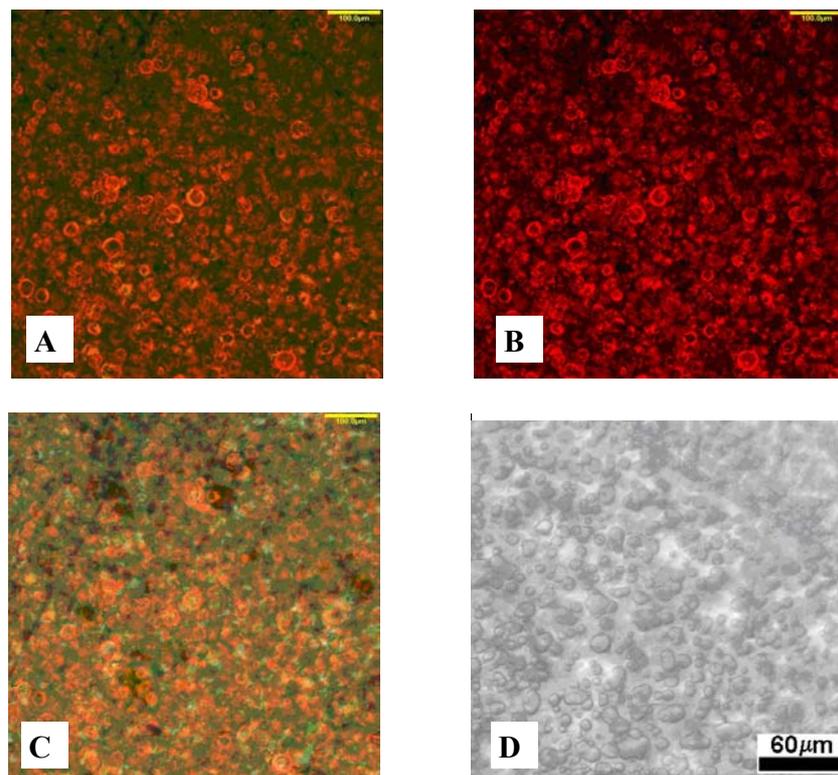


Figura 23. Microscopia confocal a laser.(A)gelatina, triacetina e ácido esteárico sem o ajuste de pH coradas-FITC; (B) .gelatina, triacetina e ácido esteárico coradas-Nile-Red; (C)gelatina, triacetina e ácido esteárico coradas-Merge; e microscopia ótica: (D)gelatina, triacetina e ácido esteárico.

Através da microscopia confocal, os filmes compostos de gelatina, triacetina e ácido esteárico, com o pH ajustado conforme observado na figura 24, apresentaram uma dispersão maior das gotas de gordura, comparado ao filme sem ajuste de pH, indicando que o ajuste do pH apresentou um papel importante na maior homogeneização lipídica na matriz filmogênica, com uma melhor incorporação do ácido graxo na mesma. O efeito foi também corroborado pela microscopia eletrônica de varredura (Figura 18F) e pelo baixo valor de permeabilidade ao vapor de água obtido para esta formulação (Tabela 6).

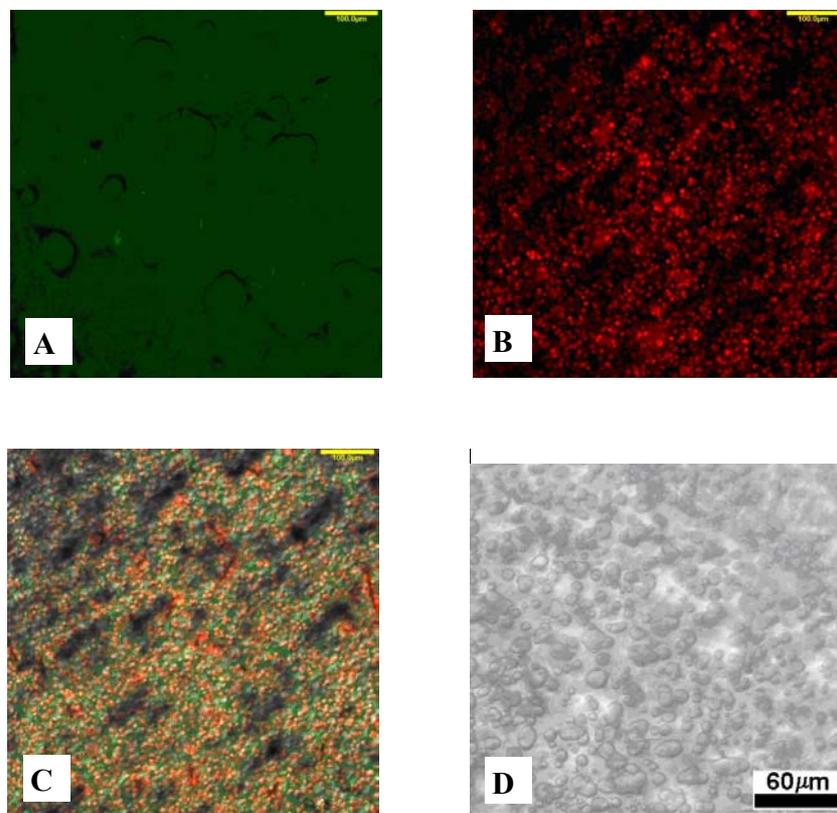


Figura 24. Microscopia confocal a laser.(A)gelatina, triacetina e ácido esteárico, com ajuste de pH coradas-FITC; (B) .gelatina, triacetina e ácido esteárico com ajuste de pH coradas-Nile-Red; (C)gelatina, triacetina e ácido esteárico com ajuste de pH coradas-Merge; e Microscopia ótica: (D)gelatina, triacetina e ácido esteárico - com ajuste de pH.

A morfologia do biofilme de gelatina, triacetina e ácido caprónico esta apresentada na Figura 25. Novamente o ácido caprónico não apresentou uma boa incorporação na matriz filmogênica mesmo estando presente em menor quantidade (5%) em relação a formulação contendo ácido esteárico. O efeito é também observado pela microscopia ótica (Figura 25D) e pela microscopia eletrônica de varredura (Figura 18C).

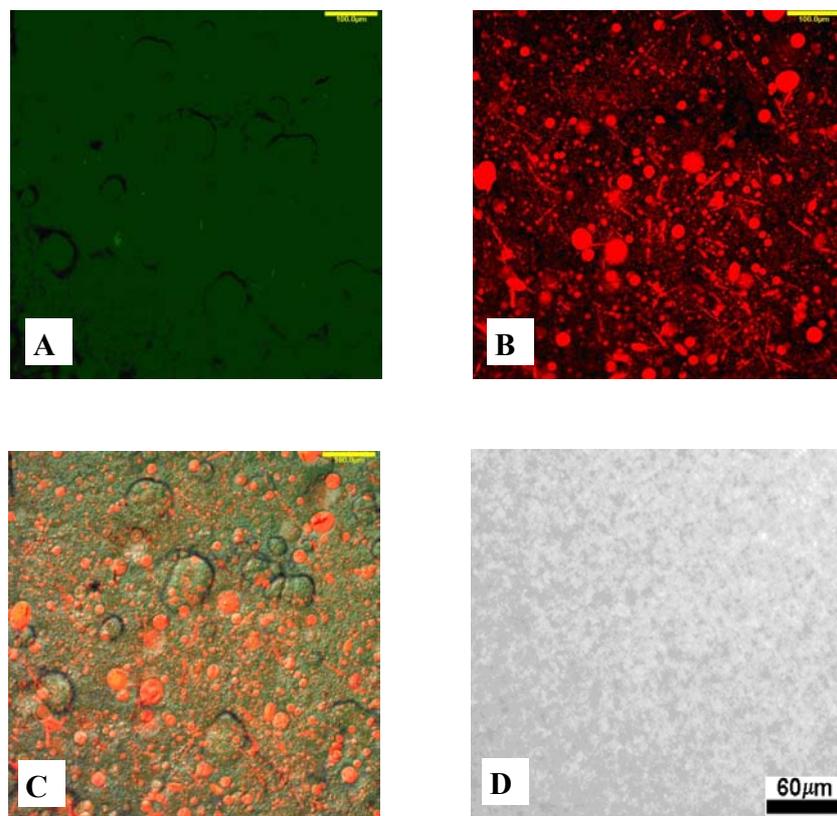


Figura 25. Microscopia confocal a laser.(A)Gelatina, Triacetina e Acido caprónico coradas-FITC; (B) .Gelatina, Triacetina e Acido caprónico coradas-Nile-Red; (C)Gelatina, Triacetina e Acido caprónico coradas-Merge; e Microscopia ótica: (D)Gelatina, Triacetina e Acido caprónico.

Conforme observado para o filme contendo gelatina, triacetina e ácido esteárico com ajuste de pH (Figura 24) o efeito do ajuste para o filme contendo o ácido capróico parece também ter possibilitado uma melhor incorporação do conjunto hidrofóbico a matriz protéica de acordo com a figura 26.

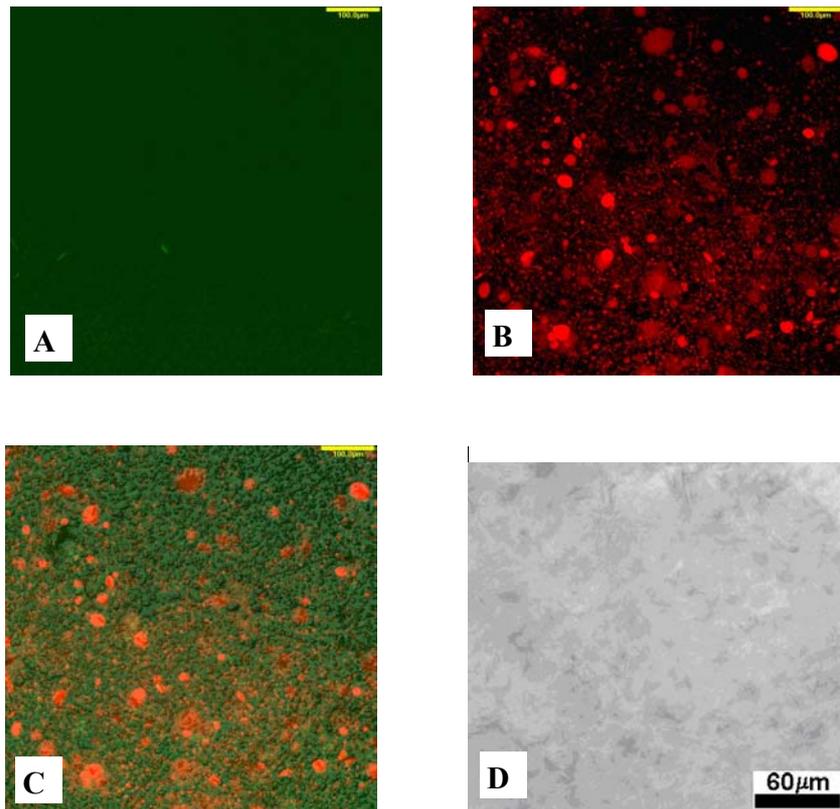


Figura 26. Microscopia confocal a laser.(A)gelatina, triacetina e ácido capróico, com ajuste de pH coradas-FITC; (B) .gelatina, triacetina e ácido capróico com ajuste de pH coradas-Nile-Red; (C)gelatina, triacetina e ácido capróico com ajuste de pH coradas-Merge; e Microscopia ótica (D)gelatina, triacetina e ácido capróico com ajuste de pH.

Com a adição do surfactante (Figura 27), pode-se observar que houve uma melhora na incorporação das substâncias hidrofóbicas, sendo visível a ausência das gotas de gordura, comparado aos filmes sem a adição de surfactantes. Essa formulação apresenta-se homogênea comparada com as anteriores. Isso pôde também ser observado (Tabela 6) pela baixa permeabilidade ao vapor de água que este filme apresentou. Na imagem 27C - (Merge), não foi possível visualizar a cor verde (representada pelo FITC), nem a cor vermelha (representada pelo Nile-Red), evidenciando que houve uma mistura de ambas as cores resultando no amarelo, e assim sugerindo e reforçando a possibilidade da melhor incorporação da substância hidrofóbica na matriz protéica. O amarelo é constituído por uma blenda de cores, sendo criado pela mistura do vermelho e verde (OTTERSTATTER, 1999).

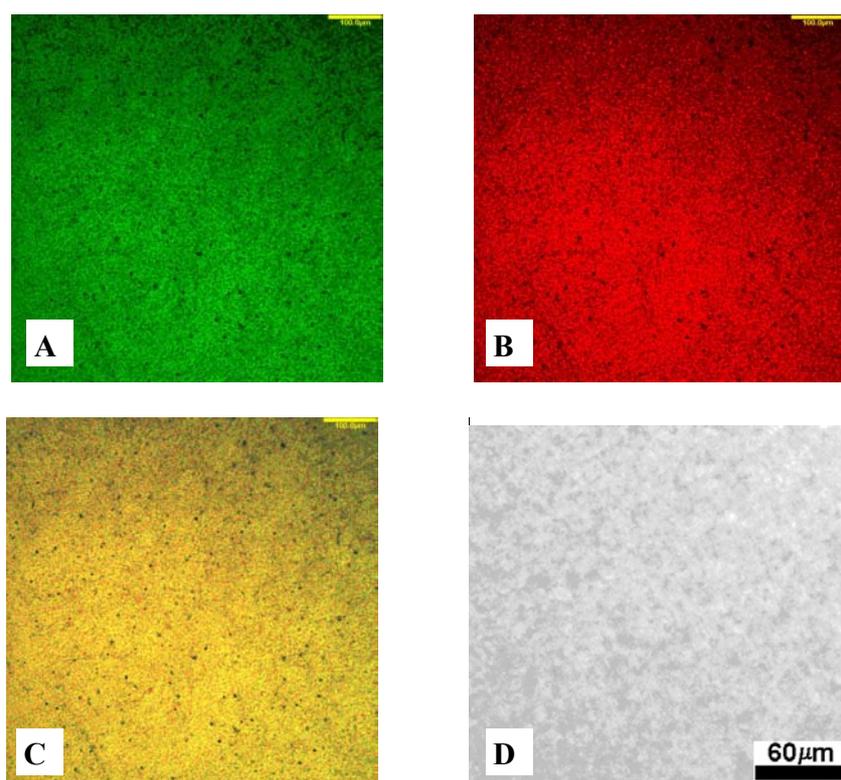


Figura.27. Microscopia confocal a laser.(A)gelatina, triacetina, ácido esteárico e 70% SDS (coradas-FITC); (B) .gelatina, triacetina, ácido esteárico e 70% SDS (coradas-Nile-Red); (C)gelatina, triacetina, ácido esteárico e 70% SDS (coradas-MERGE); e Microscopia ótica : (D)gelatina, triacetina, ácido esteárico e 70% SDS.

No filme composto com a gelatina, triacetina, ácido esteárico e 60% SDS, com pH ajustado (Figura 28), uma matriz filmogênica homogênea é observada, sem a presença de gotas de gordura, efeito também confirmado pela baixa permeabilidade ao vapor de água deste filme (Tabela 6). Pequenas imperfeições na matriz filmogênica de cor escura, possivelmente indicando excesso do surfactante, e não incorporação de forma homogênea na matriz. A microscopia ótica sugere o mesmo comportamento (Figura 28D).

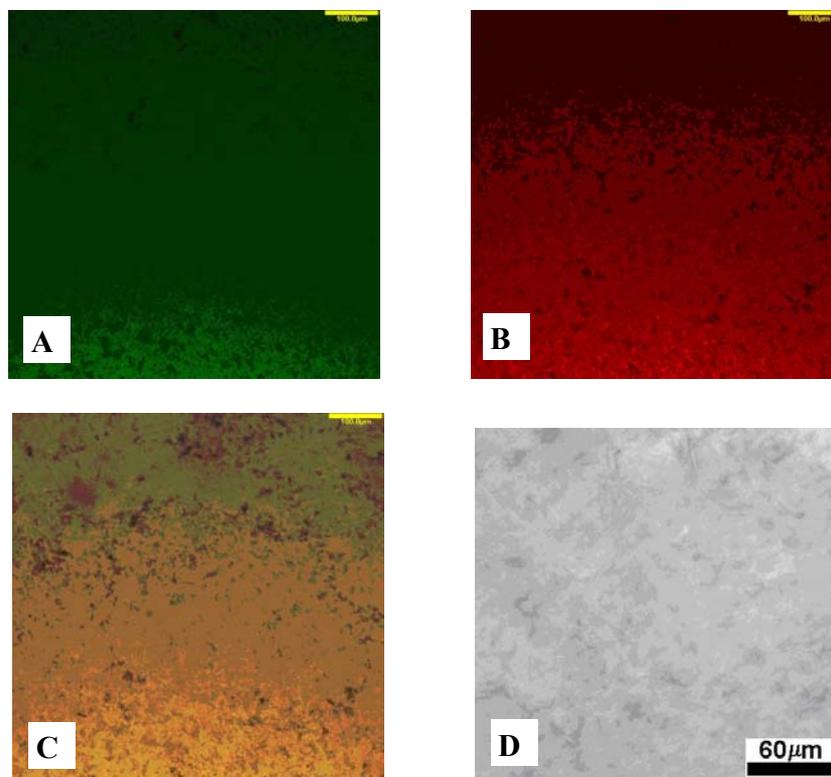


Figura 28. Microscopia confocal a laser.(A)gelatina, triacetina, ácido esteárico e 60% SDS, com ajuste de pH (coradas-FITC); (B) gelatina, triacetina, ácido esteárico e 60% SDS , com ajuste de pH (coradas-Nile-Red); (C)gelatina, triacetina, ácido esteárico e 60% SDS, com ajuste de pH (coradas-Merge); e Microscopia ótica (D)gelatina, triacetina, ácido esteárico e 60% SDS, com ajuste de pH.

Foi observado no filme de gelatina, triacetina, ácido esteárico e 40% de SDS (Figura 29), o mesmo comportamento observando nas figuras 27 e 28, com a ausência das gotas de gordura, porém a matriz filmogênica apresenta algumas imperfeições em relação aos casos anteriores, devido a cor mais esverdeada, supondo assim uma menor incorporação do ácido graxo na proteína. A microscopia ótica corrobora o resultado observado (Figura 29D).

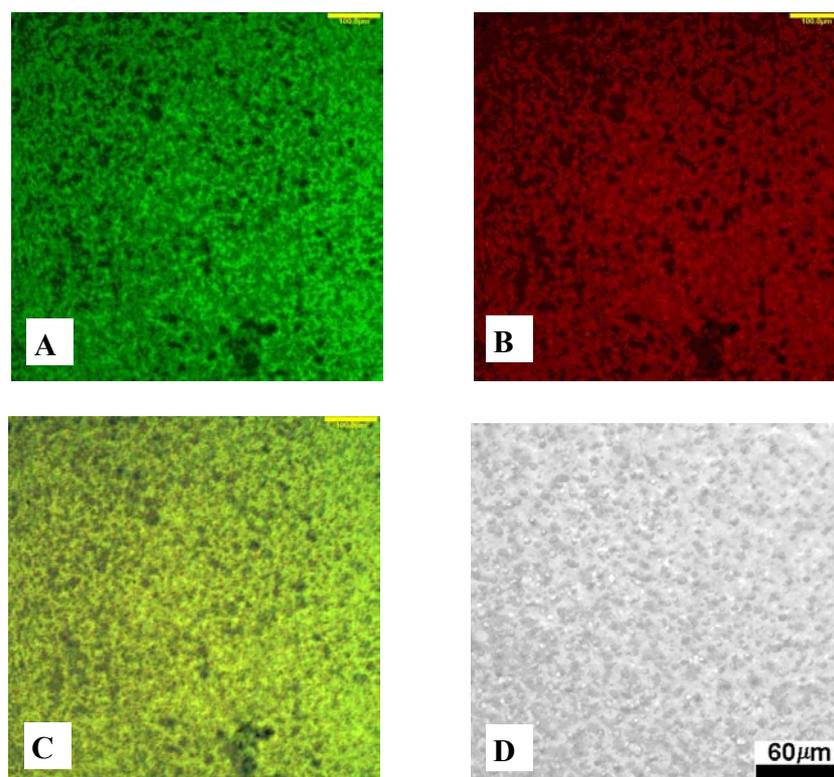


Figura 29. Microscopia confocal a laser.(A)gelatina, triacetina, ácido esteárico e 40% SDS (coradas-FITC); (B) .gelatina, triacetina, ácido esteárico e 40% SDS (coradas-Nile-Red); (C)gelatina, triacetina, ácido esteárico e 40% SDS (coradas-MERGE); e Microscopia ótica: (D)gelatina, triacetina, ácido esteárico e 40% SDS.

Nas imagens da microscopia confocal, da figura 30, é possível observar uma matriz filmogênica com irregularidades, que pode ter sido devido ao excesso da mistura dos surfactantes não incorporados a matriz filmogênica. Porém quando se observa a microscopia ótica (Figura 30D) constata-se a presença de pequenas gotas de óleo dispersas na matriz. Entretanto, essa formulação apresentou valor baixo de permeabilidade ao vapor de água (Tabela 6), indicando uma melhor dispersão das substâncias hidrofóbicas na matriz, onde a incorporação não parece ter sido completa.

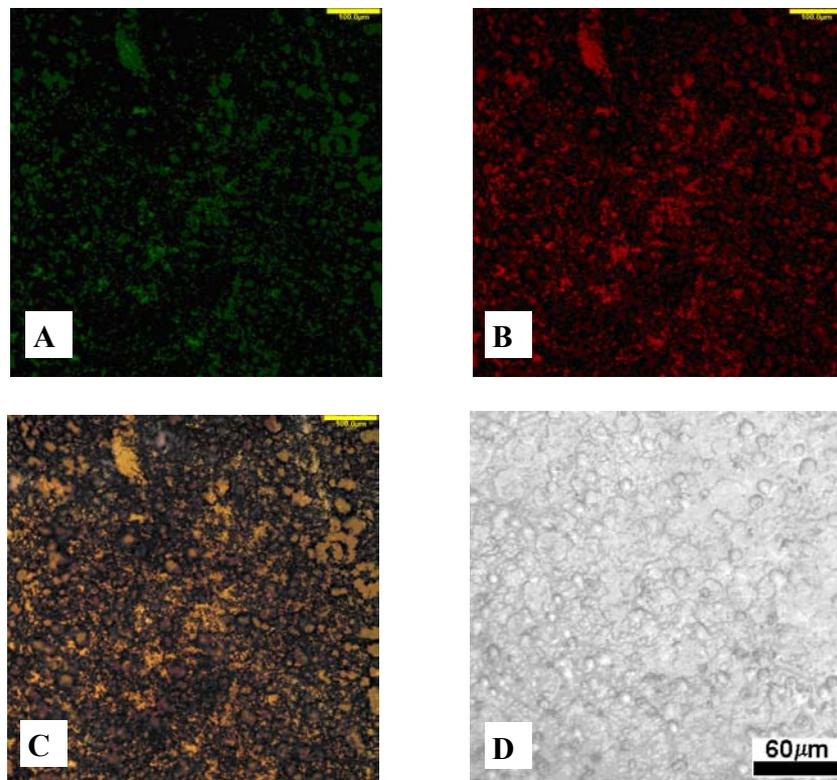


Figura 30. Microscopia confocal a laser (A)Gelatina, Triacetina, Acido esteárico e 50% SDS e 50% TWEEN 80(coradas-FITC); (B) .Gelatina, Triacetina, Acido esteárico e 50% SDS e 50% TWEEN 80 (coradas-Nile-Red); (C)Gelatina, Triacetina, Acido esteárico e 50% SDS e 50% TWEEN 80 (coradas-Merge); e Microscopia ótica: (D)Gelatina, Triacetina, Acido esteárico e 50% SDS. e 50% TWEEN 80.

A formulação contendo gelatina, triacetina, ácido esteárico e 50% SDS e 50% Tween 80, com ajuste de pH (Figura 31), apresenta uma matriz filmogênica sem a presença das gotas de gordura, porém podem ser observados irregularidades como as observadas na figura 30. Na microscopia ótica (Figura 31D) foi observado uma diminuição na dispersão das gotas de gordura. Essa formulação apresentou um baixo valor de permeabilidade ao vapor de água (Tabela 6), sugerindo que a substância hidrofóbica esteja melhor incorporada na matriz, e que as irregularidades observadas possam ser produzidas pelo excesso de surfactante na matriz.

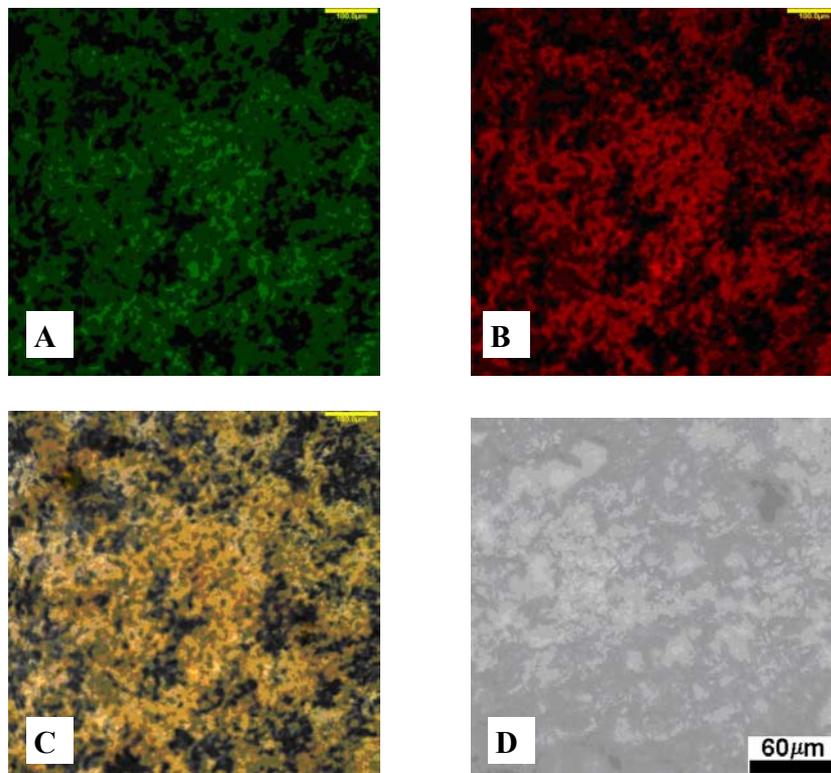


Figura 31. Microscopia confocal a laser.(A)gelatina, triacetina, ácido esteárico e 50% SDS e 50% TWEEN 80, com ajuste de pH(coradas-FITC); (B) .gelatina, triacetina, ácido esteárico e 50% SDS e 50% TWEEN 80, com ajuste de pH (coradas-Nile-Red); (C)gelatina, triacetina, ácido esteárico e 50% SDS e 50% TWEEN 80, com ajuste de pH (coradas-Merge); e Microscopia ótica: (D)gelatina, triacetina, ácido esteárico e 50% SDS. e 50% TWEEN 80, com ajuste de pH.

Na formulação de gelatina, triacetina, ácido capróico e 75% SDS e 25% Tween, 30% da concentração do surfactante (Figura 32), é possível observar uma matriz filmogênica homogênea, sem a presença de glóbulos de gordura e com a imagem C (Merge) amarelada, indicando que houve mistura da substância hidrofóbica corada em vermelho (Nile Red), com a proteína corada em verde (FITC). Essa maior homogeneidade pode ser devido ao ácido graxo de menor cadeia carbônica e também por ele ter sido usado em menor proporção que o ácido esteárico, o que pode ter facilitado a função emulsionante do surfactante.

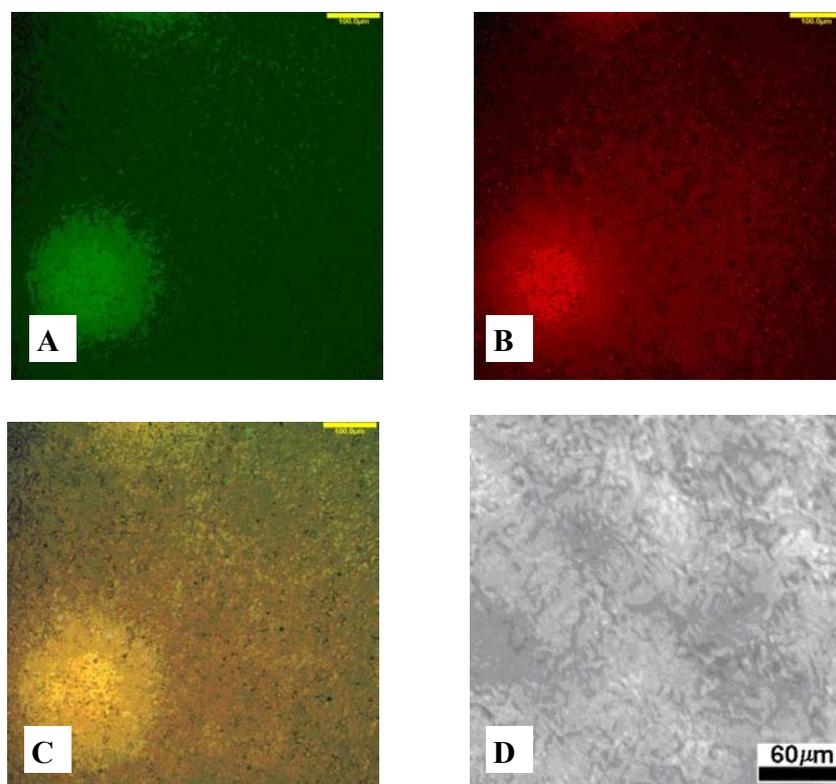


Figura 32. Microscopia confocal a laser.(A)gelatina, triacetina, ácido capróico e 75% SDS e 25% TWEEN 80=30% da concentração da mistura do surfactante, (A) FITC; (B) NILE RED; (C) MERGE e Microscopia ótica: (D)gelatina, triacetina, ácido capróico e 75% SDS. e 25% TWEEN 80=30% da concentração da mistura do surfactante.

4.9 Isotherma de sorção

Foram determinadas as curvas de sorção de água dos filmes de gelatina triacetina, ácido esteárico ou ácido capróico e surfactantes (SDS e TWEEN 80) e mistura de ambos, com e sem o ajuste de pH. Através das isothermas de sorção, obtêm-se informações do teor de umidade de equilíbrio em filmes protéicos em função da umidade relativa. Polímeros hidrofílicos, como as proteínas, contém 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 isothermas de sorção podem indicar o comportamento dos filmes protéicos quanto as propriedades de absorção de água em diferentes umidades relativa (KIM; USTUNOL, 2001).

CARVALHO (2002); YOSHIDA (2002) e BERTAN (2003), concluíram que o modelo GAB foi o mais ajustado para representar as curvas características dos isothermas de sorção de filmes semelhantes aos usados neste trabalho. A equação de GAB foi o modelo que também melhor representou as isothermas de sorção de filmes de isolado protéico de soro de leite (COUPLAND, et. al., 2000), de gelatina (GONTARD et. al., 1993; LIM et. al., 1999), de glúten de trigo e zeína de milho (GENNADIOS e WELLER, 1994); de metil celulose (CRUZ et. al, 2001).

Assim, o modelo de GAB foi utilizado para representar a isoterma de adsorção de vapor de água dos seguintes filmes: (1) Gelatina e Triacetina, (2) Gelatina e Triacetina (com ajuste de pH), (3) Gelatina Triacetina e ácido esteárico, (4) gelatina , Triacetina e ácido esteárico (com ajuste de pH), (5) Gelatina, triacetina e ácido capróico.(6) gelatina, triacetina e ácido capróico (com ajuste de pH), (7)gelatina, triacetina, ácido esteárico e 70%SDS, (8)gelatina , triacetina e 40% SDS, (9)gelatina triacetina, ácido esteárico e 60% SDS, com ajuste de pH, (10)gelatina , triacetina, ácido esteárico e 50% SDS e 50% TWEEN 80,

(11)gelatina, triacetina, ácido esteárico e 50%SDS e 50% TWEEN 80, com ajuste de pH e (12) gelatina, triacetina, ácido caprónico e 75% SDS e 25% TWEEN 80.

Na Figura 33 foi observado que os filmes de ácido caprónico apresentaram maior absorção de água no intervalo estudado, enquanto os filmes com ácido esteárico apresentaram menores umidades. Isso pode ser explicado pela maior hidrofobicidade do ácido esteárico em relação ao ácido caprónico. Comparando os valores da umidade na monocamada (Tabela 24), pode-se observar que os filmes de gel/tri/AC com e sem o ajuste de pH foi superior aos demais. Segundo BERTAN (2003), a adição de substâncias hidrofóbicas provocou diminuição do teor de umidade na monocamada (mo) e este comportamento pode estar relacionado com o aumento da hidrofobicidade dos filmes e conseqüente diminuição da capacidade de absorção de água. Adicionalmente os filmes com ácido caprónico apresentaram maior umidade possivelmente por sua menor hidrofobicidade devido ao tamanho da cadeia ser menor e por sua utilização em menor quantidade que o ácido esteárico. Os componentes hidrofílicos (proteínas) são responsáveis pela afinidade da água no filme, sendo uma característica importante segundo MORILLON et. al., (2000), pois alta umidade relativa, pode-se provocar a hidratação dos filmes. A ligação da água na matriz protéica dependa da composição de proteína, estrutura, polaridade superficial, topografia, porosidade, pH, presença de sais, força iônica e temperatura (KINSELLA, 1984).

Na Figura 34 foi observado que o ajuste do pH nos filmes de gelatina e triacetina provocou redução da capacidade de absorção de água, efeito também observado com relação a permeabilidade ao vapor de água (Tabela 4) desse filme.

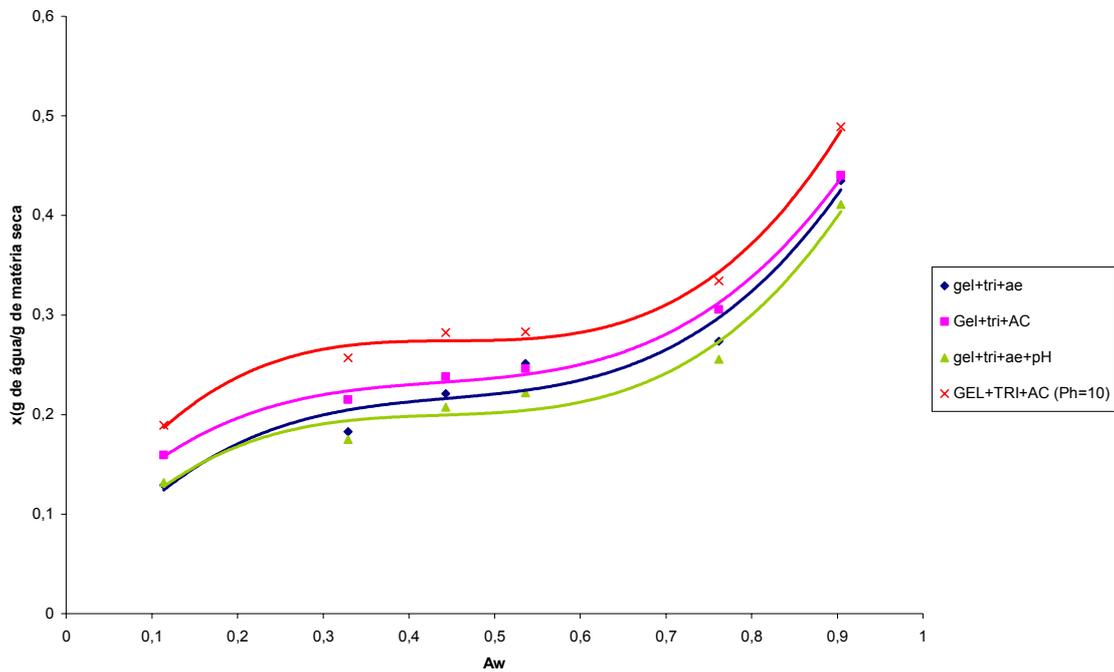


Figura 33. Isothermas de adsorção, ajustadas pela equação GAB, dos filmes de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou ácido capríico com e sem o ajuste de pH.

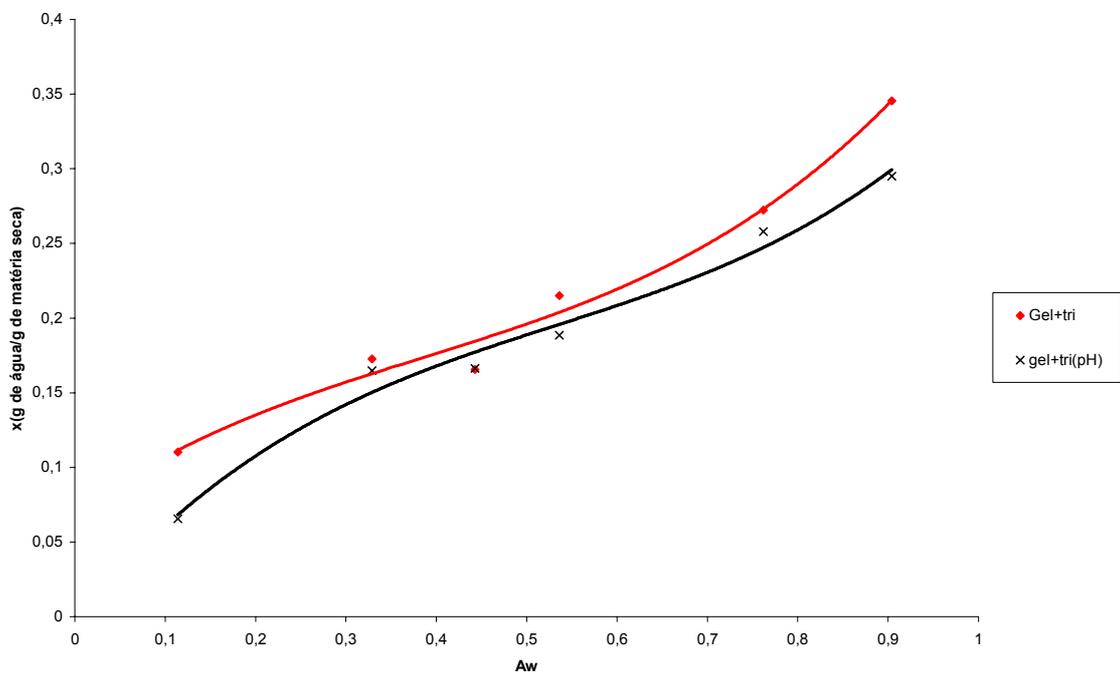


Figura 34. Isothermas de adsorção, ajustadas pela equação GAB, dos filmes de gelatina e triacetina com e sem o ajuste de pH.

Foi observado (Figura 35), que para os filmes de gelatina, triacetina, ácido esteárico e SDS, a umidade da monocamada decresceu com o aumento da concentração de SDS do filme. Possivelmente o SDS seja o responsável por esse comportamento. Isso ocorre também na permeabilidade ao vapor de água onde quanto maior é a concentração de SDS, menor é a permeabilidade ao vapor de água (Tabela 6).

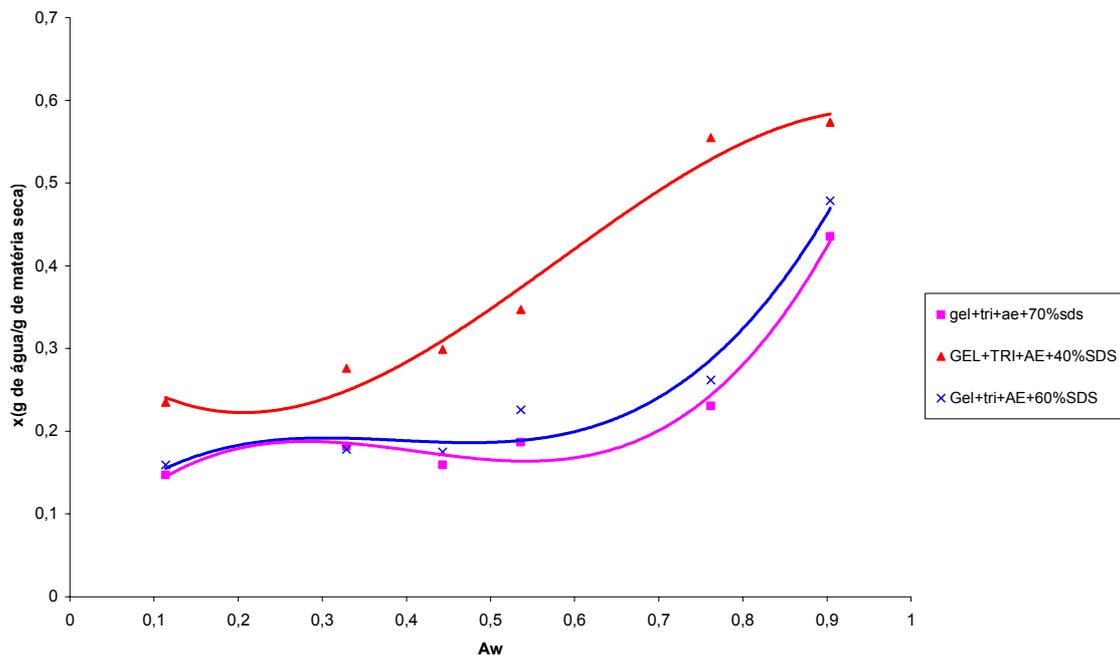


Figura 35. Isotermas de adsorção, ajustadas pela equação GAB, dos filmes de gelatina, triacetina, ácido esteárico e 70% de SDS, 40% de SDS e 60% de SDS (com ajuste de pH).

Na figura 36 foi observado que a curva de adsorção do filme de gelatina, triacetina e ácido esteárico e 50% de SDS e 50% de Tween apresentou forma sigmoidal. Esse tipo de curva é característica da maioria dos produtos alimentícios (FENNEMA, 1985). O ajuste de pH por outro lado produziu a perda da forma sigmoidal da curva.

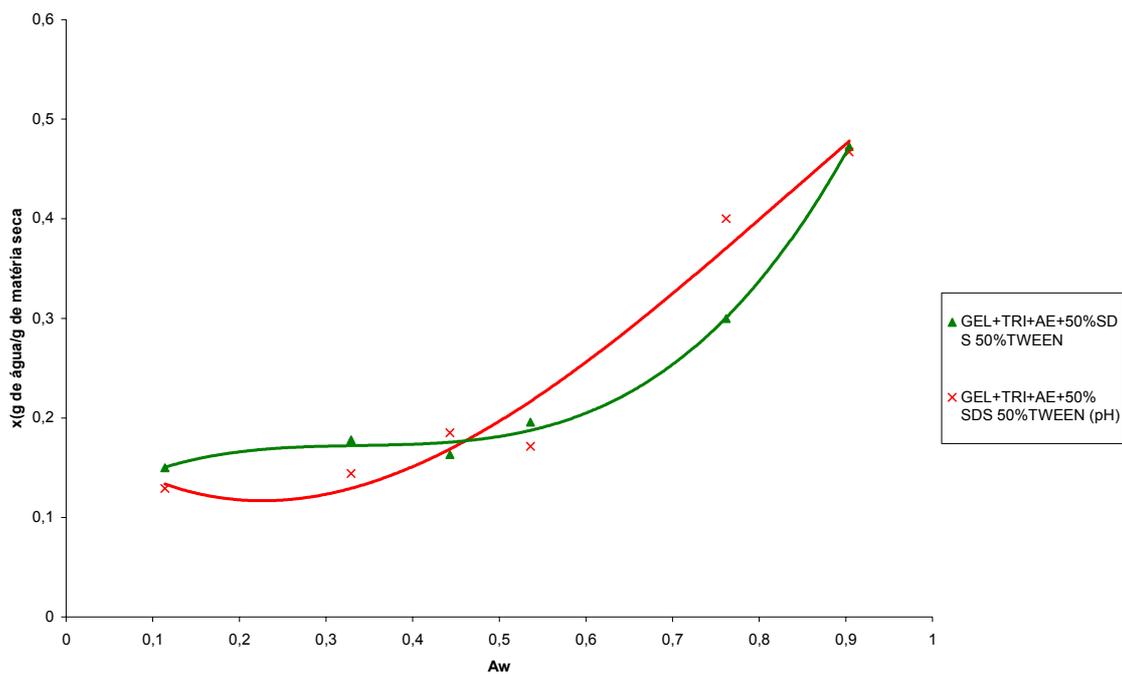


Figura 36. Isotermas de adsorção, ajustadas pela equação GAB, dos filmes de gelatina, triacetina, ácido esteárico e 50% de SDS e 50% de Tween, com e sem o ajuste de pH.

Na figura 37 o filme de gelatina, triacetina, ácido caprótico e 75% de SDS e 25% de Tween (30% da concentração do surfactante), apresentou a menor umidade na monocamada, quando comparada com os filmes de gelatina, triacetina e ácido caprótico. Apresenta forma sigmoidal, com um crescente aumento na curva quando a atividade de água atinge 0,7.

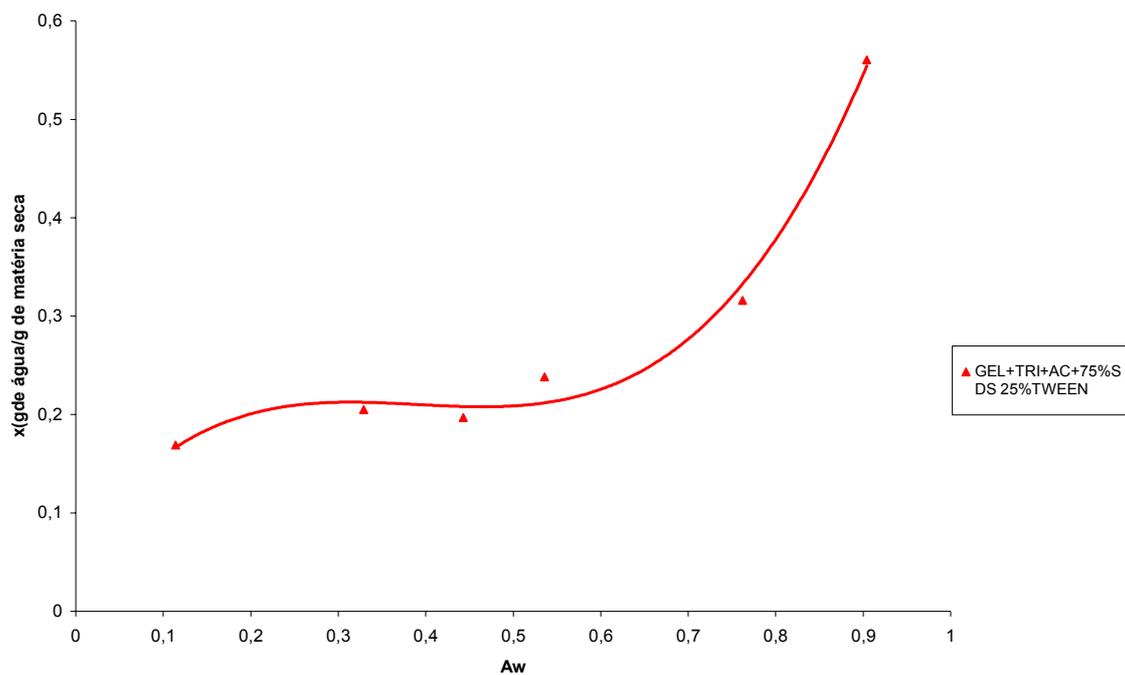


Figura 37. Isotermas de adsorção, ajustadas pela equação GAB, dos filmes de gelatina, triacetina, ácido caprótico e 75% de SDS e 25% de Tween (30% concentração do surfactante).

Os valores dos parâmetros da equação de GAB (m_0 , C_G e K_b) de cada formulação, calculados pelo programa Water Analyser Series – Isoterm/GAB program version 2. 5p. (Macintosh), estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24. Parâmetros (m_0 , C_G e K_b) da equação de GAB das isotermas de sorção em diferentes formulações.

Filmes	m_0 H ₂ O/g sólido	C_G	K_b
Gel/tri	0,1538	49,93	0,68
Gel/tri (pH)	0,2054	8,69	0,45
Gel/tri/AE	0,1538	49,93	0,68
Gel/tri/AE (pH)	0,1340	376,71	0,71
Gel/tri/AC	0,1576	-780,92	0,69
Gel/tri/AC (pH)	0,1862	-230,00	0,65
Gel/tri/AE/70%SDS*	0,0974	-23,06	0,82
Gel/tri/AE/40%SDS*	0,2212	107,14	0,71
Gel/tri/AE/60%SDS* (pH)***	0,1104	-31,25	0,82
Gel/tri/AE/50%SDSe50%Tween80**	0,1019	-28,85	0,86
Gel/tri/AE/50%SDSe50%Tween80**(pH)***	0,1024	-116,92	0,89
Gel/tri/AC/75%SDSe25%Tween80**	0,1219	-32,17	0,84

Gel: Gelatina, Tri: triacetina, AE: ácido esteárico, AC: ácido capróico. *%de surfactante total adicionado em relação a quantidade de gelatina (base seca). **% de cada surfactante da mistura. ***Ajuste de pH.

4.10 Calorimetria Diferencial de varredura (DSC)

Exemplo das curvas obtidas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) para determinação das temperaturas de fusão dos filmes de gelatina e triacetina, de gelatina, triacetina e ácido esteárico, ambos com e sem o ajuste de pH, estão apresentados nas Figuras 38, 39, 40 e 41.

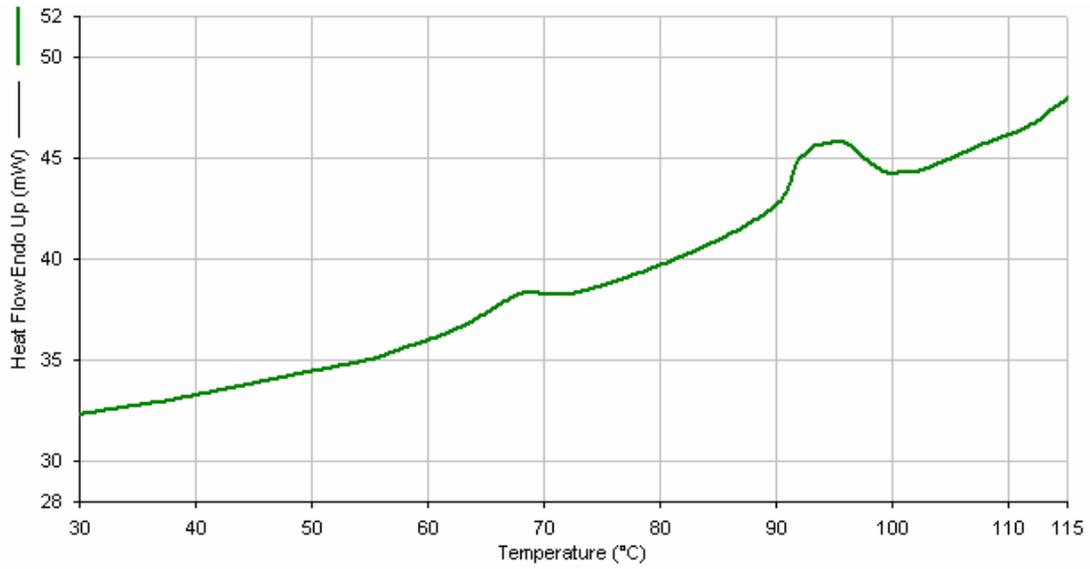


Figura 38. Termograma de DSC dos filmes de gelatina e triacetina.

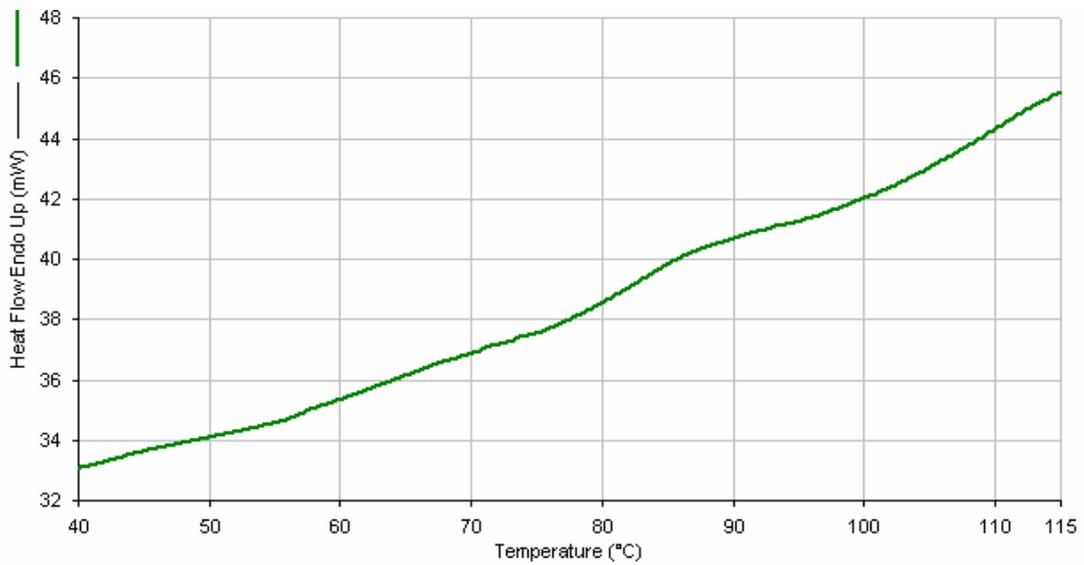


Figura 39. Termograma de DSC dos filmes de gelatina e triacetina com ajuste de pH.

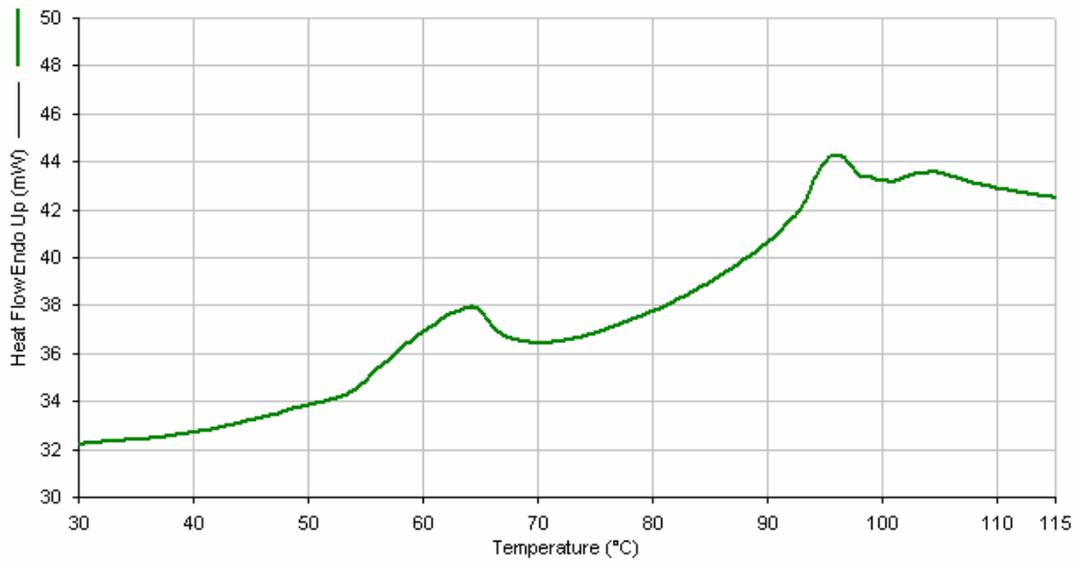


Figura 40. Termograma de DSC dos filmes de gelatina, triacetina e ácido esteárico.

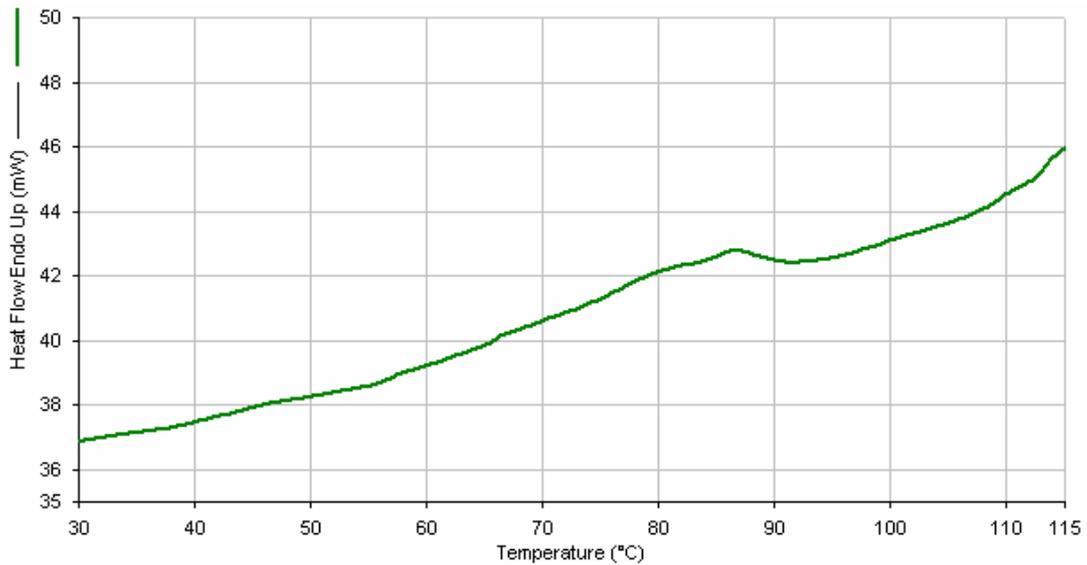


Figura 41. Termograma de DSC dos filmes de gelatina, triacetina e ácido esteárico com ajuste de pH.

Foi possível observar que o filme de gelatina e triacetina, e o filme de gelatina, triacetina e ácido esteárico, com e sem o ajuste de pH, ambos apresentando dois picos de fusão, tiveram um comportamento diferente, com diminuição significativa dos picos, ou seja, o ajuste do pH possivelmente tornou a matriz filmogênica mais homogênea e conseqüentemente os compostos apresentaram-se mais incorporados. A temperatura de fusão dos filmes contendo gelatina e triacetina como para os filmes contendo gelatina, triacetina e os ácidos graxos apresentam-se na faixa de 63,8°C - 115,5°C. Resultados semelhantes foram encontrados por BERTAN (2003) para os filmes de gelatina, triacetina, ácido palmítico e gelatina, triacetina e blenda de ácido esteárico e palmítico, com temperatura de fusão na faixa de 85,62°C - 91,87°C e por SOBRAL (2000) para os filmes de gelatina de couro bovina e suína plastificadas com sorbitol. O autor observou temperaturas de fusão na faixa de 77,6°C – 93,1°C para gelatina de couro bovina e 73,8°C – 93,3°C para de couro suína, conforme a variação na quantidade de sorbitol utilizada.

Os filmes contendo gelatina, triacetina ácido graxo e surfactantes apresentaram-se com comportamentos diferentes. O filme de gelatina, triacetina, ácido esteárico e 70% de SDS (Figura 42) e o filme de gelatina, triacetina, ácido esteárico e 60% de SDS, com pH ajustado (Figura 43), tiveram comportamentos semelhantes, apresentando uma temperatura de fusão em torno de 55°C - 70°C e a outra em torno de 88°C – 110°C, sendo que este segundo pico possivelmente seja o do ponto de fusão do material filmogênico.

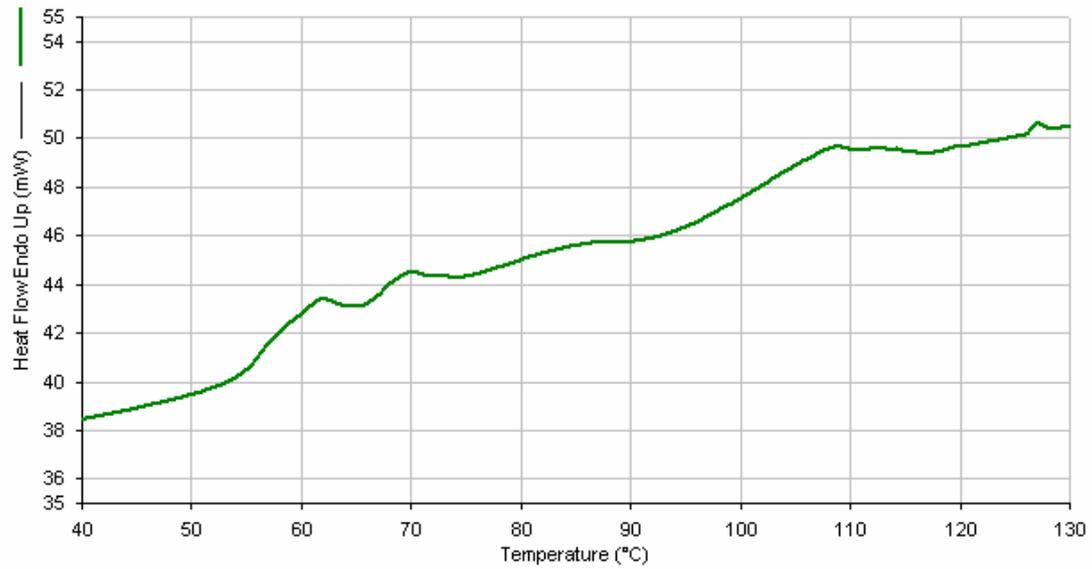


Figura 42. Termograma de DSC dos filmes de gelatina, triacetina, ácido esteárico e 70% de SDS..

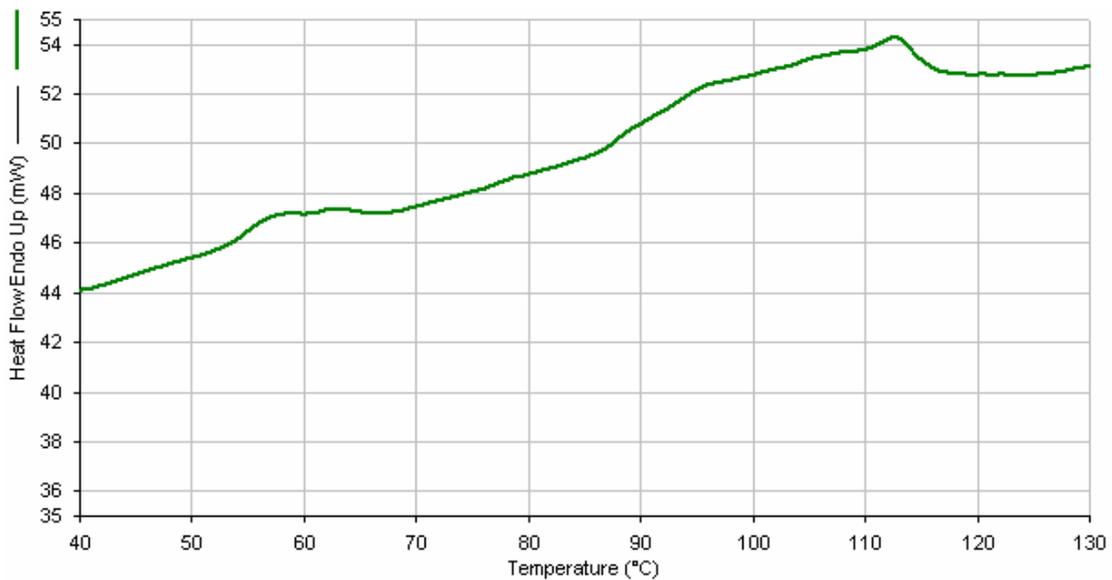


Figura 43. Termograma de DSC dos filmes de gelatina, triacetina, ácido esteárico e 60% de SDS com ajuste de pH.

A formulação com gelatina, triacetina, ácido esteárico e 50% de SDS e 50% de Tween 80, formulação com melhor incorporação dos compostos na matriz filmogênica apresentou apenas um pico de fusão (Figura 44), incorporação com temperatura de fusão de 81°C (Tabela 25). Os filmes com essa formulação apresentou baixa permeabilidade ao vapor de água (2,54g.mm/m²d.KPa) e aparentemente esse filme foi o mais transparente, quando comparado com os filmes adicionados de surfactantes.

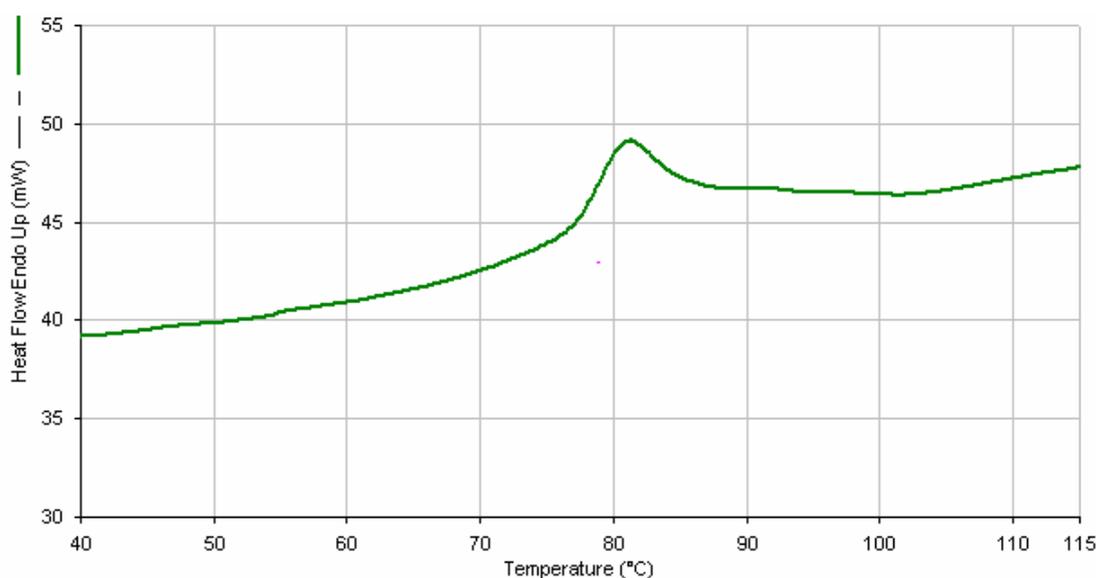


Figura 44. Termograma de DSC dos filmes de gelatina, triacetina, ácido esteárico e 50% de SDS e 50% de Tween 80.

O filme de gelatina, triacetina, ácido capróico e 75% de SDS e 25% de Tween 80, apresentou dois picos com o primeiro ponto de fusão em torno de 45°C -60°C e o segundo ponto de fusão em torno de 110°C – 120°C.

Os filmes de ácido capróico com e sem surfactantes apresentaram dois picos de fusão, um provavelmente seja da matriz filmogênica, e o outro pode ser alguma impureza presente no ácido graxo, já que o ponto de fusão do ácido capróico esta em torno de -4,2°C (Figura 45 e 46). A tabela 25 resume as temperaturas obtidas para os ensaios com a calorimetria diferencial de varredura.

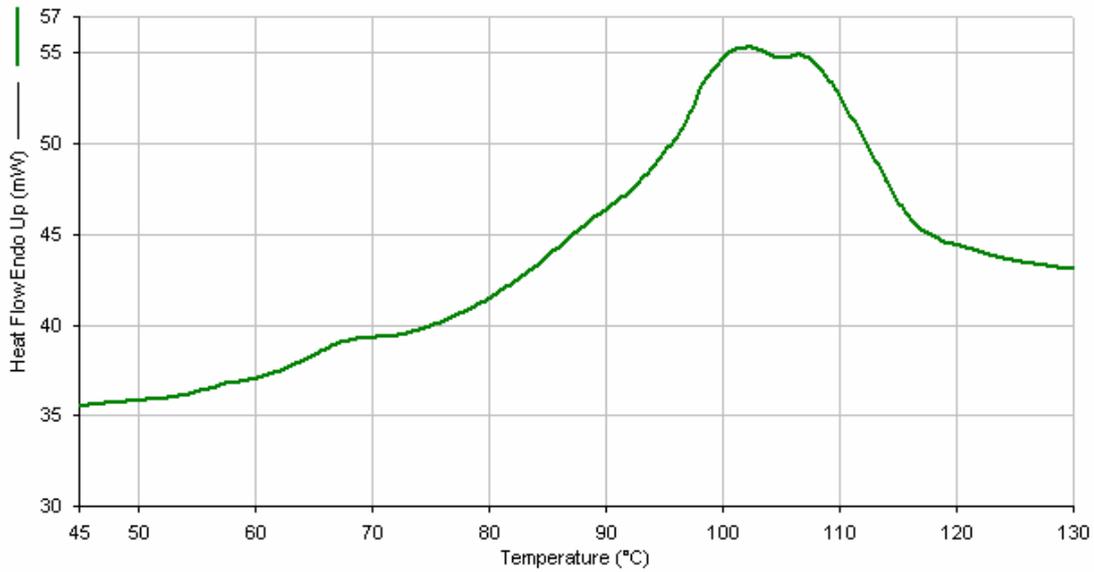


Figura 45. Termograma de DSC dos filmes de gelatina, triacetina e ácido capríco.

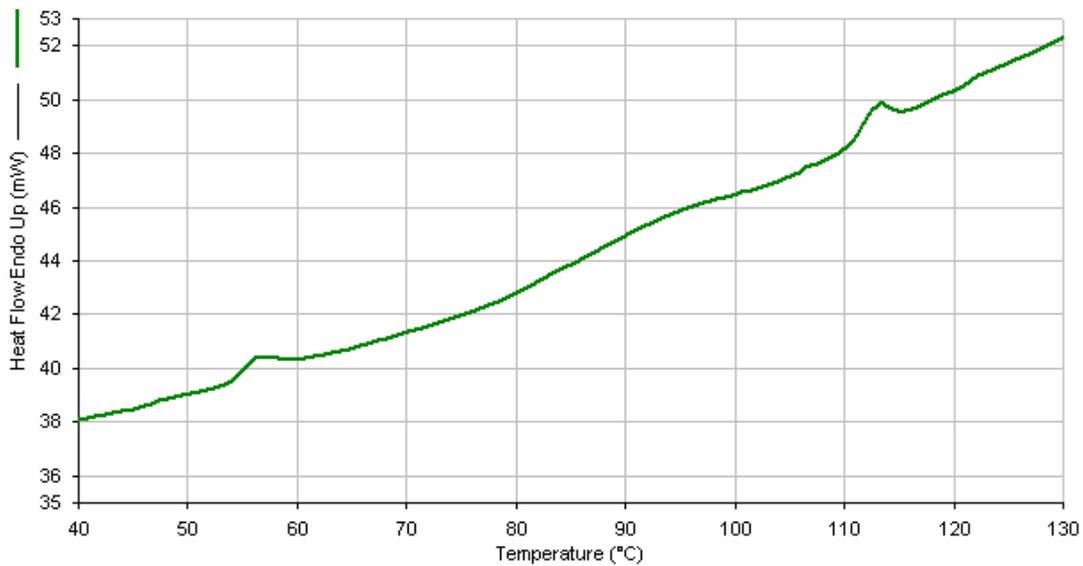


Figura 46. Termograma de DSC dos filmes de gelatina, triacetina, ácido capríco e 75% de SDS e 25% de Tween 80 (30% da concentração do surfactante).'

Tabela 25. Valores de temperatura de fusão (T_m) dos filmes de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou ácido capróico e surfactantes (SDS e Tween).

Formulações	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)
Gel/tri	67,8	93,3
Gel/tri(pH) ^{***}	88,5	–
Gel/tri/AC	67,5	102,3
Gel/tri/AE	63,8	95,5
Gel/tri/AE(pH) ^{***}	86,3	115,5
Gel/tri/AE/70%SDS*	61,5	108,2
Gel/tri/AE/60%SDS*(pH) ^{***}	58,8	94,5
Gel/triAE/50%SDS*e50%Tween*	81,0	
Gel/tri/AC/75%SDSe25%Tween(30%)	56,3	113,2

Gel: Gelatina, Tri: triacetina, AE: ácido esteárico, AC: ácido capróico. *%de surfactante total adicionado em relação a quantidade de gelatina (base seca). **% de cada surfactante da mistura.

^{***}Ajuste de pH.

5. Conclusões gerais

O ácido graxo de maior cadeia (ácido esteárico-18C), produziu menor valor para permeabilidade ao vapor de água comparado ao ácido de cadeia menor (ácido capróico-6C), porém o ácido capróico mostrou-se mais eficiente quanto a resistência mecânica dos filmes sem a adição de surfactantes.

O ajuste de pH para os filmes sem a adição de surfactantes produziu efeitos positivos reduzindo a permeabilidade ao vapor de água em relação aos filmes produzidos no pH natural da solução filmogênica dos sistemas. Este efeito pode também ser observado pela morfologia dos filmes produzindo matrizes mais homogêneas (microscopia eletrônica de varredura, confocal e ótica) e pelas curvas calorimétricas obtidas pelo DSC.

A adição do surfactante SDS, mostrou-se eficiente na diminuição da permeabilidade ao vapor de água dos filmes. O efeito melhora conforme aumenta sua concentração. Por outro lado o aumento da concentração provoca perda das propriedades mecânicas.

A utilização das misturas dos surfactantes SDS e Tween 80, produziram filmes com boas propriedades e de fácil manuseio. A adição do surfactante Tween (sozinho), não produziu filmes manuseáveis e visivelmente homogêneos.

Quando o ácido esteárico foi utilizado a menor permeabilidade ao vapor de água foi produzida quando 70% de SDS foi utilizada comparativamente a todos os outros sistemas contendo surfactantes estudados.

6. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

Os ácidos graxos apresentam dissociação em função do pH e podem também saponificar dependendo da constituição do meio. O estudo em maior profundidade do comportamento frente a diferentes pHs e frente a condições que provoquem efetivamente saponificação é necessário para ácidos graxos de diferentes características.

Incluir surfactantes com HLB menores.

As condições de formação das micelas quando os surfactantes são utilizados dependem fortemente da temperatura do sistema e podem ser representados por diagramas de fase (concentração X temperatura). Considerando que temperaturas mais altas que a ambiente favorecem a utilização de menores quantidades de surfactantes, a possibilidade de secagem dos filmes em temperaturas mais altas na presença dos surfactantes pode ser promissora na obtenção de filmes funcionalmente melhores.

7. Referências Bibliográficas

AMARANTE, C.;BANKS, N. H. Postharvest physiology and quality of coated fruits and vegetables. In: JANICK, **J. Horticultural Reviews**. New York: John Wiley & Sons. v.26, p. 161-238, 2001.

ANKER, M.; STADING, M.; HERMANSSON, A. Aging of whey protein films and the effect on mechanical and barrier properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v.49, n.2, p.989-995, 2001.

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

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.

ASTM.Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting. Method D 882-91. In **Annual Book of ASTM Standards**. American Society for testing and Materials. Philadelphia, PA, p. 316, 1993.

ATKINS, P. W. , **Físico-química**, cap. 13. Macromoléculas e colóides, 6ªed. p.319-348, 1997.

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

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.

BATISTA J. A. Desenvolvimento, Caracterização e Aplicações de Biofilmes a Base de Pectina, Gelatina e Ácidos Graxos em Bananas e Sementes de Brócolos. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas,2004.

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.

BELL, S. J.; BRADLEY, D.; FORSE, R. A.; BISTIRIAN, B.R. **The new dietary fats in health and disease**. J. Am. Diet. Assoc., Chicago, v.97, p.280-286, 1997.

BERTAN, L.C. Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e compostos a base de gelatina, ácidos graxos e breu branco. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 148p. 2003.

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.

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

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, **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, faculdade de Engenharia de Alimentos, campinas, 128 p., 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.

CHAMBI M, H. N. Desenvolvimento de filmes a partir de caseína e gelatina modificadas enzimaticamente com tripsina e transglutaminase. **Tese de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, campinas, 2004.

CHEN, H. Functional properties and applicaions 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. 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.

CHIRIFE, J., and IGLESIAS, H.A. (1978). Equations for fitting water sorption isotherms of foods: Part 1. A review. **Journal of Food Technology**. 13: 159-174.

COLLA R. E. Biofilmes de farinha de amaranto adicionados de ácido esteárico: elaboração e aplicação em morangos frescos (*Fragaria ananassa*), **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, faculdade de Engenharia de Alimentos, campinas, 198 p., 2004.

COUPLAND, J. N.; SHAW, N. B.; MONAHAN, F. J.; O'RIORDAN, D.; O'SULLIVAN, M. Modeling the effect of glycerol on the moisture sorption behavior

of whey protein edible films. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.43, n.1, p.25-30, 2000.

CRUZ, G. V.; TORRES, J. A.; MARTIN-POLO, M. O. Temperature effect on the moisture sorption isotherms for methylcellulose and ethycellulose films. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.49, n.1, p.91-94, 2001.

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.

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

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J.A.; VOILLEY, A. Edible Films and coatings: tomorrow's packagings: a review. **Critical reviews in Food Science and nutrition**, Boca Raton, v.38, n.4, p.299-313, 1998.

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J-A; VOILLEY, A. Edible Films and coatings: tomorrow's packagings: a review. **Critical reviewa an Food Science and Tecnology**, 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

DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. **Critical Reviews in Food Science**, v. 38, n.4, p.299-313, 1998.

DHAYMERS: Química Fina. www.dhaymers.com.br, 2005.

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.

FAIRLEY, P.; MONAHAN, F. J.; GERMAN, B. B.; KROCHTA, J. M. Mechanical properties and water vapor permeability of edible films from whey protein isolate and N-ethylmaleimide or cysteine. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, n. 12, p.3789-3792, 1996.

FAKHOURI, F. M. Coberturas comestíveis aplicadas na preservação de goiabas in natura (*Psidium guajava*), **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, faculdade de Engenharia de Alimentos, campinas, 198 p., 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-linkes orient gelatin: II Effect of orientacion an water content on transition temperatures. **Colloid Polymer Science**, Berlin, v. 275, n.4, p.307-314, 1997.

FENNEMA O. R. **Food Chemistry**, Marcel Dekker Inc. p..249, 1995.

FERRY, J. D. Viscoelastic **Properties of Polymers**, 3° ed., New York, John Wiley & Sons, p.641, 1980.

GALIETTA, G.; GIOIA, L.; GUILBERT, S.; CUQ, B. Mechanical and thermomechanical properties of film base don whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. **Journal of dairy Science**, Savoy, v.81, n.12, p.3123-3130, 1998.

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

GENNADIOS, A., WELLER, C. L.; TESTIN, R. F. Property modification of edible wheat, gluten-based films. **Transactions of American Society of Agriculture Engineers**, 36: 465-470, 1993

GENNADIOS, A.; HANNA, M.A.; KURTH, L.B. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: a review. **Lebensm. – Wiss. u. – Technol**, v.30, p.337-350, 1997.

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.

GENNADIOS, A.; WELLER, C. L. Moisture adsorption by grains protein films. **Transactions of American Society of agricultural Engineers**, St Joseph, v37, n.2, p.535-539, 1994.

GENNADIOS, A.; WELLER, C.L. Edible films and coatings from wheat and corn proteins. **Food Technology**, v. 44, p. 63-69, 1990.

GENNADIOS, A.; WELLER, C.L.; TESTIN, R. F. Modification of physical and barrier properties of edible wheat gluten-based films. **Cereal Chemistry**. St. Paul, v.70, p.426-429. 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.; GUILBERT, S. Bio-packing: technology and properties of edible and biodegradable material of agricultural origin. **Boletim da SBCTA**, v.30 n.1, p.—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-Q. 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.1p.206-211, 1993.

GRIFFIN, W. C., Classification of surface-active agents by "HLB"., **J. Soc. Cosmetic Chemistry**, 1, 311-326, 1949.

HAGENMAIER R.D. & SHAW P.E. Gas permeability of fruit coating waxes. **Journal American Society Horticulture Science**, 117(1):105-109, 1992.

HAN, J. H. Antimicrobial food packaging. **Food Technology**, Chicago, v.54, n.1, p.56-65, 2000.

HANDA, A.; GENNADIOS, A.; FRONING, G. W. KURODA, N.; HANNA, M. A. Tensile, solubility, and electrophoretic properties of egg white films as affected by surface sulfidryl groups. **Journal of Food Science**, Chicago, v.64, n.1. p.82-85, 1999.

<http://gmc.ufsc.br/gmcweb/micela/>. Aula virtual. Surfactantes e micelas.

http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=25 (Instituto Nacional do Câncer,2005)

JANGCHUD, A., CHINNAN, M. S. Properties of peanut protein film : sorption isotherm and plasticizer effect. **Lebensm. Wiss. U. Technolo.** 32:89-94, 1999.

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

JOWITT, R.; ESCHER, F.; HALLTOM, B.; MEFFERT, H. F. T.; SPIESS, W.E.L. e VOS, G. **Physical Properties of Foods**, London and New York, Ed. Appliede Science Publishers, 1983.

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, 1984.

KELLA, N. K. D. YANG, S. T. ; KINSELLA, J. E. Effect of disulfide bond-cleavage on structure and interfacial properties of whey proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.37, n.5, p.1203-1210, 1999.

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

KIM, 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.

KIRK, OTHMER. Enciclopedia de tecnologia quimica. 1997

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

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.

LABUZA, T P; KANANE, A, CHEN, J Y; Effect of temperature on the moisture sorption and water activity shif 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: strututre, capsule wall composition and encapsulation rate. **Europea Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.**, v.49, p.1-9, 2000.

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

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. 111-117, 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.

McHUGH, T. H. KROCHTA, J. M. Milk-protein-based edible films and coating. **Food Technology**. Chicago, v.48, n.1, p.97-103, 1994a

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

MINATTI, E. Um novo modelo para a interação entre polímeros neutros hidrossolúveis e surfactantes. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Departamento de Química, Florianópolis, 2005.

MORILLON, V.; DEBEAUFORT, F.; CAPELLE, M.; BLOND, G. ; VOILLEY, A. Influence of the physical state of water on the barrier properties of hydrophilic films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Wahington, v.48, n.1, p.11-16, 2000.

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 Comestics**. Ed. Marcel Dekker, New York, p.1, 1999.

OXITENO. **Boletim técnico**. Cs 20. e-mail: gemerc@oxiteno.com.br.

PÉREZ –GAGO, M. B.; KROCHTA, J.M. Water vapor permeability of whey protein emulsion films as affected by pH. **Journal of Food Science**, Chicago, v.64, n.4, p.695-698, 1999.

PEREZ-GAGO; KROCHTA, J.M. Desnaturation 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.

PEROVAL, 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.

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

PORTER, M.R. **Handbook of surfactants**. New York: Chapman & Hall,. 227p 1991.

RHIM, J. A.; GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; HANNA, M. M. Sodium dodecyl treatment improves properties of cast films from soy protein isolate. **Industrial Crops and products**, Lincoln, v.15, p.199-205, 2002.

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

ROBERTSON, G.L. Optical and mechanical properties of thermoplastic polymers. In ROBERTSON, G.L. **Food packaging: principles and practice**. Nova Iorque: Marcell Dekker Inc., 1993.

ROCHA, J. M. S., **Boletim de Biotecnologia**. Aplicações de agentes tensoativos em biotecnologia.Coimbra, n.64, p. 5-11, 1999.

ROSSETTI. Dicionário Quimicamente Falando. www.rossetti.eti.br, 2004.

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.

SAS. Statistical Analytical System. **SAS Institute** Inc, SAS Campus Drive, Cary, Caroline, USA.

SCHNEPF, M. Protein-water interactions. In: HARDMAN, T.M. **Water and Food Quality**. England: Elsevier Science Publishers, p.135-168, 1989.

SGARBIERI, V. **Proteínas em Alimentos Protéicos: propriedades, Degradação e modificação**. São Paulo, Ed. Varela, p.517, 1996.

SHELLHAMMER, T. H.; KROCHTA, J. M. Edible coatings and film barriers. In: **Lipids technologies and applications**. Gunstone, f. d.; Padçey, f. b.Ch17, p.453-479, 1997.

SHIN, F.F. Edible Films from rice protein concentrate and pullulan. **Cereal Chemistry**, St. Paul. v. 73, n.3, p. 406-409, 1996.

SMAILLI, S. S Microscopia de fluorescência, um novo jeito de olhar as células. **Ciência Hoje**, São Paulo, Abril, p.67-69, 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, p. 95-104, 1997.

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.

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, 207 p., 2001.

SPITZ, LUIS. Technology of Soaps and Detergents. 1997

TADROS, T. F. **Applied Surfactants: Principles and applications**. Weinheim: Wiley-WCH, 2005. 63p.

TANADA-PALMU, P.S. Preparação, propriedades e aplicação de biofilmes comestíveis à base de glúten de trigo. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 244p, 2003.

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

Thermomechanical behavior of gluten films; effect of sucrose, glycerin and sorbitol. **Cereal Chemistry**, Sta. Paul, v. 72, n.1, p.1-6, 1995.

UNICHEMA INTERNATIONAL. **Fatty Acid Data Book**. 2.ed. p.6-7, Federal Republic of Germany, October 1987.

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

WONG, D. W. S., GASTINEAU, F. A., GREGORSKI, K. S., TILLIN, S. J., PAVLATH, A.E. Edible chitosan-lipid films: Microestructure and surface energy. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 40: 540-544, 1992

XIE, L.; HETTIARACHCHY, N. S.; JU, Z. Y.; MEULLENET, J.; WANG, H.; SLAVIK, M.F.; JANES, M. E. Edible film coating to minimize eggshell breakage and reduce post-wash bacterial contamination measured by dye penetration in eggs. **Journal of Food Science**. Chicago, v.67, n.1, p.280-284, 2002.

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

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

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

ZIRBEL, F.; KINSELLA, J. E. Factors affecting the rheological properties of gels made from whey protein isolate. **Milchwissenschaft**, Munich, v.43, n.11, p.691-694, 1988.

ANEXO 1

CONDIÇÕES PARA A MICROSCOPIA CONFOCAL

Samples: Level 12 bit 1.0

Dimensions: X 1024 0.690534 μm
Y 1024 0.690534 μm

Ch 3

Intensity Mapping: Map Ch0: Range=00243 to 04095
Map Ch1: Range=00019 to 04095
Map Ch2: Range=00000 to 04095

Acquisition Parameters:

Channel 1=Fluorescence

Channel 1 Dye=FITC

Channel 2=Fluorescence

Channel 2 Dye=Nile Red

Channel 3=Transmission

Channel 3 Dye=Transmitted

Date=03-16-2005

Time=11:13:18

PMT Voltage Ch1=636

Offset Ch1=0

Gain Ch1=1.000000

PMT Voltage Ch2=410

Offset Ch2=2

Gain Ch2=1.297000

PMT Voltage Ch3=218

Offset Ch3=0

Gain Ch3=1.200000

Frame Filter=4 frame Kalman Filter

Zoom Size=1.000000

Scan Speed=4000

Magnification=20X

Laser-Shutter Ar=Open

Laser-ND Ar=28% transmittance

Laser-Shutter HeNe-G=Open

Laser-ND HeNe-G=55% transmittance

Laser-Shutter HeNe-R=Closed

SecondsPerScanLine=5076

DelayToFirstImagePixelInSecs=0

SourceOfData=PMT 1 PMT 2 PMT 3

Scan Start Mode=Scan started immediately

Acquisition GUID={84315481-9613-11D9-95DD-91B3FBBB9995}

Description: DIC leveling performed on Transmission channel from Live

Display Settings: Gamma 0=0.628000

Gamma 1=0.422000

Gamma 2=1.143000