



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



Desenvolvimento e caracterização de biofilmes ativos à base de polímeros de fontes renováveis e sua aplicação no acondicionamento de pães de forma

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Autora **Larissa Canhadas Bertan**

Orientadora: **Prof. Dra. Fernanda Paula Collares Queiroz**

Co-orientador: **Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch**

Campinas/2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

B461d Bertan, Larissa Canhadas
Desenvolvimento e caracterização de biofilmes ativos à base de polímeros de fontes renováveis e sua aplicação no acondicionamento de pães de forma / Larissa Canhadas Bertan. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Fernanda Paula Collares Queiroz
Co-orientador: Theo Guenter Kieckbusch
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Gelatina. 2. Glúten. 3. Sorbato de Potássio. 4. Embalagem ativa . I. Queiroz, Fernanda Paula Collares. II. Kieckbusch, Theo Guenter. III. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Development and characterization of active biofilms based on polymer from renewed sources and their application to preserve pan breads

Palavras-chave em inglês (Keywords): Gelatin, Gluten, Potassium sorbate, Active packaging

Titulação: Doutorado em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Fernanda Paula Collares Queiroz

Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Lucia Helena Innocentini Mei

Marta Hiromi Taniwaki

Patrícia Sayuri Tanada Palmu

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Fernanda Paula Collares Queiroz

Faculdade de Engenharia de Química

UNICAMP

(orientador)

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Faculdade de Engenharia de Alimentos

UNICAMP

(membro)

Profa. Dra. Lucia Helena Innocentini Mei

Faculdade de Engenharia Química

UNICAMP

(membro)

Dra. Marta Hiromi Taniwaki

Instituto de Tecnologia de Alimentos

ITAL

(membro)

Dra. Patrícia Sayuri Tanada Palmu

ROASTED POTATO

(membro)

Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini

Faculdade de Engenharia de Alimentos

UNICAMP

(suplente)

Profa. Dra. Carmen Cecilia Tadini

Departamento de Engenharia de Química

USP

(suplente)

Dra. Cristiana Maria Pedroso Yoshida

Faculdade de Engenharia de Química

UNICAMP

(suplente)

“É graça divina começar bem.
Graça maior persistir na caminhada certa.
Mas graça das graças é não desistir nunca.”

Dom Hélder Câmara

Dedico, aos meus primeiros educadores na vida, meus pais **Tereza e Levino** e ao meu irmão **Helder**.

Dedico, a **Deus** que torna tudo possível.

AGRADECIMENTO

À Deus, pelo dom da vida, pela presença constante, por seu amor incondicional, por me mostrar uma força que eu mesma não sabia que possuía, por me segurar pelas mãos e fazer meus passos bem mais firmes. Sem Ti nada seria possível!

À Nossa Senhora, que durante toda minha vida nunca desviaste de mim o Vosso olhar, por toda força e coragem que me destes nos meus momentos de dificuldade, ansiedade e insegurança, pelo amor que me impulsiona seguir em frente.

Ao meu Santo Anjo da Guarda, fiel protetor que me foste dado por Deus como companheiro, por me ajudar a captar as mais suaves sugestões e apelos da graça emanados do Coração amabilíssimo de nosso Senhor, ao iluminar minhas dúvidas e me levantar nas quedas

À minha mãe, Tereza, por todo amor, carinho e atenção que recebi durante todos os minutos da minha vida. Eu sou o que sou por sua causa. Só consegui chegar até aqui, concluir mais essa etapa, porque você está junto de mim. Porque carrego tudo de bom que você me deixou: as lições, as ações, os conselhos, as boas lembranças, um exemplo de pessoa e de vida. E carrego, principalmente, o amor que você me deixou, tão grande que poço sentir mesmo na sua ausência. Sinto saudades, mãe. Te amo muito, para sempre!

Ao meu pai, Levino, um dos maiores presentes que Deus me deu. Meu referencial de fé, bondade, força, coragem, ética e determinação. Meu êxito é fruto do seu esforço, doação e renúncia, através de seu incentivo constante reuni forças para vencer todas as dificuldades. Obrigada pela lição de amor e dignidade que me ensina por toda a vida. Te amo!!!

Ao Helder, o irmão que Deus me deu e que se tivesse a chance de escolha, não teria um melhor. Obrigada por todo amor, amizade, carinho, enfim, obrigada por fazer parte da minha vida.... “Foi Deus quem te escolheu pra ser o melhor amigo que eu pudesse ter”.

À minha cunhada, Andréa, por sua amizade, alegria, apoio, carinho, pelos papos divertidos e por sempre torcer por mim.

À minha sobrinha, Ana Sofia, a mais nova jóia dada por Deus para enriquecer e alegrar o tesouro de nossa família. Amo você!!!

À Profa. Dra. Fernanda Paula Collares Queiroz, por sua orientação, amizade, pela confiança, pela liberdade no desenvolvimento deste trabalho e pelo incentivo para que eu me aprimorasse permitindo meu amadurecimento profissional.

Ao Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch, pela co-orientação e pelo cuidado com finalização deste trabalho.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso, Profa. Dra. Lucia Helena Innocentini Mei, Dra. Marta Hiromi Taniwaki, Dra. Patrícia Sayuri Tanada Palmu e Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini, pelas sugestões apresentadas para redação final deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso, por sua amizade, por no início do doutorado ter aberto as portas de seu laboratório para que eu iniciasse minhas atividades, pelo seu incentivo constante e por sempre ter uma palavra de apoio.

À Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini, por sua amizade, delicadeza (obrigada pela mensagem no fim do boneco), confiança, carinho, apoio e pelos ensinamentos com o HPLC.

À Dra. Marta Hiromi Taniwaki (ITAL), por todo seu carinho, atenção e disponibilidade. Por seu apoio durante os testes de difusão, principalmente pelo incentivo quando as coisas não davam certo e por me ajudar crescer como profissional. Por ter proporcionado a minha amizade com os fungos. Obrigada!!!

À Profa. Dra Maria Isabel Rodrigues, por sua ajuda com o planejamento experimental.

À Leiner Davis Gelatin Brasil, pelo fornecimento da gelatina. À Cargill, pelo fornecimento do amido de mandioca e o amido de mandioca modificado. À Corn Product, pelo fornecimento do amido de milho ceroso e amido de milho ceroso modificado.

À todos do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), por todo carinho e ajuda no desenvolvimento da tese.

Aos funcionários do DTA: Alice, Ana Lourdes, Renata, Beth, Ana Koon, Marlene, Tânia, Karina, Jaime, Adauto, Ana Maria, Dona Denir, Diana e Zé Roberto, pela amizade e colaboração, afinal “O êxito também depende de vocês”.

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

À todos da padaria da FEA, especialmente, ao seu Zé por ter me ajudado na elaboração dos pães de forma.

À Renatinha e Noemi, pela amizade e por estarem sempre dispostas em ajudar.

À Andrea, uma irmã que ganhei durante esta trajetória, por seu carinho, bondade, companheirismo, por estar ao meu lado em tudo e para tudo, por muitas vezes me mostrar estradas onde eu via o fim... “Amigo fiel, refúgio poderoso quem o encontrou descobriu um tesouro”.

Aos meus grandes amigos Tom, Ruiva e Fabinho, que estiveram sempre ao meu lado, pelo carinho, apoio, ouvido e alegrias, pois “quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mais aquele que vai acompanhado com certeza chegará mais longe...”.

Aos amigos do DTA, por tornar essa caminhada muito mais alegre.

À Pri Mamede, uma das pessoas mais doce que conheci, por sua amizade, apoio incondicional, por sempre ter uma palavra amiga.....Gratidão eterna gratidão por sua amizade!!

À Pri Vianna, por sua amizade e por todos os momentos que passamos juntas os quais tornaram essa caminhada muito mais suave e alegre.

À todos do Laboratório de Cereais, especialmente a Paula, Leomar, Ricardo e André, pela ajuda no decorrer da minha pesquisa, pela amizade e por tornar os dias de trabalho muito mais agradáveis com suas conversas, conselhos, bom humor e almoços divertidos.

À Fara, minha fiel companheira desde a época do mestrado, pela amizade, pela força em todos momentos, por estar sempre presente, pelo carinho, pelos momentos de descontração no Papai Salim e Akitcabs.

À Lu, por estar sempre comigo, apoiando-me em todos os momentos e dando-me força para vencer todos os obstáculos do dia a dia.

À Bia, uma grande amiga que tive a graça de ganhar durante essa trajetória, por sua bondade, por dividir seus conhecimentos sem pedir nada em troca, pela força e carinho em todos os momentos. Não tenho palavras para agradecer tudo que você fez.

À Marina, preciosa amiga que ganhei durante meu doutorado, por sua bondade, incentivo e por estar sempre disposta em ajudar com sua alegria constante e mais ainda por sempre me mostrar o lado positivo das coisas.

Ao Rodolfo, pela ajuda na realização das análises térmicas e pelas conversas divertidas. Ao Rodrigo Nascimento, pela amizade, pelos momentos compartilhados, pelas conversas e por sua gentileza em ter feito as correções de português da tese.

À todos da TOCA DE ASSIS, especialmente ao Irmão Carmelo, Irmã Antônia, Irmã Bethânia, Irmão Dileto, Irmão Hessed, Fran, Gisa, André, Marcelo, Fernando, Anderson (Pérola) e Naty pelo amor, carinho, apoio, orações e amizade. "Se eu tentasse definir o quão especial tu és pra mim, palavras não teriam fim. Precioso és para Deus e para mim". Amo vocês!!

Ao Padre Roberto José Lettieri e ao Padre João Batista Alves de Almeida Júnior, obrigado por terem dito sim a Deus, pelos cuidados pastorais, por cada Santo Sacrífico, por me guiarem no caminho da salvação, por me ensinarem amar ainda mais Jesus..."Teu sim nos inclina a adorar a Deus....Em Cristo és nosso bom pastor". Amo vocês!

À FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado e reserva técnica (Proc. 04/07880-7) que permitiram a realização deste projeto.

"Agradecer é admitir que houve momento em que se precisou de alguém, é reconhecer que o ser humano jamais poderá lograr para si o dom de ser auto suficiente. Ninguém nasce e cresce sozinho, sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor."

Muito obrigada!

Lara

SUMÁRIO

RESUMO	XLI
ABSTRACT	XLIII
1.0 INTRODUÇÃO.....	1
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 FILMES E COBERTURAS COMESTÍVEIS E/OU BIODEGRADÁVEIS	5
2.2 Características dos filmes	10
2.2.1 Espessura.....	10
2.2.2 Aspecto visual.....	11
2.2.3 Sabor e aroma	11
2.2.4 Cor e opacidade.....	13
2.2.5 Propriedades dos filmes.....	13
2.2.5.1 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)	13
2.2.5.2 Permeabilidade a gases (PO ₂).....	15
2.2.5.3 Propriedades mecânicas.....	17
2.2.5.4 Solubilidade em água.....	18
2.3 Filmes ativos.....	19
2.4 Proteínas do trigo.....	22
2.5 Gelatina	25
2.6 AMIDO.....	28
3.0 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Material.....	31
3.2. ELABORAÇÃO DOS FILMES	32
3.2.1. Filme à base de gelatina (GEL).....	32
3.2.2. Elaboração de filme à base de glúten (GLU).....	32
3.2.3 Filmes à base de amido de mandioca (AM) ou mandioca modificado (AMM)	33

3.2.4 Filmes à base de amido de milho ceroso (AMC) ou milho ceroso modificado (AMCM)....	33
3.2.5 Filmes compostos	33
3.2.6 Filmes ativos	33
3.3 METODOLOGIA DE CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES SIMPLES E COMPOSTOS	34
3.3.1 Caracterização dos filmes.....	34
3.3.1.1 Aspecto visual.....	34
3.3.1.2 Espessura (e).....	34
3.3.1.3 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)	34
3.3.1.4 Solubilidade em água (SOL)	35
3.3.1.5 Propriedades mecânicas.....	36
3.3.1.6 Permeabilidade ao oxigênio (PO ₂)	37
3.3.1.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	38
3.3.1.8 Análise dinâmico-mecânica (DMA)	38
3.3.1.9 Determinação da efetividade antimicrobiana do filme pelo método de difusão em halo	39
3.3.1.9.1 Preparação do inóculo	39
3.3.1.9.2 Teste de difusão em halo	39
3.4 Produção de pão de forma.....	40
3.4.1 Método de análise microbiológica para isolamento de fungos.....	40
3.4.1.1 Análise microbiológica	41
3.4.1.1.1 Identificação das espécies fúngicas	41
3.5 Aplicação do biofilme no acondicionamento de pão de forma	41
3.5.1 Análises dos pães de forma embalados.....	43
3.5.1.1 Perda de peso.....	43
3.5.1.2 Determinação Instrumental da textura.....	43
3.5.1.3 Determinação do conteúdo de umidade.....	45
3.5.1.4 Determinação de atividade de água.....	45
3.5.1.5 Análise microbiológica	45
3.5.1.6 Extração e quantificação de sorbato de potássio	45
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 FILMES SIMPLES À BASE DE GELATINA PLASTIFICADO COM GLICEROL.....	47

4.1.1	Caracterização dos filmes.....	47
4.1.1.1	Aspecto visual.....	47
4.1.1.2	Espessura.....	47
4.1.1.3	Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	48
4.1.1.4	Solubilidade em água (SOL).....	50
4.1.1.5	Propriedades mecânicas.....	50
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES À BASE DE GLÚTEN E GLICEROL.....	53
4.2.1	Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	57
4.2.2	Solubilidade em água (SOL).....	63
4.2.3	Propriedades mecânicas.....	69
4.2.3.1	Resistência à tração (RT).....	69
4.2.3.2	Elongação.....	75
4.2.4	Otimização das características físicas.....	81
4.3	FILMES SIMPLES À BASE DE AMIDO PLASTIFICADOS COM GLICEROL.....	83
4.4	Filmes compostos.....	87
4.4.1	Caracterização de filme composto de glúten e gelatina, plastificados com glicerol.....	87
4.4.1.1	Aspecto visual.....	87
4.4.1.2	Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água.....	87
4.4.1.3	Propriedades Mecânicas.....	89
4.4.2	Filmes compostos à base de amido e gelatina.....	90
4.4.2.1	Caracterização dos filmes compostos de amido de mandioca nativo e modificado e gelatina, plastificados com glicerol.....	91
4.4.2.1.1	Aspecto visual.....	91
4.4.2.1.2	Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água.....	91
4.4.2.1.3	Propriedades mecânicas.....	94
4.4.2.2	Caracterização dos filmes composto de amido de milho ceroso nativo e modificado e gelatina, plastificados com glicerol.....	97
4.4.2.2.1	Aspecto visual.....	97
4.4.2.2.2	Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água.....	97
4.4.2.2.3	Propriedades mecânicas.....	100
4.4.3	Filmes compostos à base de glúten e amido, plastificados com glicerol.....	102

4.4.4 Caracterização dos filmes compostos de amido, gelatina e glúten, plastificados com glicerol	105
4.4.4.1 Aspecto visual.....	105
4.4.4.2 Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água	105
4.4.4.3 Propriedades mecânicas.....	107
4.5 FILMES COMPOSTOS SELECIONADOS.....	109
4.5.1 Permeabilidade ao vapor de água, solubilidade em água, resistência a tração e porcentagem de alongação.....	109
4.6 Caracterização dos filmes ativos incorporados de sorbato de potássio.....	111
4.6.1 Aspecto visual.....	111
4.6.2 Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água	113
4.6.3 Propriedades mecânicas.....	116
4.6.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	119
4.6.6 Análise dinâmico mecânica.....	131
4.6.7 Ensaio de difusão em halo.....	146
4.6.7.1 Isolamento e identificação das espécies fúngicas	146
4.6.7.2 Determinação da efetividade antimicrobiana dos filmes compostos contendo sorbato de potássio	147
4.7 APLICAÇÃO DE BIOFILMES ATIVOS EM FATIAS DE PÃO-DE-FORMA.....	169
4.7.1 Perda de peso	170
4.7.2 Textura dos pães	171
4.7.3 Conteúdo de Umidade	172
4.7.4 Atividade de água	174
4.7.5 Análise microbiológica	175
4.8.6 Extração e quantificação de sorbato de potássio	180
5.0 CONCLUSÕES.....	183
6.0 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	187
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	189

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Desenho esquemático e foto, respectivamente, de: (A) cobertura (ASSIS e LEONI, 2003) e (B) biofilme (SIQUEIRA, 2004).....	5
Figura 2. 2. Desenho esquemático da formação de filmes de glúten (VICENTINI, 2003).	24
Figura 2. 3. Esquema de formação do filme de amido (VICENTINI, 2003).....	29
Figura 3.1. Foto das fatias de pão de forma intercaladas com os biofilmes ativos (SOARES et al, 2002).....	43
Figura 4.1. Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da permeabilidade ao vapor de água em função da concentração de glúten e etanol.	61
Figura 4.2. Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da permeabilidade ao vapor de água em função da concentração de glúten e pH.	61
Figura 4.3. Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da permeabilidade ao vapor de água em função da concentração de etanol e pH.	61
Figura 4.4. Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da solubilidade em água em função da concentração de glúten e etanol.	67
Figura 4.5. Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da solubilidade em água em função da concentração de glúten e pH.....	67
Figura 4.6. Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da solubilidade em água em função da concentração de etanol e pH.....	67
Figura 4.7 Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da resistência à tração em função da concentração de glúten e etanol.	73
Figura 4.8. Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da resistência à tração em função da concentração de glúten e pH.	73
Figura 4.9. Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da resistência à tração em função da concentração de etanol e pH.	73

Figura 4.10 Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da porcentagem de alongação em função da concentração de glúten e etanol.	79
Figura 4.11. Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da porcentagem de alongação em função da concentração de glúten e pH.	79
Figura 4.12. Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da porcentagem de alongação em função da concentração de etanol e pH.	79
Figura 4.13. Rachaduras no filme de amido após o processo de secagem.....	85
Figura 4.14. Filmes compostos de amido e glúten após processo de secagem.....	103
Figura 4.15. Borda dos filmes compostos de amido e glúten após o processo de secagem.	103
Figura 4.16. Aspecto visual do filme de AMM/GLU/GEL (1:1:1) adicionado de 4% de sorbato de potássio.	111
Figura 4.17. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para os filmes compostos de GLU/GEL (1:4): (A) Controle-superfície (0% de sorbato); (B) Controle-seção transversal (0% de sorbato); (C) adicionados com 2% sorbato de potássio-superfície; (D) adicionados com 2% sorbato de potássio secção transversal; (E) adicionados com 4% sorbato de potássio superfície; (F) adicionados com 4% sorbato de potássio secção transversal. (Onde: e= estria de plastificante; f = fita de carbono e m=mancha de sorbato de potássio).....	121
Figura 4.18. Micrografias obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura para os filmes compostos de AMM/GEL (1:4): (A) controle-superfície (0% de sorbato); (B) controle-seção transversal (0% de sorbato); (C) adicionados com 2% sorbato de potássio-superfície; (D) adicionados com 2% sorbato de potássio-seção transversal; (E) adicionados com 4% sorbato de potássio-superfície; (F) adicionados com 4% sorbato de potássio-seção transversal. (Onde: e= estria de plastificante; f = fita de carbono)	125
Figura 4.19. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para os filmes compostos de AMM/GLU/GEL (1:4): (A) controle-superfície (0% de sorbato); (B) controle-seção transversal (0% de sorbato); (C) adicionados com 2% sorbato de potássio-superfície; (D) adicionados com 2% sorbato de potássio-seção transversal;	

(E) adicionados com 4% sorbato de potássio-superfície; (F) adicionados com 4% sorbato de potássio-seção transversal. (Onde: e= estria de plastificante; f = fita de carbono). . 129

Figura 4.20. Termogramas de análise dinâmico mecânica do biofilme composto de glúten e gelatina 1:4..... 135

Figura 4.21. Termogramas de análise dinâmico mecânica do biofilme composto de 2% de amido de mandioca modificado e gelatina 1:4. 135

Figura 4.22. Termogramas de DMA dos biofilmes compostos de 2% de amido de mandioca modificado/gelatina e glúten 1:1:1. 137

Figura 4.23. Termogramas de análise dinâmico mecânica do biofilme composto de glúten e gelatina 1:4 com 2% de sorbato de potássio..... 141

Figura 4.24. Termogramas de análise dinâmico mecânica do biofilme composto de 2% de amido de mandioca modificado e gelatina 1:4 com 2% de sorbato de potássio..... 141

Figura 4.25. Fungos isolados para o teste de difusão do halo. (A) *Eurotium chevalieri*; (B) *Eurotium amstelodami*; (C) *Wallemia sepii*, (D) *Cladosporium sp* e (E) *Penicillium raistrickii*..... 147

Figura 4.26. Avaliação da sensibilidade microbiana aos diferentes filmes ativos em presença de *Eurotium chevalieri*, pela técnica da difusão em ágar..... 151

Figura 4.27. Avaliação da sensibilidade microbiana ante os diferentes filmes ativos em presença de *Eurotium amstelodami*, pela técnica da difusão em ágar..... 155

Figura 4.28. Avaliação da sensibilidade microbiana frente aos diferentes filmes ativos em presença de *Wallemia sepii* pela técnica da difusão em ágar. 159

Figura 4.29. Avaliação da sensibilidade microbiana ante os diferentes filmes ativos em presença de *Penicillium raistrickii* pela técnica da difusão em ágar. 163

Figura 4.30. Avaliação da sensibilidade microbiana ante os diferentes filmes ativos em presença de *Cladosporium sp*. pela técnica da difusão em ágar. 167

Figura 4.31. Aspecto das fatias de pães de forma acondicionados, durante a vida de prateleira..... 177

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1. Permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes de gelatina e glicerol (25°C).....	49
Tabela 4.2. Solubilidade em água (SOL) dos filmes de gelatina e glicerol.	50
Tabela 4.3. Propriedades mecânicas dos filmes de gelatina e glicerol (25°C).	51
Tabela 4.4. Níveis das variáveis independentes do planejamento fatorial completo 2 ³ usado para filmes de glúten plastificados com glicerol.....	53
Tabela 4.5. Alíquotas utilizadas para cada formulação dos biofilmes de glúten e glicerol.	54
Tabela 4.6. Delineamento experimental para a obtenção da elaboração de filmes à base de glúten plastificados com glicerol.....	56
Tabela 4.7. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre a permeabilidade ao vapor de água dos filmes de glúten plastificados com glicerol.	57
Tabela 4.8. Coeficiente de regressão do modelo quadrático multivariável para a permeabilidade ao vapor de água em filmes de glúten e glicerol.	59
Tabela 4.9. ANOVA do ajuste do modelo obtido para a permeabilidade ao vapor de água dos filmes de glúten plastificados com glicerol.....	60
Tabela 4.10. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre a solubilidade em água dos filmes de glúten plastificados com glicerol.....	63
Tabela 4.11. Coeficiente de regressão do modelo quadrático multivariável para a solubilidade em água.....	64
Tabela 4.12. ANOVA do ajuste do modelo obtido para a solubilidade em água dos filmes de glúten plastificados com glicerol.....	65
Tabela 4.13. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre a resistência à tração dos filmes de glúten plastificados com glicerol.....	69
Tabela 4.14. Coeficiente de regressão do modelo quadrático multivariável para RT.	71
Tabela 4.15. ANOVA do ajuste do modelo obtido para resistência à tração dos filmes de glúten plastificados com glicerol.	72

Tabela 4.16. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre a porcentagem de alongação dos filmes de glúten plastificados com glicerol.	75
Tabela 4.17. Coeficiente de regressão do modelo quadrático multivariável para porcentagem de alongação.....	76
Tabela 4.18. ANOVA do ajuste do modelo obtido para a porcentagem de alongação dos filmes de glúten plastificados com glicerol.	77
Tabela 4.19. Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água dos filmes de compostos glúten de trigo e gelatina, plastificados com glicerol (25°C).	88
Tabela 4.20. Propriedades mecânicas dos filmes compostos glúten de trigo e gelatina, plastificados com glicerol (25°C).	89
Tabela 4.21. Permeabilidade ao vapor de água e a solubilidade em água dos filmes de compostos de amido de mandioca nativo e modificado e gelatina plastificados com glicerol (25°C).	92
Tabela 4.22. Propriedades mecânicas dos filmes de compostos de amido de mandioca nativo e modificada e gelatina, plastificados com glicerol (25°C)	94
Tabela 4.23. Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água dos filmes de compostos de amido de milho ceroso nativo ou modificado e gelatina plastificados com glicerol (25°C).....	98
Tabela 4.24. Propriedades mecânicas dos filmes compostos de amido de milho ceroso nativo ou modificado e gelatina, plastificados com glicerol (25°C)	100
Tabela 4.25. Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água dos diferentes tipos de filmes compostos à base de amido, gelatina e glúten (25°C).....	106
Tabela 4.26. Propriedades mecânicas dos filmes compostos à base de amido (milho ceroso, milho ceroso modificado, mandioca e mandioca modificado), gelatina e glúten, plastificados com glicerol (25°C).	108
Tabela 4.27. Permeabilidade ao vapor de água, solubilidade em água e propriedades mecânicas de filmes simples e compostos selecionados.....	110
Tabela 4.28. Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água dos filmes compostos ativos incorporados de sorbato de potássio (25°C).	114

Tabela 4.29. Resistência à tração e porcentagem de alongação dos filmes compostos ativos incorporados de sorbato de potássio (25°C).....	116
Tabela 4.30. Permeabilidade ao oxigênio dos filmes compostos sem e com sorbato de potássio.	118
Tabela 4.31. Temperatura de transição vítrea média e umidade dos biofilmes compostos.	132
Tabela 4.32. Temperatura média de transição vítrea e umidade dos biofilmes compostos ativos.	140
Tabela 4.33 . Concentração da suspensão de esporos utilizada em ensaio de difusão em halo.....	149
Tabela 4.34. Perfil microbiológico da eficiência dos filmes ativos pelo teste de difusão em placa para <i>Eurotium chevalieri</i>	149
Tabela 4.35. Perfil microbiológico da eficiência dos filmes ativos pelo teste de difusão em placa para <i>Eurotium amstelodami</i>	153
Tabela 4.36. Perfil microbiológico da eficiência dos filmes ativos pelo teste de difusão em placa para <i>Wallemia sebii</i>	157
Tabela 4.37. Perfil microbiológico da eficiência dos filmes ativos pelo teste de difusão em placa para <i>Penicillium raistrickii</i>	161
Tabela 4.38. Perfil microbiológico da eficiência dos filmes ativos pelo teste de difusão em placa para <i>Cladosporium sp.</i>	165
Tabela 4.39. Perda de peso de fatias de pão-de-forma acondicionadas, durante o armazenamento.....	170
Tabela 4.40. Firmeza das fatias de pães-de-forma acondicionadas, durante o armazenamento.....	171
Tabela 4.41. Conteúdo de umidade das fatias de pães-de-forma acondicionadas, durante o armazenamento.....	172
Tabela 4.42. Valores de atividade de água das fatias de pães-de-forma acondicionadas, durante o armazenamento.....	174

Tabela 4.43. Contagem total de bolores e leveduras em fatias de pães-de-forma acondicionadas, durante o armazenamento.	179
Tabela 4. 44. Extração e quantificação de sorbato de potássio em 45 g de pão de forma, durante o armazenamento.	181

NOMENCLATURA

AM - Amido de mandioca
AMC - Amido de milho ceroso
AMCM - Amido de milho ceroso modificado
AMM - Amido de mandioca modificado
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM – American Society for Testing and Materials
 a_w – Atividade de água
DMA - Análise mecânico dinâmica
ELO - Elongação
GEL - Gelatina
GLU - Glúten
MEV - Microscopia eletrônica de varredura
p/v – Peso por volume
Pa – Pascal
pH - Potencial hidrogeniônico
PO₂ - Permeabilidade ao oxigênio
PVA - Permeabilidade ao vapor de água
RT - Resistência à tração
SOL - Solubilidade em água
SORB - Sorbato de potássio
Tg – Temperatura de transição vítrea
UFC – Unidade formadora de colônias
UR – Umidade relativa

RESUMO

Pesquisas sobre biofilmes à base de polímeros surgiram devido ao impacto ambiental aliado à necessidade de reduzir os resíduos sólidos. Atualmente, vários estudos estão voltados ao desenvolvimento de tecnologia que controle o crescimento indesejável de microorganismos, através de embalagens ativas. O objetivo deste trabalho foi obter as melhores formulações para o desenvolvimento de biofilmes ativos e avaliar sua aplicação no acondicionamento de pães de forma. Filmes simples e compostos à base de gelatina, glúten e amido (mandioca, mandioca modificado, milho ceroso e milho ceroso modificado) foram desenvolvidos e caracterizados quanto à permeabilidade ao vapor de água (PVA), permeabilidade ao oxigênio (PO_2), solubilidade em água (SOL) e propriedades mecânicas (resistência à tração - RT e porcentagem de alongação - ELO), variando a concentração da macromolécula e do plastificante (glicerol). Os filmes contendo 10 g de gelatina com 5% de glicerol (em relação à massa seca da proteína) e o filme com 5 g de glúten, 32,5 mL de etanol/100 mL de solução, pH 5 e 20% de glicerol (em relação à massa seca da proteína) foram selecionados para a elaboração dos filmes compostos. Filmes compostos de glúten/gelatina (GLU/GEL), amido de mandioca/gelatina (AM/GEL), amido de mandioca modificado/gelatina (AMM/GEL), amido de milho ceroso/gelatina (AMC/GEL), amido de milho ceroso modificado/gelatina (AMCM/GEL) em diversas proporções 1:1, 1:4 e 4:1 e amido/gelatina/glúten (AM/GLU/GEL; AMM/GLU/GEL, AMC/GLU/GEL e AMCM/GEL) na proporção 1:1:1, também foram confeccionados e caracterizados. Os filmes compostos apresentaram menor PVA e maior RT que os filmes simples de gelatina. Os filmes compostos AMM/GEL, GLU/GEL e AMM/GLU/GEL, nas proporções 4:1; 4:1 e 1:1:1, respectivamente, foram utilizados no desenvolvimento de filmes ativos. Os filmes compostos foram adicionados de sorbato de potássio (SP) na concentração de 2 e 4% (p/v). A adição de SP provocou aumento na PVA, na SOL e na ELO e redução na RT, em relação aos filmes sem sorbato. A superfície dos filmes compostos mostrou-se lisa e homogênea, com exceção do filme AMM/GLU/GEL com 4% de SP. Para os testes de difusão em halo, foram isolados 5 fungos: (i) *Eurotium chevalieri*; (ii) *Eurotium amstelodami*; (iii) *Wallemia sebi*; (iv) *Penicillium raistrickii* e (v) *Cladosporium sp.* Os filmes que apresentaram maior eficiência na redução do crescimento dos fungos e melhores propriedades de barreira e mecânicas foram: (i) AMM/GEL e (ii) GLU/GEL, ambos com 2% de SP. Os filmes ativos selecionados no teste de difusão em halo apresentaram duas tangentes de perda ($\tan \delta$), indicando a existência de duas T_g . Os filmes de GLU/GEL, sem e com 2% SP, foram utilizados no acondicionamento de pão de forma, sendo que as fatias de pães justapostas foram intercaladas com os filmes ativos e colocadas em sacos de polietileno de baixa densidade. O uso de filmes entre as fatias provocou aumento da firmeza, diminuição da umidade e da atividade de água. A análise microbiológica não indicou diferença significativa entre a estocagem com filmes ativos e o controle. No 7º dia, os pães continham a quantidade máxima de SP permitida no produto pela legislação brasileira.

Palavras chaves: gelatina, glúten, amido de mandioca modificado, sorbato de potássio, embalagem ativa.

ABSTRACT

In recent years the research on polymer-based biofilms has seen considerable increase due to concern over environmental impact and the need to reduce solid residue generation. There are several studies concerning the control of microbial activity in prepared food using active packaging. The objective of this work was to develop the best formulation of active biofilms and to evaluate their performance in sliced bread packaging. Simple and composite films were developed, based on gelatin, gluten and different types of starch (cassava, modified cassava, waxy maize and modified waxy maize starches). Films were characterized for their permeability to water vapor (WVP), permeability to oxygen (PO_2), solubility in water (SOL) and mechanical properties (tensile strength -TS and elongation -ELO), using different concentrations of the macromolecules and plasticizer (glycerol). Films containing 10g of gelatin and 5% of glycerol (based on protein dry mass) and films with 5g of gluten, 32.5 mL of ethanol/mL of solution, at pH of 5 and 20% glycerol (based on protein dry mass) were selected for the manufacture of composite films. Composite films of gluten/gelatin (GLU/GEL), cassava starch/gelatin (CS/GEL), modified cassava starch/gelatin (MCS/GEL), waxy maize starch/gelatin (WMS/GEL), modified waxy maize starch/gelatin (MWMS/GEL), at 1:1, 1:4 and 4:1 ratios and starch/gelatin/gluten (S/GLU/GEL) at 1:1:1 ratio were manufactured and characterized. Composite films presented lower WVP and larger RT than simple gelatin film. Composite films based on MCS/GEL, GLU/GEL and MCS/GLU/GEL at 4:1, 4:1 and 1:1:1 ratios, respectively, were used for the development of active films using potassium sorbate (PS) at 2 and 4%, in volume concentrations. Addition of PS promoted increase in WVP, SOL and ELO as well as a decrease in TS, when compared to films with no added anti-microbial agent. Surface of the composite films were smooth and homogeneous except for the MCS/GLU/GEL with 4% PS. Five microorganisms were selected, for the diffusion halo assay: (i) *Eurotium chevalieri*; (ii) *Eurotium amstelodami*; (iii) *Wallemia sebi*; (iv) *Penicillium raistrickii* e (v) *Cladosporium sp.* Films that presented the best efficiency on reduction of microbial growth as well as best permeability and mechanical properties were: (i) MCS/GEL and (ii) GLU/GEL, both with 2% of added PS. The active films selected for the diffusion halo assay presented two loss tangent ($\tan\delta$) values, an indication of two Tgs. GLU/GEL films, with no sorbate and with 2% sorbate, were used in sliced bread packaging. Each slice was placed between two sheets of active film and the whole bread was stored inside a low density polyethylene bag. The active films promoted an increase in firmness and a decrease in both moisture content and water activity of the slices. The microbial analysis, storage with active films showed no significant difference from the control sample. By the seventh day of storage the accumulated amount of, potassium sorbate liberated by the film achieved the limit set by Brazilian legislation.

Key-words: gelatin, gluten, modified cassava starch, potassium sorbate, active package.

1.0 Introdução

Nos últimos anos, em virtude do impacto ambiental, tem crescido o interesse em substituir os polímeros sintéticos, que hoje são muito utilizados como material de embalagem, por materiais biodegradáveis e provenientes de fontes renováveis. O consumidor tem buscado, cada vez mais, alimentos com maior qualidade e com vida de prateleira prolongada, sem desconsiderar os danos do produto ao meio ambiente.

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

A utilização de embalagens rígidas, como latas metálicas ou recipientes de vidro, é muito disseminada, pois possuem excelentes propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água e gases, garantindo uma proteção estrutural (mecânica). É comum, também, a utilização de filmes flexíveis, geralmente sintéticos (plásticos). Apesar de garantirem uma proteção desejada para diversos tipos de alimentos, essas embalagens acarretam sérios problemas ambientais (SOBRAL et al., 1997).

O Brasil produz cerca de 240 mil toneladas de lixo por dia, valor inferior ao produzido nos Estados Unidos (607.000 t/dia), mas bem superior ao de países como a Alemanha (85.000 t/dia) e a Suécia (10.400 t/dia). Desse total, o destino da maior parte é o lixão a céu aberto. Para o Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), são poucas as prefeituras do país que possuem equipes e políticas públicas específicas para o lixo. Quando não tratado, constitui-se em sério problema sanitário. As possíveis soluções para a questão são: a criação de aterros sanitários em locais apropriados, o programa de coleta seletiva de lixo e

reciclagem, entre outras. A produção de materiais biodegradáveis oferece uma solução mais viável para materiais plásticos (VILPOUX; AVEROUS, 2001).

Estudos visando a solução desses problemas vêm sendo realizados desde a década de 1970, quando surgiram as primeiras pesquisas, misturando-se substâncias biodegradáveis (como o amido) com polímeros sintéticos, tendo como finalidade a elaboração de embalagens degradáveis. Apesar delas terem sido declaradas “biodegradáveis”, o teor de amido era pequeno e este era o único componente capaz de ser consumido pelos microorganismos. Na realidade, esses materiais eram desintegráveis e não resolviam o problema, uma vez que os fragmentos dos polímeros sintéticos continuavam a acumular-se no ambiente (DAVIS; SONG, 2006 citado por SAKANAKA, 2007). Assim, a saída era buscar outras fontes de polímeros que fossem 100% assimiláveis por microorganismos, para serem considerados efetivamente biodegradáveis. Uma das alternativas tem sido o desenvolvimento de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis, que servem como embalagem, ou diretamente sobre os produtos, como cobertura ou recobrimento (KESTER; FENNEMA, 1986).

Em vários países, é possível encontrar produtos com essa tecnologia. Todavia, no Brasil a técnica é inovadora e está começando a ser utilizada por algumas empresas do setor. Em 2004, a APOTEK, tornou-se a primeira empresa brasileira na fabricação desse tipo de embalagem, servindo o setor farmacêutico. Segundo a empresa, o plástico comum é formado por cadeias moleculares compostas por átomos de carbono e hidrogênio ligados fortemente entre si, o que torna o material difícil de ser digerido pelos microorganismos presentes no ambiente. Durante o processo de fabricação dos plásticos biodegradáveis, é inserido um aditivo (PQDH) que não modifica as propriedades do material, entretanto, faz com que fatores como luz, umidade, temperaturas elevadas e *stress* do material fragilizem as ligações entre os átomos. Com as ligações entre os átomos enfraquecidas, as moléculas do plástico começam a transformar-se em fragmentos mais facilmente digeríveis por microorganismos. Após as ligações se

quebrarem, átomos de carbono e hidrogênio são liberados no ambiente. Estes, ao entrarem em contato com o oxigênio, formam novas moléculas de água e dióxido de carbono, ou seja, o plástico biodegradável desaparece completamente sem deixar resíduos nocivos (APOTEK, 2006).

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

Atualmente, muitas pesquisas começam a focar o desenvolvimento de tecnologias que controlam o crescimento indesejável de microorganismos, com garantia de segurança por incorporação de substâncias inibitórias dentro do material de embalagem, denominadas embalagens ativas. Esse conceito de embalagem é inovador. É definida como um tipo que atua nas condições de armazenamento estendendo a vida de prateleira e melhorando a segurança ou propriedades sensoriais, ao mesmo tempo em que mantém a qualidade do produto (SOARES et al., 2002). A adição de substâncias antimicrobianas, visto que causa a redução da taxa de crescimento de microorganismos, permite estender a fase “lag” do microorganismo alvo, prolongando a vida de prateleira do produto.

Com o aumento do mercado por produtos minimamente processados, de conveniência, que mantenham as características sensoriais mais próximas dos *in natura*, torna-se necessário o desenvolvimento de novas embalagens com funções especiais. Assim, nos últimos anos, vêm crescendo os estudos sobre embalagens ativas, com o objetivo de estender a vida de prateleira e melhorar a segurança e as características sensoriais, ao mesmo tempo em que mantém a qualidade do produto por meio de uma interação desejável entre a embalagem e o alimento (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

Os filmes comestíveis têm recebido interesse na indústria de alimentos em razão das vantagens que os diferenciam das embalagens não-comestíveis. A biodegradabilidade inerente ao filme é uma de suas vantagens. Em razão de seus aspectos ambientais, os filmes biodegradáveis apresentam-se como alternativas para sistemas de embalagens, sem os prejuízos ambientais dos materiais sintéticos não degradantes. Futuramente, substituirão total ou parcialmente grande parte das embalagens sintéticas (KESTER; FENNEMA, 1986).

O objetivo deste trabalho foi determinar a melhor formulação para a obtenção de biofilmes à base de gelatina, glúten e amido (milho ceroso, milho ceroso modificado, mandioca ou mandioca modificado) isoladamente e em combinação, em proporções diversas. À formulação selecionada foi adicionada o agente antimicrobiano (sorbato de potássio) na concentração de 2 e 4% (p/v). O melhor biofilme ativo desenvolvido foi aplicado no acondicionamento de pães de forma.

2.0 Revisão Bibliográfica

2.1 Filmes e coberturas comestíveis e/ou biodegradáveis

Coberturas são finas camadas de material aplicadas e formadas diretamente na superfície do produto (Figura 2.1A), enquanto que filmes são estruturas fabricadas separadamente (Figura 2.1B) e então utilizadas no produto (KROCHTA; DE MULDER-JOHNSTON, 1997). Eles podem ser classificados em comestíveis e/ou biodegradáveis, dependendo dos constituintes utilizados para sua produção e, também, da quantidade das substâncias empregadas (SHIN, 1996). A utilização destes tipos de filmes pode ser justificada com base nas suas possibilidades funcionais (KESTER; FENNEMA, 1986): controlar a migração de vapor d'água, a permeabilidade ao oxigênio e ao dióxido de carbono e a migração lipídica em um sistema alimentício. Além disso, podem ser introduzidos aditivos ao filme, tais como antioxidantes, aromas e agentes antimicrobianos, melhorando com isso a integridade do produto.

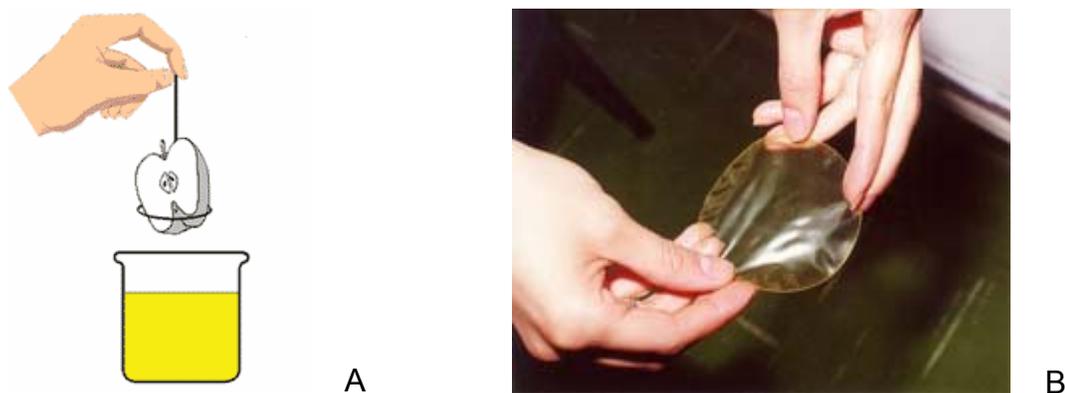


Figura 2.1. Desenho esquemático e foto, respectivamente, de: (A) cobertura (ASSIS e LEONI, 2003) e (B) biofilme (SIQUEIRA, 2004).

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

meio da aplicação de gordura animal (LABUZA; CONTRERAS, 1981). Atualmente, filmes e coberturas são usados numa variedade de aplicações, como: revestimento para lingüiça, coberturas de chocolate para nozes e frutas, e coberturas de ceras para frutas e vegetais. Entretanto, as informações técnicas envolvidas estão longe das adequadas, deixando os tecnologistas de alimentos com a incumbência de desenvolver filmes e revestimentos específicos para cada tipo de alimento (DONHOWE; FENNEMA, 1994).

Coberturas e filmes comestíveis não pretendem, e nem sempre têm a capacidade para, substituir uma embalagem sintética não comestível com o intuito de prolongar a estocagem dos alimentos. Sua utilização está relacionada à capacidade de agir como um adjunto para promover maior qualidade, estendendo a vida de prateleira, e possibilitar a economia com materiais de embalagem (KESTER; FENNEMA, 1986).

Visto que atuam tanto como embalagens quanto como componentes do alimento, as coberturas e filmes devem cumprir alguns requisitos específicos para seu uso, como: boa qualidade sensorial; propriedades de barreiras e mecânicas eficientes; estabilidade bioquímica, físico-química e microbiológica; inocuidade, não poluente; e de processamento simples e de baixo custo (DEBEAUFORT; QUEZADA-GALLO, VOILLEY, 1995).

A elaboração de biofilmes envolve a utilização de diversos componentes, cada qual com sua finalidade específica. Essas formulações são constituídas de, pelo menos, um agente formador de filme (macromoléculas), solvente (água, etanol, água/etanol etc.), plastificante (glicerol, sorbitol, etc.), agente ajustador do pH (ácido acético, NH_4OH , etc) e aditivos (aromas, vitaminas, antimicrobianos, etc).

Para a formação de filmes e coberturas, é necessária a utilização de, no mínimo, um constituinte capaz de formar uma matriz contínua e de coesão adequada, sendo esse uma macromolécula (GUILBERT; CUQ; GONTARD, 1997). Os principais constituintes utilizados são: proteínas (caseína, proteínas do soro do

leite, proteína do milho-zeína, proteína do trigo-glúten, colágeno e gelatina), polissacarídeos e seus derivados (derivados da celulose, quitosana, amido, alginatos, pectinas e gomas) e lipídios (monoglicerídeos, ácidos graxos, ceras naturais etc.) (GUILBERT, 1986).

Os filmes elaborados a partir de polissacarídeos ou proteínas possuem excelentes propriedades mecânicas e ópticas, porém são sensíveis à umidade e apresentam alto coeficiente de permeabilidade ao vapor d'água. Ao contrário, os filmes compostos de lipídios apresentam boas propriedades de barreiras ao vapor d'água, mas são opacos e pouco flexíveis (GUILBERT, 1986; GALLO et al., 2000).

Os solventes utilizados na elaboração de filmes comestíveis, normalmente, são: a água, o etanol ou a combinação de ambos (KESTER; FENNEMA, 1986). A macromolécula ao dissolver-se forma uma dispersão coloidal, isto é, um sistema formado por moléculas dispersas que têm dimensões muito maiores que as moléculas do solvente (XIONG, 1994). Portanto, a solubilização da macromolécula está relacionada à sua capacidade de interagir com o solvente utilizado, sendo este um aspecto determinante na formação de filmes, visto que a total solubilidade é necessária para o processo de sua formação.

Os plastificantes são substâncias que, quando adicionados a outro material, provocam mudanças nas suas propriedades físicas, químicas e mecânicas (DE McHUGH; KROCHTA, 1994a). Além disso, em sua maioria, apresentam caráter hidrofílico e, por serem normalmente moléculas pequenas, são facilmente acoplados entre as cadeias poliméricas em virtude de sua habilidade de reduzir a formação de pontes de hidrogênio entre as cadeias, causando um aumento do volume livre ou da mobilidade molecular do polímero (BODMEIER; PAERATAKUL, 1997). A incorporação de plastificante em biopolímeros modifica a organização molecular tridimensional da rede, diminui as forças de atração intermoleculares e aumenta o volume livre do sistema, melhorando a flexibilidade e extensibilidade dos filmes (CUQ et al., 1996a; SOTHORNVIT; KROCHTA, 2000).

Os efeitos do tipo de plastificante, bem como a escolha de sua concentração é complexa, já que, com o aumento da mobilidade da cadeia, os coeficientes de difusão também aumentam, resultando numa maior permeabilidade aos gases e ao vapor de água (FAIRLEY et al., 1996). Entre os plastificantes utilizados em biofilmes, podem ser encontrados mono-, di- e oligossarídeos (glicose e sacarose), polióis (glicerol, sorbitol, derivados da glicerina e gliceróis), lipídios (ácidos graxos saturados, monoglicerídeos e derivados de éster, fosfolipídios e surfactantes) e triacetina (GUILBERT, 1986; FAKHOURI; BATISTA; GROSSO, 2003; BERTAN et al., 2003).

Vários estudos confirmam o efeito do pH na solubilidade de diferentes macromoléculas nos processos de formação de filme, sendo esse um aspecto fundamental em suas propriedades. Por vezes, pode tornar-se necessário um ajuste do pH da solução para que assim uma matriz homogênea possa vir a ser constituída, ou seja, uma maior solubilidade da macromolécula seja atingida (ARVANITTOYANNIS; NAKAYAMA; AIBA, 1997). O pH da solução afeta a natureza e a distribuição de cargas das proteínas, uma vez que os grupos polares são, na maioria dos casos, encontrados na região externa das proteínas, enquanto os apolares geralmente na região interna (WERTZ; SCHERAGA, 1978). Em geral, o ponto isoelétrico (pI) da proteína — quando uma molécula apresenta igual número de cargas positivas e negativas — constitui-se no pH de menor solubilidade (SGARBIERI, 1996). Nesse ponto, a interação proteína-proteína aumenta em razão de as forças eletrostáticas das moléculas serem mínimas, provocando menor interação da água com as moléculas de proteína. Dessa forma, propicia uma condição favorável para que as moléculas se aproximem e se agreguem podendo ocorrer a precipitação (HALL, 1996). Em valores de pH acima ou abaixo do pI, as moléculas de proteínas possuem cargas positivas ou negativas em excesso, que interagem com as moléculas de água contribuindo para sua solubilização (SGARBIERI, 1996).

O método de fabricação de filmes de materiais baseados em biopolímeros pode ser de dois tipos: úmido ou seco. O processo úmido requer a dispersão da

macromolécula produzindo uma solução formadora de filme e tem sido extensivamente estudada e aplicada para produzir filmes comestíveis, biodegradáveis e coberturas (KESTER; FENNEMA, 1986). O processo de produção dos filmes a partir de solução formadora de filme envolve uma primeira etapa de solubilização da macromolécula (na água, no etanol, em solução de ácido acético e entre outros), em cujo solvente podem ser incorporados diversos aditivos (plastificantes, agentes reticulantes, etc.); na segunda etapa, essa solução é espalhada sobre um suporte e, usualmente, submetida à secagem (CUQ et al., 1995). O processo seco, por sua vez, baseia-se nas propriedades termoplásticas de alguns biopolímeros (principalmente amido e proteínas) em condições de baixo conteúdo de umidade e tem sido aplicada com sucesso por usar tecnologia comum de processo de fusão, como a extrusão (FRITZ et al., 1994).

As características finais dos filmes comestíveis e/ou biodegradáveis são resultantes de inúmeros parâmetros, tais como: natureza química e concentração da macromolécula e demais constituintes (solvente, plastificante, etc.); pH; condições de desnaturação (no caso de proteínas); tipo de suporte utilizado; condições de secagem e condições ambientais (temperatura e umidade) para aplicação (CARVALHO, 2002).

2.2 Características dos filmes

Na produção de biofilmes, diversas características, entre as quais se destacam a espessura, textura, sabor, aroma, cor e opacidade, são importantes para a escolha da aplicação e também aceitação do produto pelo consumidor.

2.2.1 Espessura

Segundo Gennadios et al. (1993), o controle da espessura dos filmes é importante para sua uniformidade, repetibilidade das medidas e validade das comparações entre as propriedades dos biofilmes. A espessura deve ser estabelecida levando-se em conta a utilização final do filme, que dependerá do

alimento a ser embalado (SARMENTO, 1999). Esse controle é difícil, sobretudo nos processos de produção do tipo *casting*. Quando se trabalha com alta concentração de proteína na solução formadora de filme, tal solução se torna muito viscosa, dificultando seu espalhamento e, conseqüentemente, o controle da espessura, além de possibilitar a formação de bolhas na solução, em razão da propriedade de formação de espuma presente nas proteínas. Quando se controla a espessura, seja fixando-se a gramatura ou a alíquota da solução no suporte, deve levar-se em consideração as características das formulações (SOBRAL, 1999).

Gennadios et al. (1996) desenvolveram biofilmes à base de ovoalbumina a partir de soluções formadoras de filme com concentração variável de plastificante, controlando o nível da solução no suporte. Os autores observaram que a espessura variou de 0,098 a 0,103 mm. Cuq et al. (1996b) observaram que a força na ruptura e a permeabilidade ao vapor de água aumentaram linearmente com a espessura entre 0,010 e 0,055 mm nos biofilmes de proteínas miofibrilares de sardinha do Atlântico.

2.2.2 Aspecto visual

De forma geral, está relacionada à 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 fissuras após o processo de secagem, nem partículas insolúveis ou poros abertos (CARVALHO, 1997).

2.2.3 Sabor e aroma

Uma vez que os filmes e/ou coberturas comestíveis estarão em contato com os alimentos, é desejável que apresentem características sensoriais neutras, de modo que não alterem as propriedades dos alimentos. Filmes à base de hidrocolóides possuem geralmente características sensoriais mais neutras que os formados de lipídios ou derivados, que podem apresentar sabor residual

(GONTARD; GUILBERT, 1996). Atualmente, existem estudos sobre filmes que interagem de maneira desejável com o alimento, melhorando suas propriedades sensoriais.

Pires et al. (2006) desenvolveram filmes de base celulósica, ao qual foi adicionado aroma de morango em diversas concentrações (25, 50 e 75%). Esses filmes, em suas diversas concentrações, foram colocados em contato com 1 litro de leite pasteurizado. Os autores realizaram análises físico-químicas (gordura, densidade, acidez titulável, pH, extrato seco total e desengordurado), microbiológicas (contagem de mesófilos aeróbicos totais, coliformes totais, coliformes termotolerantes e presença/ausência de *Listeria sp*) e análise sensorial, nos tempos 0, 1, 2, 3 dias de armazenamento. Não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras quanto às análises físico-químicas e microbiológicas em nenhum dos tempos avaliados. Na análise sensorial, as amostras aromatizadas não diferiram entre si ($p \geq 0,05$) para os atributos aroma e impressão global, sendo estas mais aceitas que a amostra controle.

Gouveia et al. (2006) desenvolveram filmes ativos à base de acetato de celulose incorporados com aroma de azeite, limão, *pizza* e *bacon* com o objetivo de melhorar as propriedades sensoriais da ricota e torná-la um produto de maior aceitação. Os autores avaliaram a aceitabilidade das amostras por 82 provadores após 12 horas (1/2 dia) e 264 horas (11 dias). Os resultados mostraram que, após 12 horas de armazenamento, 95,1% dos provadores consideraram existir diferença entre as amostras em relação à impressão global e 4,9% não discriminaram as amostras em relação à aceitação, considerando-as semelhantes. Na análise realizada após 264 horas, 97,6% diferiram as amostras entre si e apenas 2,4% consideraram-nas semelhantes, sendo as amostras mais aceitas aquelas aromatizadas com pizza e bacon, enquanto a ricota controle foi a menos aceita. Os autores concluíram que os filmes aromatizados são inovadores e tem grande potencial de aplicação na área de alimentos para criação de novos produtos.

2.2.4 Cor e opacidade

Os filmes devem apresentar opacidade e coloração atrativas e não devem sofrer alteração de cor com o tempo de armazenamento, a fim de que a aceitação do produto acondicionado não seja prejudicada. A transparência e a opacidade do polímero são conseqüências da morfologia ou estrutura química (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).

Akin e Hasirci (1995) observaram a mudança da coloração de amarelo palha para laranja vivo nos primeiros minutos de reação entre o glutaraldeído e a solução de gelatina. Butler et al. (1996) observaram que os filmes à base de quitosana apresentam uma coloração amarelada, que é acentuada à medida que a espessura aumenta. Cao, Fu e He (2007) desenvolveram filmes compostos de isolado protéico de soja e gelatina (respectivamente) nas proporções 10:0; 8:2; 6:4; 4:6; 2:8 e 0:10. Os autores observaram que os compostos desenvolvidos com maior proporção de isolado protéico de soja apresentaram-se mais opacos, em virtude da presença de partículas insolúveis.

2.2.5 Propriedades dos filmes

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

2.2.5.1 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A proteção do alimento contra alterações provocadas pelo meio ambiente, desde a sua obtenção até chegar ao consumidor, é uma das preocupações mais importantes na atualidade (MARTIN-POLO et al., 1992). A migração de vapor de água é um dos principais fatores de alteração da qualidade sensorial e da estabilidade da estocagem (KAMPER; FENNEMA, 1984; GONTARD et al., 1994;

CHEN, 1995). A cinética enzimática ou reações químicas, propriedades de textura e estabilidade microbiana e física de produtos alimentícios são fortemente influenciadas pelo conteúdo de umidade e podem mudar drasticamente a qualidade do alimento durante o processamento e estocagem. Assim, muitas vezes, é necessário limitar a migração de umidade com substâncias capazes de prevenir a transferência da molécula de água, com o intuito de maximizar a vida útil do produto (MARTIN-POLO et al., 1992; GONTARD et al., 1996).

A transferência de água em materiais poliméricos ocorre por difusão molecular. Esse processo envolve três etapas: (i) movimento do permeante para a superfície da estrutura do filme e sua absorção na matriz polimérica; (ii) difusão através de “espaços livres” formados pelo movimento da cadeia polimérica do filme ou na própria fabricação e (iii) dessorção a partir da superfície do filme e sua conseqüente dispersão no ar (KESTER; FENNEMA, 1986).

O processo de difusão em um sistema polímero/solvente depende do tamanho, natureza química, configuração da molécula penetrante e do movimento molecular da cadeia do polímero na matriz do filme (KESTER; FENNEMA, 1986). Em geral, moléculas lineares difundem mais rapidamente que as ramificadas ou cíclicas. Pequenas diferenças na forma causam mudanças importantes na permeabilidade (TORRES, 1994).

Diversos fatores podem afetar a permeabilidade ao vapor de água em biofilmes, incluindo-se a concentração de plastificante, a morfologia do biofilme, as características das moléculas permeantes, as interações entre cadeias poliméricas e o grau de reticulação (KESTER; FENNEMA, 1986).

Zactiti e Kieckbusch (2006) desenvolveram filmes à base de alginato, em que foram adicionadas quantidades diferentes de cálcio (2, 3, 4, 5 e 7%). Os autores observaram uma diminuição significativa na permeabilidade ao vapor de água à medida que aumentava a concentração de cálcio de 2% (11,93 gmm/m²diakPa) para 3% (6,89 gmm/m²diakPa). Os autores explicaram que os íons cálcio promovem uma reticulação na matriz, a mobilidade das cadeias de

alginate diminui, reduzindo dessa maneira a difusibilidade da água através do filme, levando a uma diminuição da permeabilidade ao vapor de água. Rhim (2004) estudou o efeito da reticulação de filmes de alginato por meio da imersão em soluções de cloreto de cálcio em diversas concentrações (1, 2, 3 e 5% g cálcio/mL de solução). Com exceção da primeira condição (1%), as demais causaram uma diminuição da permeabilidade ao vapor de água. Talja et al. (2007) estudaram o efeito da variação no teor de diferentes polióis (glicerol, xilitol e sorbitol) nas propriedades físicas e mecânicas de filmes de amido de mandioca. Os autores observaram que o aumento da concentração dos polióis causou aumento na permeabilidade ao vapor de água. Eles explicaram que o aumento da concentração de plastificante leva a uma elevação da permeabilidade ao vapor de água em virtude do aumento da difusão da água através do filme, ocasionado por sua maior hidrofiliçidade. Os mesmos autores também observaram que a elevação da umidade relativa (33, 54 e 76%) durante os testes, causou aumento na permeabilidade ao vapor de água.

Talja et al. (2008) estudaram o efeito da incorporação de várias misturas binárias (1:1) de polióis (glicerol, sorbitol e xilitol) na concentração de 20-50%, nas propriedades físicas e mecânicas de filmes à base de amido de batata (50-80% de sólidos), armazenado em ambientes com diferentes umidades relativas (33; 54 e 76%). Os autores observaram uma diminuição da resistência à tração e aumento na porcentagem de alongação com o aumento da concentração da misturas dos polióis nos filmes, sendo esse efeito intensificado com a elevação da umidade relativa.

2.2.5.2 Permeabilidade a gases (PO₂)

A transferência de oxigênio do meio ambiente para o alimento tem grande importância na qualidade deste e em sua vida de prateleira. O oxigênio é responsável por várias reações degradativas nos alimentos, modificando as características sensoriais e nutricionais (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2000), e pode influenciar de forma significativa a sua estabilidade durante o armazenamento. A

deterioração em razão da permeabilidade ao oxigênio ocorre em muitos produtos alimentícios, envolvendo a oxidação de lipídios, vitaminas, compostos de sabor e pigmentos (KESTER; FENNEMA, 1986).

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

Dole et al. (2004) estudaram as propriedades de transferência de gases em filmes à base de amido de batata. Os autores observaram que o aumento da umidade relativa (0 para 50%) causou aumento na permeabilidade ao oxigênio (0,04 para 5%) e ao gás carbônico (0,08 para 5,5%). Os autores justificaram esse comportamento em virtude do efeito plastificante da água, que aumentou o número de espaços livres e, conseqüentemente, propiciou aumento da difusão de gases. Sothornvit e Pitak (2007) estudaram a permeabilidade ao oxigênio e propriedades mecânicas de filmes de compostos de farinha de banana (4; 6 e 8%) e pectina (0 e 1%) plastificados com glicerol (30 e 50%). Os autores observaram que apesar de os filmes confeccionados com biopolímeros hidrofílicos apresentarem boas barreiras ao oxigênio, o aumento na concentração de farinha de banana provocou aumento na permeabilidade ao oxigênio. Os autores explicaram que com o aumento do conteúdo de farinha de banana, há um aumento do conteúdo de pectina e amido nos filmes, o que teoricamente por apresentar um caráter hidrofílico, causaria diminuição na permeabilidade ao oxigênio, fato que não ocorreu. Esse fato pode ter ocorrido pela presença de açúcar na composição da farinha de banana, que funciona como plastificante e, provavelmente, influenciou nas propriedades finais dos filmes.

2.2.5.3 Propriedades mecânicas

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

Filmes comestíveis preparados à base de polissacarídeos e hidrocolóides são resistentes, enquanto que os filmes de lipídios se caracterizam por apresentar baixa resistência mecânica (KESTER; FENNEMA, 1986). As propriedades mecânicas estão diretamente relacionadas à natureza do material formador de filme utilizado e à coesão da estrutura da matriz polimérica, que está ligada à distribuição e concentração inter e intramoleculares na estrutura formadora de filme entre as cadeias (CUQ; GONTARD; GUILBERT, 1998).

Famá et al. (2005) desenvolveram filmes de amido de mandioca contendo sorbato de potássio, plastificados com glicerol. Os autores concluíram que as propriedades mecânicas desse tipo de filme foram afetadas pela adição do sorbato, que causou desestruturação da rede. Talja et al. (2007), em pesquisa com o mesmo tipo de filme, observaram que o aumento da concentração de plastificante (20-50%) e da umidade relativa (33, 54 e 76%) causou diminuição da resistência à tração. Zactiti e Kieckbusch (2006) desenvolveram filmes de alginato, que foram submetidos ao tratamento com cálcio utilizando diversas concentrações de íons na solução. A tensão na ruptura apresentou melhora significativa ao aumentar a concentração de cálcio, sendo menor com 2% do íon (85,67 MPa) e maior com 7% (160,26 MPa). A elevação da tensão na ruptura após o tratamento com cálcio pode ser explicada pelo desenvolvimento de *crosslinking* entre os grupos carboxílicos presentes no alginato e os íons cálcio. Os mesmo autores

observaram uma diminuição na porcentagem de alongação dos filmes tratados com cálcio.

2.2.5.4 Solubilidade em água

A solubilidade em água é uma propriedade importante para os filmes comestíveis no que se refere ao seu emprego, pois a maioria das aplicações requer insolubilidade nesse solvente para manter a integridade do produto (PEREZ-GAGO; KROCHTA, 2001). Porém, no caso de produtos desidratados que devem sofrer uma hidratação prévia ao consumo (arroz semi-prontos, sopas instantâneas, entre outros) a solubilidade em água é requerida (PEREZ-GAGO; KROCHTA, 2001).

A solubilidade dos filmes depende dos componentes de sua estrutura. Proteínas com alta massa molecular são geralmente insolúveis ou pouco solúveis em água. Em virtude disso, essas moléculas são interessantes, uma vez que podem formar filmes resistentes à água (CUQ et al., 1995). A solubilidade das proteínas depende muito do número e do arranjo de cargas na molécula, que dependerá da composição de aminoácidos (SGARBIERI, 1996).

Cuq et al. (1996b) estudaram a influência da umidade relativa e temperatura sobre as propriedades de barreira, mecânica e de cor dos biofilmes de proteína miofibrilar de sardinha plastificados com sacarose. Os autores não observaram diferença significativa na solubilidade dos biofilmes em água. Zactiti e Kieckbusch (2006) desenvolveram filmes de alginato tratados com diversas concentrações de cálcio, não observando diferença significativa na solubilidade em água dos filmes tratados. Vicentini (2003), em estudo com filmes de fécula de mandioca, observou que o aumento na espessura dos filmes provocou redução da solubilidade em água.

2.3 Filmes ativos

Atualmente, há no setor alimentício, uma busca crescente por métodos de conservação que provoquem menos alterações nas qualidades físico-químicas e sensoriais dos alimentos e que contenham uma quantidade mínima de aditivos. A resposta da indústria tem sido investir em novas tecnologias que atendam a essa demanda, principalmente com o desenvolvimento de novas embalagens. Há poucos anos atrás, as embalagens nos alimentos exerciam somente a função de *marketing* e de proteção passiva. Entretanto, esse conceito vem se modificando e o papel da embalagem como fator ativo na conservação, na manutenção da qualidade e na segurança dos alimentos vem aumentando nos últimos anos. Exemplos disso são as embalagens antimicrobianas, que são aquelas capazes de eliminar ou inibir microorganismos deteriorantes e/ou patogênicos, atuando como mais uma barreira (VERMEIREN et al., 1999).

As embalagens ativas têm sido utilizadas em uma variedade de produtos, como pães, biscoitos, bolos, pizzas, massas frescas, queijos, carnes, frutas, entre outros. Cada um desses produtos tem mecanismos diferentes de deterioração, sendo necessário seu conhecimento para que se possa selecionar a embalagem ativa (VERMEIREN et al., 1999).

A embalagem antimicrobiana é uma forma promissora de embalagem comestível ativa. Embora, a maioria dos produtos alimentícios perecíveis embalados seja esterilizada por meio de processos térmicos ou possuam um sistema de auto-proteção, a contaminação microbiana pode ocorrer na superfície ou em área danificada por defeitos na embalagem ou durante o armazenamento após sua abertura. A incorporação das substâncias antimicrobianas no material da embalagem pode controlar a contaminação por meio da redução da taxa de crescimento e do máximo crescimento populacional, permitindo, estender a fase “lag” do microorganismo alvo, prolongando a vida de prateleira e mantendo a segurança do produto (HAN, 2000). Desse modo, filmes e coberturas com agentes antimicrobianos fornecem uma barreira ativa adicional como obstáculo ao

crescimento desse tipo de microorganismo (OZDEMIR; FLORES, 2001). Essas embalagens apresentam-se de várias formas: (i) adição de sachês no interior da embalagem contendo antimicrobianos; (ii) adsorção de antimicrobianos na superfície do polímero; (iii) imobilização do antimicrobiano nos polímeros por ligações iônicas ou covalentes e (iv) uso de polímeros com atividade antimicrobiana (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

A liberação de aditivos por intermédio de embalagens ativas aumenta a segurança do consumidor, pois esses compostos, em vez de serem diretamente adicionados ao alimento, são liberados de forma controlada em menores quantidades, e apenas onde sua presença é requerida (SOARES et al., 2002).

As substâncias químicas com atividade antimicrobiana geralmente incorporadas no material de embalagem são: ácidos e sais orgânicos (sorbato de potássio e cálcio, ácido propiônico, ácido acético, benzoato de sódio, etc); sulfitos; nitritos e antibióticos. Os agentes antimicrobianos podem ser incorporados inicialmente dentro do material de embalagem e migrar para o alimento por meio de difusão, sendo, um aspecto importante, o controle da liberação e da migração da quantidade de substância antimicrobiana (HAN, 2000).

Na escolha do antimicrobiano, deve-se considerar o tipo de alimento, método de processamento, armazenamento e microorganismo envolvido, bem como outras propriedades como constante de dissociação (pKa) e níveis tóxicos (JAY, 1992). Por razão de solubilidade, sabor e baixa toxicidade, os propionatos, sorbatos e benzoatos são mais utilizados que os ácidos dos quais eles provêm (ANTUNES; CANHOS, 1985).

Soares et al. (2002) desenvolveram filmes de acetato de celulose contendo propionato de sódio em diversas concentrações (0, 2 e 4%) para embalar pães de forma. Os autores observaram que os filmes ativos desenvolvidos causaram um efeito inibitório no crescimento microbiano, sendo mais evidente na máxima concentração, pois após 14 dias de estocagem, a fatia de pão em contato com o filme contendo 4% de propionato de sódio mostrou 70% menos perda por

deterioração do produto quando comparada com as fatias em contato com filme sem propionato de sódio. Siragusa e Dickinson (1993) também observaram que coberturas de alginato contendo ácidos orgânicos foram efetivas na conservação de carne, reduzindo os níveis de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella thyphimurium* e *Escherichia coli*. Ming et al. (1997) reportaram que coberturas ativas de celulose com pediocina também inibiram o crescimento de *Listeria monocytogenes* em carnes.

Fraga et al. (2005) desenvolveram embalagens ativas para a conservação do queijo tipo gorgonzola e verificaram a migração da substância antimicrobiana natamicina incorporada. Os queijos envolvidos com o filme apresentaram boa inibição do crescimento superficial de fungos quando comparados ao filme sem natamicina, durante todo período de maturação avaliado. Porém, os queijos apresentaram um aspecto externo diferente do habitual, com uma coloração esbranquiçada e sem a formação de casca. Pereira et al. (2005) desenvolveram filmes laminados, incorporados de natamicina, e avaliaram sua eficiência antimicrobiana no crescimento de fungos pelo método de formação de halo. Os filmes incorporados de natamicina apresentaram efeito inibitório que aumentava com a concentração do antimicrobiano no filme, em virtude da maior liberação do antifúngico para o meio de cultura. O fungo *Penicillium roqueforti* apresentou maior susceptibilidade à ação da natamicina que os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium sp*, com halo de inibição maior em todas as concentrações estudadas.

Silveira et al. (2007) desenvolveram filmes de base celulósica com 25 e 70 μm de espessura, incorporados com 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6% de ácido sórbico, que foram produzidos e intercalados com massa de pastel sem conservante para avaliar sua ação antimicrobiana. As massas com filmes de 25 μm de espessura, contendo 6% de ácido sórbico apresentaram contagem de psicotróficos inferior a massa controle (sem conservante). Ye et al. (2008) estudaram a eficácia de filmes de Surlyn® recobertos com quitosana e incorporados com nisina (500 UI/cm²); lactato de sódio (0,01 g/cm²); diacetato de sódio (0,0025 g/cm²); sorbato de potássio (0,003 g/cm²) ou benzoato de sódio (0,001 g/cm²) no controle de *Listeria*

monocytogenes em presunto, armazenados primeiramente em temperatura ambiente por 10 dias. A cobertura contendo lactato de sódio foi mais eficiente no controle de *Listeria monocytogenes*. Kristo et al. (2008) estudaram as propriedades térmicas, mecânicas e de barreira ao vapor de água em filmes de caseinato de sódio contendo sorbato de potássio, nisina e lactato de sódio e sua ação contra *Listeria monocytogenes*. Os autores concluíram que os filmes desenvolvidos atenderam ao objetivo de liberarem os compostos antimicrobianos, que foi superior quando a nisina foi utilizada.

2.4 Proteínas do trigo

Glúten é o termo geral adotado para as proteínas da farinha de trigo insolúveis em água. Ele é composto por uma mistura de moléculas polipeptídicas, consideradas proteínas globulares. A coesividade e a elasticidade são características do glúten que facilitam a formação de filme (POMMET et al., 2003). Tratamentos físicos, químicos e enzimáticos têm sido aplicados na modificação dos materiais formadores de filmes de glúten. Os sítios reativos da proteína do glúten são susceptíveis a várias modificações que possibilitam a formação de uma rede tridimensional com forte influência nas propriedades mecânicas e funcionais (SUN; SONG; ZHENG, 2007).

O glúten pode ser separado em 2 frações de quantidades aproximadamente iguais: gliadina e glutenina (KASARDA; NIMMO; KOHLER, 1971). A gliadina é solúvel em etanol 70% e em outros álcoois como metílico, benzílico e ainda fenol. Já, a glutenina é insolúvel em água e etanol, ligeiramente solúvel em etanol a quente. Essa diferença de solubilidade traz problemas na obtenção de filmes, tornando-os opacos e com partículas insolúveis (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992). De acordo com Gennadios e Weller (1990), a massa molecular da gliadina está na faixa de 20.000 a 40.000 Da e da glutenina entre 50.000 a 1.000.000 Da. As moléculas de gluteninas apresentam-se como espirais longas, enquanto as da gliadina são esferas pequenas.

A composição de aminoácidos do glúten determina suas propriedades funcionais. Uma característica importante é seu alto conteúdo de ácido glutâmico (cerca de 37%), existindo principalmente como glutamina. Os grupos amina terminais da glutamina provocam extensivas pontes de hidrogênio entre as cadeias polipeptídicas do glúten. A cistina, outro aminoácido presente, liga duas cadeias polipeptídicas (ligação intermolecular) ou porções de uma mesma cadeia polipeptídica (ligação intramolecular) com ligações dissulfeto (S-S) (KRULL; WALL, 1969 citado por GENNADIOS; WELLER, 1990).

Os filmes de glúten são usualmente preparados pelo processo de *casting*, em que vários fatores — incluindo tipo de glúten, plastificante (tipo e concentração), pH, umidade relativa, solvente e concentração da proteína — podem influenciar as propriedades finais do filme (SUN; SONG; ZHENG, 2007). As ligações dissulfeto são importantes durante a formação de filmes de glúten. Segundo Roy et al. (1999), o mecanismo de formação dos filmes comestíveis à base de glúten corresponde à desnaturação da proteína por meio do aquecimento das soluções protéicas, reduzindo as ligações dissulfídicas (S-S) existentes e expondo grupos SH, que formam zonas de interação intramoleculares. Durante a secagem, pela eliminação parcial do solvente, as proteínas interagem intermolecularmente por pontes de hidrogênio, ligações hidrofóbicas e ligações dissulfídicas que são formadas novamente por meio da oxidação pelo ar, interligando as cadeias de proteínas e promovendo o aparecimento da matriz filmogênica (Figura 2.2). Essa rede pouco hidratada forma então o filme, cujas propriedades são, sobretudo, função do tipo, das atribuições e da intensidade das ligações estabelecidas (GONTARD, 1991 citado por VICENTINI, 2003).

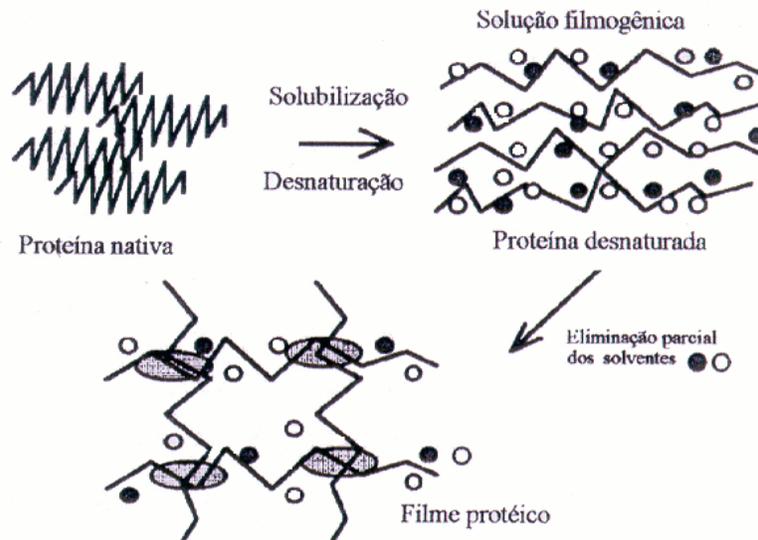


Figura 2.2. Desenho esquemático da formação de filmes de glúten (VICENTINI, 2003).

Diversos autores vêm realizando pesquisas envolvendo filmes simples e compostos à base de glúten do trigo. Gennadios et al. (1993) estudaram o efeito do pH em filmes de glúten e de isolado protéico de soja e sua influência em suas propriedades. Os autores observaram que filmes de glúten preparados em pH de 1 a 3 e filmes de isolado protéico de soja em pH de 6 a 11 apresentaram maiores valores de resistência à tração. Cherian et al. (1995) estudaram o efeito plastificante da sacarose, glicerina e sorbitol nas propriedades termodinâmicas dos filmes de glúten. Observaram melhor miscibilidade do sorbitol em relação aos demais plastificantes utilizados. Pommet et al. (2003) propuseram a utilização de diversos ácidos graxos para plastificar filmes de glúten. Esses autores perceberam que, ao adicionar ácidos graxos com cadeia de carbono menor que 10, o efeito lubrificante mostrou-se mais eficiente, enquanto a utilização de ácidos graxos com cadeias maiores resultou em separação de fases e sua exsudação da matriz protéica. Nos termogramas obtidos por análise dinâmico mecânica (DMA), os mesmos autores verificaram que os filmes plastificados com ácido láurico, mirístico e palmítico apresentaram um pico menor antes do maior pico referente à

temperatura de transição vítrea (T_g) do glúten, em razão da heterogeneidade do material.

Hernández-Muñoz, Villalobos e Chiralt (2004) avaliaram o efeito do tratamento térmico (40, 55, 70, 85, 95 e 115°C) nas propriedades funcionais de filmes elaborados com frações de glúten de trigo (gliadina e glutenina) com e sem glicerol. Os autores observaram que apenas os filmes desenvolvidos com gliadina com e sem glicerol a 70, 85, 95 e 115°C não se desintegram totalmente em água. Acima de 70 °C, há formação de ligações intermoleculares (S-S), levando à criação de uma rede mais coesa pela formação de ligações cruzadas e promovendo, assim, a integridade do filme em água. Paz et al. (2005) estudaram a permeabilidade ao etileno em função da umidade relativa (25 a 75% UR) de filmes de glúten de trigo. Os autores perceberam que a elevação da temperatura e da umidade relativa promove um aumento da permeabilidade ao etileno. Esse comportamento foi atribuído ao efeito plastificante da água ao aumentar a umidade relativa do ensaio

Sun; Song e Zheng (2007) investigaram a utilização de L-cisteína, formaldeído e glutaraldeído na termo-moldagem de filmes biodegradáveis de glúten de trigo contendo glicerol como plastificante. Os autores observaram aumento da resistência à tração e diminuição da porcentagem de alongação com a utilização desses agentes.

2.5 Gelatina

Entre os hidrocolóides disponíveis, a gelatina é o mais popular. É utilizada largamente nas indústrias alimentícia e farmacêutica em razão de suas propriedades funcionais, sendo produzida em grande escala e a preços relativamente baixos (POPPE, 1987).

A gelatina é uma proteína animal, solúvel em água e resultante da hidrólise ácida ou básica do colágeno (POPPE, 1987), cujas propriedades (distribuição de massa molecular, estrutura e composição em sub-unidades) dependem do

processo de obtenção e da matéria-prima (BELL, 1989). Em sua composição química, estão presentes todos os aminoácidos com exceção do triptofano e da cisteína. O conteúdo e seqüência dos aminoácidos variam de uma fonte para outra, no entanto, geralmente, glicina, prolina e hidroxiprolina, encontram-se em maior quantidade (POPPE, 1987).

O processo de obtenção da gelatina comercial pode ser dividida em duas etapas. Primeiramente, o colágeno é desnaturado a 40°C e, posteriormente, submetido à hidrólise (ácida ou básica) para quebra das ligações covalentes. Basicamente, existem dois tipos de gelatinas: gelatina tipo A e gelatina tipo B, as quais diferem quanto ao tipo de preparação. Gelatina tipo A recebe pré-tratamento ácido antes da desnaturação térmica, obtendo um ponto isoelétrico (pI) entre 7 e 9; enquanto que a gelatina tipo B recebe pré-tratamento alcalino, obtendo um pI entre 4,6 a 5,2 (GENNADIOS et al., 1994).

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

Comercialmente, a gelatina é encontrada na forma de cristais de coloração amarelo-palha (BIGI et al., 1998). Ela possui muitos aminoácidos não polares, o que a torna insolúvel em água fria, mas intumesce e tem capacidade de absorver muitas vezes sua massa em água (LEINER DAVIS GELATIN, 1994). A gelatina pode ser dissolvida indiretamente, mantendo suas partículas em água, em repouso, até formar uma massa homogênea, sendo então levada ao aquecimento (50-60°C) até a sua dissolução completa. A dissolução direta é obtida com a adição de água quente (60-80°C) sob forte agitação. O método direto, em razão

da agitação, pode provocar a formação de espuma (JOHNSTON-BANKS, 1990), o que se torna inconveniente na elaboração de filmes comestíveis.

A gelatina tem sido utilizada com sucesso na formação de filmes, servindo como carreador de antimicrobianos e de antioxidante, assim como para diminuir a absorção de óleo em alimentos para fritura (KROCHTA; DE MULDER-JOHNSTON, 1997). Na literatura, existem vários trabalhos relatando propriedades de filmes elaborados à base de gelatina. Carvalho (2002) avaliou as mudanças provocadas nos filmes de gelatina modificados enzimática e quimicamente em relação às suas propriedades funcionais, observando uma diminuição da porcentagem de matéria solúvel em água e da permeabilidade ao vapor de água dos filmes tratados em relação aos filmes sem tratamento. A mesma autora observou aumento da resistência à ruptura, indicando maior grau de intercruzamento da matriz polimérica, sendo mais evidente por meio da modificação química.

Carvalho e Grosso (2006a) avaliaram o efeito da temperatura (40, 50, 60 e 70°C/15 minutos) na reação de modificação enzimática em relação às propriedades funcionais dos filmes à base de gelatina. A temperatura de reação não afetou fortemente a solubilidade ou as propriedades mecânicas dos filmes. Os autores verificaram, entretanto, que os filmes produzidos com a reticulação enzimática a 50°C apresentaram permeabilidade ao vapor de água significativamente inferior aos produzidos nas demais temperaturas. Esse resultado pode estar relacionado a uma melhor estruturação da matriz polimérica após a reticulação enzimática. Carvalho e Grosso (2006b) verificaram o efeito da modificação química (formaldeído e glioxal) nas propriedades dos filmes de gelatina. Observaram que ambos os tratamentos causaram redução na permeabilidade ao vapor de água.

Cao; Fu e He (2007) estudaram as propriedades físicas de filmes compostos de isolado protéico de soja e gelatina, em diversas proporções (10:0; 8:2; 6:4; 4:6;

2:8 e 0:10). Os autores observaram que o aumento da proporção de gelatina provocou a elevação da resistência à tração e da transparência.

2.6 Amido

O amido é um polissacarídeo natural encontrado na forma de grânulos em cereais, raízes e tubérculos. A maior parte desses grânulos é composto por duas macromoléculas: a amilopectina, que é ramificada e de elevada massa molecular (5000-30000 kg/mol), e a amilose, que é essencialmente linear e de menor massa molecular (20-800 Kg/mol) (PERESSINI et al., 2003).

O amido é considerado a matéria-prima mais promissora na elaboração de filmes biodegradáveis, graças a sua capacidade de formar uma matriz apropriada (GARCIA; MARTINO; ZARITZKY, 2000a), além da grande produção mundial e do baixo custo (DOANE, 1992). Os filmes de amido podem ser homogêneos e suas propriedades mecânicas dependem da proporção de amilose e amilopectina que, por sua vez, está relacionada à espécie vegetal (LOURDIN; DELLA-VALLE; COLONNA, 1995). A amilose é considerada a responsável pela capacidade de formação do filme de amido (GARCIA; MARTINO; ZARITZKY, 2000a), sendo suas propriedades influenciadas pelas condições ambientais, principalmente umidade relativa (PERESSINI et al., 2003).

Quando o grânulo de amido é aquecido em excesso de água (>60%), as ligações de hidrogênio presentes nas áreas amorfas são rompidas, permitindo o intumescimento do grânulo, iniciando, dessa forma, o processo de gelatinização (BILIADERIS, 1991). As ligações fortes possibilitam que o grânulo permaneça intacto até que se rompam em algum ponto. Nessa condição, a expansão do grânulo torna-se irreversível e a ordem estrutural desaparece (GARCIA et al., 1997). Caso os grânulos continuem a expandir-se, a amilose é lixiviada para a fase aquosa entre os grânulos (BILIADERIS, 1991). Após a gelatinização, as moléculas de amilose, em virtude de sua linearidade, orientam-se paralelamente, aproximando-se suficientemente para formar pontes de hidrogênio entre as

hidroxilas de polímeros adjacentes (fenômeno de retrogradação). Ocorre redução do volume livre, diminuindo a afinidade do polímero pela água, podendo o amido gelatinizado formar filmes estáveis e flexíveis conforme esquematizado na Figura 2.3 (WURZBURG, 1986).

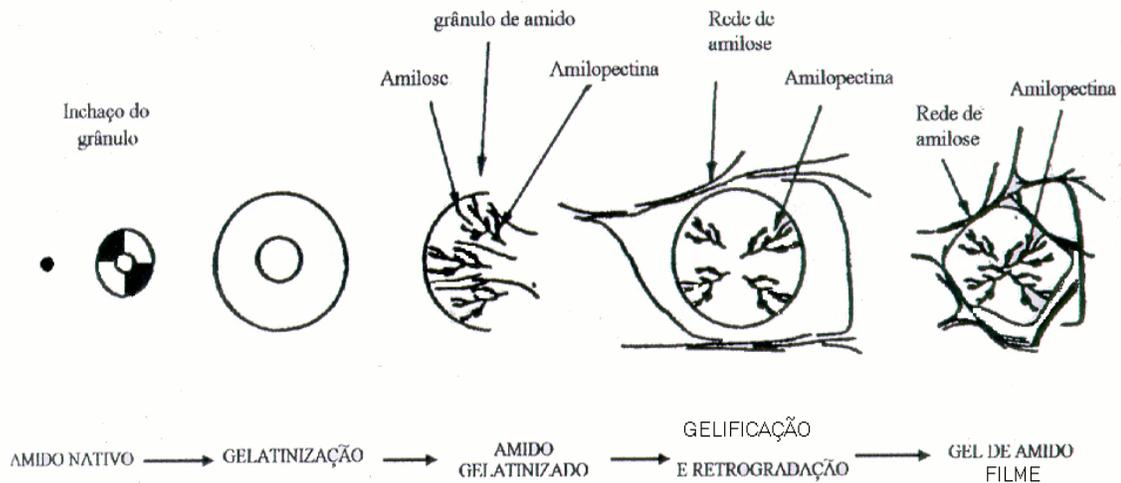


Figura 2.3. Esquema de formação do filme de amido (VICENTINI, 2003).

Lourdin; Della-Valle e Colonna (1995) estudaram o efeito do conteúdo de amilose nas propriedades dos filmes, observando que a resistência à tração se eleva com o aumento do teor de amilose. Garcia; Martino e Zaritzky (2000a) estudaram a adição de lipídios em filmes de amido e observaram que esses, com alto teor de amilose, se mostraram menos permeáveis ao vapor de água e à gases. Arvanitoyannis; Nakayama e Aiba (1997) estudaram filmes elaborados a partir de uma mistura de gelatina e amido de batata e observaram que um elevado conteúdo de gelatina (maior que 20% p/p) conduziu a um aumento na resistência à tração dos filmes.

Flores et al. (2007) avaliaram a influência da adição de sorbato de potássio e das condições de gelatinização e secagem nos filmes de amido de mandioca em suas propriedades físicas. A presença de sorbato de potássio afetou as propriedades de solubilidade em água, cor e propriedades mecânicas. Esses

autores também observaram que a técnica de gelatinização e secagem afetam as características da rede, modificando as características dos filmes.

Bertuzzi, Armada e Gottifredi (2007) estudaram a caracterização físico-química de filmes de amido de milho. Os autores observaram redução da opacidade e solubilidade em água com a utilização de um pré-tratamento com álcali no amido. Alves et al. (2007) estudaram a influência de uma solução rica em amilose e glicerol, em diversas proporções, nas propriedades de barreira e mecânicas de filmes de amido de mandioca. Os autores observaram que o enriquecimento da solução formadora de filme com solução de amilose originou filmes mais fortes e permeáveis. A adição de glicerol provocou aumento da permeabilidade ao vapor de água.

3.0 Material e Métodos

3.1. Material

As matérias-primas utilizadas na elaboração dos filmes foram:

- (i) Glúten, fornecido pela Roquette (França);
- (ii) Gelatina tipo A, fornecida pela Leiner Davis Gelatin (Cotia, Brasil);
- (iii) Amido de mandioca (AMILOGILL[®] 1500), fornecido pela Cargill (São Paulo, Brasil);
- (iv) Amido de mandioca modificado (AMIDOMAX[®] 5500), fornecido pela Cargill (São Paulo, Brasil);
- (v) Amido milho ceroso (AMISOL[®] 4000), fornecido pela Corn Products (Jundiaí, Brasil);
- (vi) Amido milho ceroso modificado quimicamente (FLUIDEX[®] SS-22), fornecido pela Corn Product (Jundiaí, Brasil);
- (vii) Sorbato de potássio (Chemco, Brasil), como agente antimicrobiano;
- (viii) Glicerol (Synth, Brasil), como plastificante;
- (ix) Ácido acético glacial (Synth, Brasil), como ajustador de pH;
- (x) Etanol (Stynth).

Os pães-de-fôrma foram obtidos a partir das seguintes matérias-primas:

- (i) Farinha de trigo, fornecida pela Cargill (Tatuí, Brasil);
- (ii) Margarina (Amélia, Brasil);
- (iii) Açúcar (União, Brasil);
- (iv) Leite em pó integral (Nestlé, Brasil);
- (v) Sal (Cisne, Brasil);
- (vi) Fermento biológico instantâneo seco (Fleischmann, Brasil);
- (vii) Melhorador ZEA 500 (Emulzint, Brasil)

3.2. Elaboração dos filmes

3.2.1. Filme à base de gelatina (GEL)

A solução formadora de filme foi obtida hidratando-se 10 e 15 g de gelatina em 100 mL de água destilada, por 1 hora/25°C. Posteriormente, a solução foi solubilizada a 55°C, em banho termostático, por 10 e 15 minutos para os filmes de 10 e 15 g de gelatina, respectivamente. Após completa solubilização, adicionou-se glicerol (5% e 10% em relação à massa seca de gelatina) sob agitação magnética, sendo mantido o pH natural da solução. A solução (14 mL) foi aplicada sobre placas de polipropileno (14 cm de diâmetro e 1,2 cm de altura) e seca à temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas.

3.2.2. Elaboração de filme à base de glúten (GLU)

A solução formadora de filme foi preparada utilizando-se glúten (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5 g /100 mL solução); etanol (20; 32,5; 45; 57,5 e 70 mL/100 mL de solução); água destilada (30; 42,5; 55; 67,5 e 80 mL/100 mL de solução) e ácido acético para ajustar o pH (2; 3; 4; 5 e 6). O glicerol foi adicionado na concentração de 20% (em relação à massa seca de glúten). Todos os componentes foram misturados sob agitação magnética até atingir a temperatura de 70°C, permanecendo nessa temperatura por 5 minutos. A seguir, a solução formadora de filme foi centrifugada a 5000 rpm por 20 minutos à temperatura ambiente. A solução límpida resultante foi colocada em placas de polipropileno (14 cm de diâmetro e 1,2 cm de altura) previamente aspergida com *spray* de silicone (LIM; MINEY; TUNG, 1998) e seca à temperatura ambiente por, aproximadamente, 24-48 horas (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992).

3.2.3 Filmes à base de amido de mandioca (AM) ou mandioca modificado (AMM)

A solução formadora de filme foi preparada utilizando amido (2 e 4% p/v), água (100 mL) e glicerol (10% em relação à massa seca do amido), sob agitação e aquecimento em banho-maria (75°C) por 15 minutos.

3.2.4 Filmes à base de amido de milho ceroso (AMC) ou milho ceroso modificado (AMCM)

A solução formadora de filme foi preparada utilizando amido (2 e 4% p/v), água (100 mL) e glicerol (10% em relação à massa seca do amido), sob agitação e aquecimento em banho-maria (85°C) por 5 minutos.

3.2.5 Filmes compostos

Foram confeccionados os filmes compostos de GLU/GEL, AM(2 e 4%)/GEL, AMM(2 e 4%)/GEL, AMC(2 e 4%)/GEL, AMCM(2 e 4%)/GEL em diversas proporções (1:1; 1:4 e 4:1 v/v) (TANADA-PALMU; FAHKOURI; GROSSO, 2002) e AM(2 e 4%)/GLU/GEL, AMM(2 e 4%)/GLU/GEL, AMC(2 e 4%)/GLU/GEL, AMCM(2 e 4%)/GLU/GEL (1:1:1 v/v/v). A solução foi aplicada sobre placas de polipropileno (14 cm de diâmetro e 1,2 cm de altura) e seca à temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas.

3.2.6 Filmes ativos

À solução formadora de filme de GLU/GEL e AMM(2%)/GEL, nas proporções 1:4 v/v (TANADA-PALMU; FAHKOURI; GROSSO, 2002) e AMM(2%)/GLU/GEL (1:1:1 v/v/v), foi adicionado o agente antimicrobiano sorbato de potássio nas concentrações de 2 e 4% (p/v) para confecção dos filmes ativos.

3.3 Metodologia de caracterização dos filmes simples e compostos

Antes das análises de caracterização, todos os filmes secos foram acondicionados em dessecadores a 25°C e 52% UR, durante 48 horas. Os biofilmes simples e compostos foram caracterizados quanto ao aspecto visual, propriedades de barreira ao vapor de água, solubilidade em água e propriedades mecânicas. Os filmes compostos selecionados adicionados ou não de sorbato de potássio (2 e 4%) foram também caracterizados quanto à permeabilidade ao oxigênio, microscopia eletrônica de varredura, análise dinâmico-mecânica e determinação da efetividade antimicrobiana pelo método de halo.

3.3.1 Caracterização dos filmes

3.3.1.1 Aspecto visual

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

3.3.1.2 Espessura (e)

A espessura dos filmes foi determinada utilizando-se um micrômetro digital (resolução 0,001 mm), MITUTOYO (MDC-25M, Kanagawa, Japan). Ela foi calculada como a média aritmética de cinco medidas aleatórias sobre a área do filme. Essa medida foi obtida depois do período de acondicionamento dos filmes.

3.3.1.3 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água dos filmes foi determinada gravimetricamente a 25°C, de acordo com o método padrão E-96-95 da ASTM (ASTM, 1995). O filme em forma de disco de 9,0 cm de diâmetro foi selado com

parafina em células de permeação feitas de alumínio, contendo cloreto de cálcio em seu fundo. A selagem foi realizada para garantir que toda a transferência de umidade ocorresse através do filme. As células de permeação foram então acondicionadas em dessecadores com temperatura (25°C) e umidade relativa controlada (por meio de uma solução de NaCl saturada, com umidade relativa correspondendo a 75%). O vapor de água transferido através do filme foi determinado pelo ganho de massa do cloreto de cálcio, medido a cada 24 horas por 7 dias. Os testes foram realizados em triplicata. A taxa de permeação ao vapor de água (PVA) foi calculada por intermédio da seguinte equação:

$$PVA = \frac{e}{A \times \Delta p} \times \overset{\circ}{M} \quad (3.1)$$

Onde:

PVA é a permeabilidade ao vapor de água (gmm/m²diakPa);

e é a espessura (mm);

A é a área da superfície exposta do filme (m²);

Δp é a diferença de pressão parcial do vapor de água através do filme (kPa);

$\overset{\circ}{M}$ é a taxa de umidade absorvida (g)/ tempo (dia).

3.3.1.4 Solubilidade em água (SOL)

A solubilidade em água dos filmes foi determinada segundo o método proposto por Gontard et al. (1994). As amostras foram preparadas em triplicata, sendo recortadas em discos de 2 cm de diâmetro. A massa seca inicial dos filmes foi obtida após secagem em estufa de circulação de ar à temperatura de 105°C por 24 horas. Posteriormente, as amostras secas foram imersas em um recipiente contendo 50 mL de água destilada, e o sistema foi mantido sob lenta agitação mecânica por um período de 24 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, as amostras solubilizadas foram submetidas novamente à secagem a

105°C por mais 24 horas, para a obtenção da massa seca final. A solubilidade foi expressa de acordo com a equação:

$$SOL = \frac{(M_i - M_f)}{M_i} \times 100 \quad (3.2)$$

Onde:

SOL é a massa solubilizada em função da massa seca inicial (%);

M_i é a massa seca inicial (g);

M_f é a massa seca final, após solubilização (g).

3.3.1.5 Propriedades mecânicas

A resistência à tração (RT) e a elongação na ruptura (ELO) foram determinadas utilizando-se o texturômetro TA.XT2 (Stable Micro System, Hasleme, Inglaterra) operado de acordo com o método padrão ASTM D 882-83 (ASTM, 1995D). As medidas foram conduzidas em temperatura ambiente (25°C). A separação inicial das garras e a velocidade do *probe* foram de 50 mm e 1 mm/s, respectivamente. As amostras foram cortadas em tiras apresentando 100 mm de comprimento e 25 mm de largura. Foram realizadas doze replicatas. A resistência à tração (RT) e a porcentagem de elongação (E) foram calculadas pelas equações (3.3) e (3.4), respectivamente:

$$RT = \frac{F_m}{A} \quad (3.3)$$

Onde:

RT corresponde à resistência à tração (MPa);

F_m é a força máxima no momento da ruptura do filme (N);

A é a área da secção transversal do filme (m²);

$$ELO = \frac{d_r - d_{inicial}}{d_{inicial}} \times 100 \quad (3.4)$$

Onde:

ELO é a elongação (%);

d_r é a distância no momento da ruptura (cm), que corresponde à diferença entre a distância de separação no momento da ruptura e a distância inicial (5 cm);

$d_{inicial}$ é a distância inicial de separação (5 cm).

3.3.1.6 Permeabilidade ao oxigênio (PO_2)

A taxa de transmissão de oxigênio (TTO) foi determinada utilizando-se uma modificação do método padrão ASTM D 3985-81 com o aparelho OX-TRAN 2/20 (Mocon, Inc) a 25°C (ASTM, 1990). A permeabilidade ao oxigênio (PO_2) foi calculada por meio da seguinte equação:

$$PO_2 = \frac{TTO \times e}{\Delta p} \quad (3.5)$$

Onde:

PO_2 é a permeabilidade ao oxigênio ($\text{cm}^3 \mu\text{m}/\text{m}^2 \text{ dia kPa}$);

TTO é a taxa de transmissão de oxigênio ($\text{cm}^3/\text{m}^2 \text{ dia}$);

e corresponde à espessura (μm);

Δp é a diferença de pressão parcial de oxigênio entre os dois lados do filme (kPa).

A diferença de pressão de oxigênio através do filme corresponde à pressão atmosférica (101,3 kPa), sendo as amostras sujeitas a gás oxigênio puro (100%) de um lado e de um gás de arraste contendo 98% de nitrogênio e 2% de hidrogênio do outro lado. Os ensaios foram realizados em duplicata nos filmes

aconicionados à temperatura de 25°C, 52 ± 2% de umidade relativa, durante 48 horas. Para facilitar a fixação do filme, foi utilizada uma máscara de alumínio (área exposta fixa = 8 cm²).

3.3.1.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura da superfície e da seção transversal dos filmes foi avaliada utilizando-se microscopia eletrônica de varredura (LEO 440i -Cambridge) a 5 kV. Os filmes foram mantidos em dessecadores contendo sílica gel (25°C) por um período de 7 dias, depois dos quais foram fraturados. As amostras de filme fraturadas foram fixadas em suportes (*stubs*) de alumínio, com fita adesiva de carbono. Para conferir condutividade aos filmes, foram recobertas com uma camada de ouro de espessura de 92 Å a uma taxa de recobrimento de 0,5 Å/segundo em metalizador à vácuo (Polaron SC 7620), por 180 segundos, a 3 mA. As amostras foram observadas com aumento de 1000X.

3.3.1.8 Análise dinâmico-mecânica (DMA)

A temperatura de transição vítrea (T_g) dos filmes foi determinada utilizando-se o equipamento DMA (Dynamic Mechanical Analysis DMA 2980, TA Instruments, New Castle, DE). Os filmes foram acondicionados a 25°C e 52% de umidade relativa por um período de 72 horas. As amostras foram cortadas em tiras e fixadas em um suporte apropriado. Foi aplicado um módulo de tensão sobre elas de modo simultâneo ao aquecimento. As medidas foram conduzidas utilizando-se a frequência de 1 Hz, amplitude de 20 µm, força de 1 N e corrida na faixa de -120 a 100°C, com taxa de aquecimento de 2°C/min. As medidas de módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e ângulo de perda (tan δ) foram registradas e representadas na forma de gráficos em função da temperatura para a análise de transição térmica. A T_g foi determinada no ponto de inflexão da curva do parâmetro ângulo de perda (tan δ) em função da temperatura (CHERIAN et al., 1995).

3.3.1.9 Determinação da efetividade antimicrobiana do filme pelo método de difusão em halo

3.3.1.9.1 Preparação do inóculo

O preparo do inóculo constituiu na inoculação das espécies fúngicas em ágar CY20S ou CYA e incubação a 25°C por 5 dias. Em seguida, fez-se uma raspagem das colônias presentes na placa com auxílio de uma alça, as quais foram transferidas para um frasco contendo 50 mL de água peptonada 0,1% com 0,1% de Tween 80. A suspensão foi agitada por 1 min e filtrada com auxílio de gaze estéril. A partir desse inóculo inicial, foram realizadas diluições decimais e escolhida a suspensão para o teste de difusão de acordo com as características de crescimento de cada espécie.

3.3.1.9.2 Teste de difusão em halo

Os filmes ativos foram colocados na superfície dos meios de cultura CY20S (Ágar Czapek Extrato de levedura 20% de sacarose) e CYA (Ágar Czapek Extrato de levedura), já solidificados e com 0,1 mL de suspensão de esporos preparada (item 3.3.1.9.1): (i) *Eurotium chevalieri* (CY20S); (ii) *Eurotium amstelodami* (CY20S), (iii) *Wallemia sebi* (CY20S); (iv) *Penicillium raistrickii* (CYA) e (v) *Cladosporium sp* (CYA). Cortes circulares dos filmes ativos (2,5 cm de diâmetro) foram colocados assepticamente sobre a superfície do meio solidificado e com o microorganismo teste. As placas foram incubadas a 25°C por 120 horas. A eficiência do agente antimicrobiano foi avaliada pela formação de halo ao redor dos filmes (PEREIRA et al., 2005) e pela quantificação da unidade formadora de colônia (UFC/mL). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Como controle foi utilizado filme sem o agente antimicrobiano

3.4 Produção de pão de forma

Os pães-de-fôrma foram produzidos segundo a formulação apresentada na Tabela 3.1.

Tabela 3. 1. Formulação padrão do pão de forma.

Ingredientes	Quantidade (% em relação à massa de farinha)
- farinha de trigo	100
- água	58*
- sal	2
- açúcar	6
- fermento biológico instantâneo seco	1,3
- melhorador de farinha (ZEA 500)	0,3
- margarina	8
- leite em pó integral	4

* depende da característica de absorção de água da farinha de trigo.

Os ingredientes foram misturados em amasseira (Hypo, modelo HAE 10) por 5 minutos em velocidade lenta (900 rpm) e 8 minutos em velocidade rápida (1800 rpm). A massa foi, então, separada em pedaços de 530 g, deixada descansar por 10 minutos, modelada e, a seguir, mantida em câmara de fermentação (Thermopão Maquip, Klimaquip, modelo 20B) a 30°C, com umidade relativa de 80%, por 2 horas. Após a fermentação, os pães foram levados ao forno (Hypo, modelo HF 4B) para serem assados a 180°C, por 35 minutos e depois, resfriados por 24 horas, fatiados e embalados em sacos de polietileno.

3.4.1 Método de análise microbiológica para isolamento de fungos

Os pães de forma foram produzidos e armazenados em temperatura ambiente até crescimento visível de fungos, para posterior identificação e determinação da efetividade antimicrobiana do filme pelo método de halo.

3.4.1.1 Análise microbiológica

Para a análise microbiológica, uma amostra de 25 g de pão de forma foi homogeneizada com 225 mL de água peptonada 0,1% em *stomacher* por 2 minutos. Em seguida, procedeu-se as diluições decimais seriadas e o plaqueamento por superfície (0,1 mL) em meio Dicloran 18% glicerol Agar (DG18). As placas foram incubadas a 25°C por 5 dias. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g) (DOWNES; ITO, 2001).

3.4.1.1.1 Identificação das espécies fúngicas

Todos os fungos foram inicialmente isolados e purificados em ágar de extrato de malte (MEA) e incubados a 25°C por 7 dias. Espécies de *Penicillium* foram inoculadas em Agar Czapek extrato de levedura (CYA) incubados em três temperaturas (5, 25 e 35°C) por 7 dias e identificados conforme chave de identificação de Pitt (1988). Os demais fungos foram identificados de acordo com Pitt e Hocking (1999), Samson et al. (1996) e outras chaves de identificação.

3.5 Aplicação do biofilme no acondicionamento de pão de forma

Os filmes com e sem sorbato foram usados para embalar os pães de forma, sendo utilizadas três fatias de pães para cada tratamento selecionado. As fatias justapostas foram intercaladas com os filmes ativos selecionados (três fatias e dois filmes) e colocadas em sacos de polietileno de baixa densidade (PEBD) (Figura 3.1) (SOARES et al., 2002) e selados. Ao mesmo tempo foram embaladas e seladas três fatias apenas com PEBD, sem filmes em seu interior. Os pães foram estocados a temperatura controlada (25°C) durante 7 dias. As avaliações foram feitas de três em três dias (1º; 4º e 7º dia).



Figura 3.1. Foto das fatias de pão de forma intercaladas com os biofilmes ativos (SOARES et al., 2002).

3.5.1 Análises dos pães de forma embalados

3.5.1.1 Perda de peso

A perda de peso foi medida anotando-se o peso inicial do pão, pesando-se o produto junto com o filme em balança semi-analítica (Toledo PB 3002, Suíça). As pesagens foram feitas em quintuplicatas.

3.5.1.2 Determinação Instrumental da textura

A medida instrumental de textura dos pães (força máxima aplicada para pressionar duas fatias de pão de forma) foi determinada pelo analisador de textura TA.XT2, segundo método no 74/09 da AACC (1995a). Os resultados foram expressos em gf (grama-força). As condições empregadas nesse teste foram as seguintes: Sonda: P/35R – cilindro de acrílico; modo: força em compressão; velocidade de teste = 1,7 mm/s; medida na situação de 40% de compressão da amostra; velocidade de pré-teste = 1,0 mm/s e velocidade de pós-teste = 10,0 mm/s. As análises foram feitas em nove replicatas.

3.5.1.3 Determinação do conteúdo de umidade

A determinação do conteúdo de umidade dos pães de forma foi efetuada, em triplicata, por dessecação no ambiente por 24 horas, seguida de secagem em estufa a 130°C, até peso constante conforme o método da AACC 44-15A (1995b). As análises foram feitas em triplicata.

3.5.1.4 Determinação de atividade de água

A determinação da atividade de água foi realizada utilizando-se o aparelho modelo AquaLab Cx 2T, marca Decagon Devices Inc. (USA), operando-se à temperatura de 25°C. As amostras eram fatias de 3 mm de espessura colocadas em cápsulas. As análises foram feitas em triplicata.

3.5.1.5 Análise microbiológica

Para a análise microbiológica, uma amostra de 25 g de pão de forma foi homogeneizada com 225 mL de água peptonada 0,1% em *stomacher* por 2 minutos. Em seguida, procedeu-se as diluições decimais seriadas e o plaqueamento por superfície (0,1 mL) em meio Dicloran 18% glicerol Agar (DG18) para determinação de bolores e leveduras. As placas foram incubadas a 25°C por 5 dias. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g). (DOWNES; ITO, 2001). As análises foram feitas em triplicatas.

3.5.1.6 Extração e quantificação de sorbato de potássio

A extração de sorbato de potássio dos pães de forma foi realizada de acordo com a metodologia de SILVEIRA (2005), com algumas modificações. Dois gramas de pão de forma previamente triturado foram adicionados a 40 mL de etanol e, após 3 horas de agitação a 90 rpm, o volume foi completado para 100 mL com água pura (18,2 ohm). Após 15 minutos de agitação, o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 µm (SILVEIRA, 2005).

Alíquotas de 20 µL foram utilizadas para quantificação de sorbato de potássio em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise foi conduzida em cromatografo SHIMADZU (modelo 10 AVP), coluna X-Terra (Wartes) RP18 (4,6 X 150 mm X 5 µm) e sistema de detecção UV. A fase móvel constituiu de 60% de acetonitrila; 39% de água e 1% de ácido fosfórico 0,1%, com fluxo de 1 mL/min, sendo a detecção realizada em 260 nm (SILVEIRA, 2005).

3.6 Análise Estatística

A análise estatística de variância (ANOVA) foi realizada utilizando-se o programa Statistica® 5.0 (Stasoft; USA). As diferenças significativas entre as médias foram identificadas por meio do teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Para a avaliação estatística dos resultados obtidos com os biofilmes de glúten, utilizou-se o programa computacional Statistica® 5.0 realizando a análise do planejamento experimental completo, ajuste dos pontos experimentais a modelos matemáticos, tratamentos estatísticos e construção das superfícies de resposta. O ajuste dos modelos testados e sua significância foram analisados por intermédio dos coeficientes de correlação e do Teste F.

4.0 Resultados e Discussão

4.1 Filmes simples à base de gelatina plastificado com glicerol

4.1.1 Caracterização dos filmes

4.1.1.1 Aspecto visual

De modo geral, os filmes elaborados com gelatina e glicerol, em todas as concentrações, apresentaram-se transparentes e homogêneos. Aspecto semelhante foi obtido por Fakhouri; Batista e Grosso (2003) e Bertan et al. (2005) em filmes de gelatina e triacetina. Sobral (1999) elaborou filmes com gelatina de couro bovina e suína, que também se mostraram manuseáveis, transparentes e visualmente homogêneos. Os elaborados com menor quantidade de gelatina (10 g) mostraram-se mais maleáveis em ambas as concentrações de plastificante utilizadas, enquanto o aumento na concentração do teor de gelatina (de 10 para 15 g) resultou em filmes mais rígidos.

4.1.1.2 Espessura

As espessuras dos filmes desenvolvidos variaram entre 0,075 mm (gelatina 10 g/glicerol 5%) e 0,128 mm (gelatina 15 g/glicerol 10%). Essa diferença relaciona-se ao aumento na quantidade de matéria seca. Resultado semelhante foi encontrado por Ayranci e Çetin (1995). Os autores adicionaram concentrações crescentes de proteína de pistache em soluções com concentração constante de celulose, e observaram espessuras variando de 0,014 a 0,045 mm. Bertan et al. (2005) observaram que a adição de substâncias hidrofóbicas promoveu aumento na espessura dos biofilmes, sendo necessário utilizar alíquotas diferentes (10 a 16 mL) para cada formulação com o objetivo de controlar as espessuras para a repetibilidade das medidas e validade das comparações entre as propriedades analisadas. Fakhouri; Batista e Grosso (2003) observaram que a adição de ácido graxo aos filmes de gelatina e triacetina causou aumento na espessura (0,019

para 0,068 mm). Sobral (1999) ao estudar o efeito da espessura nas propriedades funcionais de biofilmes de gelatina de couro bovino e suíno contendo sorbitol, observou que, ao elevar a concentração da proteína, houve um aumento linear da espessura dos biofilmes.

4.1.1.3 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Os valores de permeabilidade ao vapor de água encontrados para as diferentes formulações dos biofilmes estão apresentados na Tabela 4.1. Pode-se observar que houve um aumento significativo ($p \leq 0,05$) nos valores de permeabilidade ao vapor de água com a elevação da concentração gelatina (10 para 15 g), provavelmente em função do aumento da espessura dos filmes. Segundo Park e Chinnan (1995), a permeabilidade ao vapor de água pode variar com a espessura dos filmes em virtude de mudanças estruturais causadas pelo inchamento da matriz, o que afeta a estrutura dos filmes e provoca tensões internas que podem influenciar a permeação. Resultados semelhantes foram encontrados por Sobral (1999), que correlacionou essa permeabilidade dos filmes de gelatina bovina e suína plastificados com sorbitol linearmente com a espessura. Fakhouri; Batista e Grosso (2003) também notaram que o aumento da espessura causou elevação na permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina plastificados com triacetina. Estes encontraram valores menores de permeabilidade ao vapor de água (3,49 e 4,38 $\text{gmm/m}^2\text{diakPa}$) para os filmes de gelatina (10 g) e triacetina (5 e 10%, respectivamente) que os desenvolvidos no presente estudo, possivelmente em decorrência da utilização de filmes menos espessos (0,018 e 0,035 mm) ou em razão do tipo de plastificante utilizado.

Tabela 4.1. Permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes de gelatina e glicerol (25°C).

Filmes	Espessura (mm)	PVA (gmm/m ² diakPa)*
GEL (10g)/GLI 5%	0,075 ± 0,009	5,38 ± 0,54 ^b
GEL (10g)/GLI 10%	0,078 ± 0,030	5,49 ± 0,10 ^b
GEL (15g)/GLI 5%	0,115 ± 0,048	8,34 ± 0,01 ^a
GEL (15g)/GLI 10%	0,128 ± 0,022	8,45 ± 0,47 ^a

Média e erro padrão das replicatas. * Letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas por meio do teste de TUKEY. GEL= gelatina; GLI= glicerol e PVA = permeabilidade ao vapor de água

Não foi possível observar diferença significativa ($p \geq 0,05$) nos valores de permeabilidade ao vapor de água ao elevar a concentração de glicerol (5 para 10%), tanto para os filmes de 10% quanto para os de 15% de gelatina. Resultados semelhantes foram encontrados por Fakhouri; Batista e Grosso (2003), em que o aumento da concentração de triacetina (10 para 15%) não causou diferença significativa na permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina em ambas as alíquotas estudadas (8 e 14 mL). Contrariamente, Sobral (1999) verificou que o aumento na concentração de plastificante, de 30 a 50% de glicerol, elevou a permeabilidade ao vapor de água de $8,64 \times 10^{-8}$ para $12,24 \times 10^{-8}$ gmm/m²diakPa. Gontard; Guilbert e Cuq (1993) também notaram aumento na permeabilidade ao vapor de água de filmes de glúten paralelamente à elevação da concentração de glicerol. Os autores atribuíram esse fato às modificações estruturais da rede protéica, que pode ter se tornado menos densa, e, sobretudo, à hidrofiliidade da molécula de glicerol. Vicentini (2003) verificou o crescimento da permeabilidade ao vapor de água de $7,44 \times 10^{-3}$ para $11,28 \times 10^{-3}$ gmm/m²diakPa nos filmes de glúten, em razão do aumento da concentração de glicerol de 12 para 20%.

Muitos estudos enfocam a influência do aumento da concentração de plastificante nas propriedades funcionais dos filmes, como na permeabilidade ao vapor de água. É bem conhecido que essa permeabilidade tende a elevar-se com o aumento do teor de plastificante hidrofílico (SOBRAL, 2000). Possivelmente, esse comportamento não foi elucidado nesse estudo em virtude da baixa

concentração do plastificante nos filmes de gelatina. Segundo Banker (1966), as propriedades de barreira dos filmes podem ser influenciadas pela seleção e concentração de plastificante.

4.1.1.4 Solubilidade em água (SOL)

A solubilidade em água (Tabela 4.2) variou de 30,34 a 33,50%. Não foi observada diferença significativa ($p \leq 0,05$) com relação à elevação da concentração de gelatina (10 para 15 g), mas o aumento da concentração de glicerol (5 para 10%) provocou elevação na solubilidade em água para os filmes com 10% de gelatina, variando de 30,34% (5% de glicerol) para 33,50% (10% de glicerol).

Tabela 4.2. Solubilidade em água (SOL) dos filmes de gelatina e glicerol.

Filmes	SOL (%)*
GEL (10g)/GLI 5%	30,34 ± 0,58 ^c
GEL (10g)/GLI 10%	33,50 ± 0,27 ^a
GEL (15g)/GLI 5%	30,93 ± 0,24 ^{bc}
GEL (15g)/GLI 10%	32,56 ± 0,45 ^{ab}

Média e erro padrão das replicatas. * Letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas por meio do teste de TUKEY. GEL= gelatina; GLI= glicerol e SOL= solubilidade em água.

Sarmiento (1999) verificou que a solubilidade do biofilme de gelatina reticulada cresceu de 40 para 50% com o aumento da concentração de glicerol (de 55 g a 85 g de plastificante por 100 g de gelatina). O autor atribuiu esse comportamento à migração do sorbitol para a água, em virtude do caráter hidrofílico e pelo fato de o sorbitol não estar ligado quimicamente à gelatina, podendo, então, deslocar-se com relativa facilidade da rede protéica.

4.1.1.5 Propriedades mecânicas

Os valores de resistência à tração e porcentagem de alongação dos filmes de gelatina (10 e 15 g)/glicerol (5 e 10%) são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Propriedades mecânicas dos filmes de gelatina e glicerol (25°C).

Filmes	Espessura (mm)	RT (MPa)*	ELO (%) *
GEL (10g)/GLI 5%	0,076 ± 0,009	90,73 ± 0,89 ^{ab}	6,85 ± 2,32 ^a
GEL (10g)/GLI 10%	0,080 ± 0,026	80,98 ± 1,57 ^c	7,17 ± 0,19 ^a
GEL (15g)/GLI 5%	0,112 ± 0,021	93,50 ± 1,82 ^a	5,30 ± 0,27 ^a
GEL (15g)/GLI 10%	0,118 ± 0,012	85,41 ± 2,43 ^{bc}	5,54 ± 2,43 ^a

Média e erro padrão das replicatas. * Letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas por meio do teste de TUKEY. GEL= gelatina; GLI= glicerol; RT= resistência a tração e ELO= alongação.

Observa-se que o aumento da concentração de plastificante (5 para 10%), diminuiu significativamente ($p \leq 0,05$) a resistência à tração dos filmes. Provavelmente, isto ocorreu pelas alterações causadas na rede protéica com a incorporação do plastificante. A incorporação de plastificante em biopolímeros modifica a organização molecular tridimensional da rede protéica, diminuindo as forças de atração intermoleculares e eleva o volume livre do sistema. Conseqüentemente, a rede torna-se menos densa (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2000). A força na ruptura é influenciada pela interação entre as proteínas na matriz filmogênica, em diversos sítios ativos das cadeias protéicas e os plastificantes reduzem o número dessas ligações por meio da solvatação de sítios ativos polares (LIM; MINEY; TUNG, 1998).

A resistência dos filmes plastificados com 5% de glicerol mostrou-se maior que os plastificados com 10%, sendo maior no filme GEL (15g)/GLI 5% (93,50 MPa). Comportamento semelhante foi observado por Sobral (2000) em estudo sobre as propriedades funcionais de biofilmes de proteína de origem animal em função do plastificante. O autor verificou que o aumento da concentração de sorbitol numa faixa de 15 a 65% gerou uma queda da força de ruptura de 16,0 para 8,2 N e de 16,2 para 9,0 N, no caso dos filmes de gelatina de couro bovina (GCB) e gelatina de pele suína (GPS), respectivamente. Cuq et al. (1997), ao trabalharem com biofilmes de proteína miofibrilar, observaram diminuição da força na ruptura de 5,1 para 2,6 N, com o aumento da concentração de glicerol. Monterrey-Quintero (1998) elucidou a diminuição da força de ruptura de 6,67 para

2,94 N ao aumentar a concentração de glicerol de 30 para 70% (g de plastificante por g de proteína) nos filmes à base de proteína miofibrilar de carne bovina.

Apesar de o aumento da concentração de gelatina (10 para 15g) não ter alterado de maneira significativa ($p \leq 0,05$) a resistência à tração dos filmes plastificados tanto com 5 quanto com 10% de glicerol, os de maior concentração de gelatina mostraram valores de resistência à tração maiores. Provavelmente, o aumento na concentração de gelatina provocou uma elevação das interações moleculares entre as cadeias adjacentes, elevando as interações entre as macromoléculas, conseqüentemente elevando a resistência à atração dos filmes.

Yoshida (2002) observou que a resistência à tração foi maior para altas concentrações de proteína do soro do leite, que relaciona-se com o aumento do número de ligações covalentes S-S na matriz filmogênica, em virtude da maior quantidade de grupos sulfidrílicos na superfície protéica.

Os valores de porcentagem de alongação (Tabela 4.3) não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) tanto na variação da concentração de gelatina, quanto no plastificante. Ela variou de 5,30% para o filme de gelatina (15 g)/glicerol 5% a 7,17% para o de gelatina (10 g)/glicerol 10%. A incorporação de plastificante torna a rede menos densa com o decréscimo das forças, melhorando a flexibilidade e extensibilidade (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2000). Provavelmente, nesse estudo, a concentração de plastificante utilizada não foi suficiente para alterar a alongação dos filmes.

Fakhouri, Batista e Grosso (2003) não observaram diferença significativa na porcentagem de alongação em função da espessura e da concentração de triacetina. Sobral (1999) verificou que a elevação da concentração de plastificante de 30 para 100%, provocou aumento de 1,8 para 8,5% na porcentagem de alongação dos filmes de gelatina. Yoshida (2002) notou efeito semelhante em relação aos filmes de proteína de soro de leite bovino.

A melhor formulação de filmes de gelatina, determinada neste caso, visando manter boas propriedades de barreira ao vapor de água e resistência mecânica, foi a elaborada com 10% de gelatina e 5% de glicerol. Essa formulação

foi selecionada para ser utilizada na elaboração e caracterização dos filmes compostos.

4.2 Caracterização dos filmes à base de glúten e glicerol

Um delineamento experimental composto central rotacional foi realizado contendo 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, perfazendo um total de 17 ensaios. Os valores correspondentes aos diferentes níveis das variáveis são apresentados na Tabela 4.4.

As variáveis independentes analisadas foram: (i) concentração de glúten (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5 g/100mL de solução); (ii) concentração de etanol (20; 32,5; 45; 57,5 e 70 mL/100mL de solução); (iii) pH (2; 3; 4; 5 e 6) (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992). As variáveis dependentes, isto é, as respostas analisadas, foram: (i) permeabilidade ao vapor de água; (ii) solubilidade em água; (iii) resistência à tração e (iv) porcentagem de alongação.

Tabela 4.4. Níveis das variáveis independentes do planejamento fatorial completo 2^3 usado para filmes de glúten plastificados com glicerol.

	-2	-1	0	+1	+2
Glúten (g/100Lde solução)	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5
Etanol (mL/100mL de solução)	20	32,5	45	57,5	70
pH	2	3	4	5	6

* O valor de α utilizado foi igual a 2, segundo Gontard, Guilbert; Cuq (1992).

Para essa caracterização, utilizaram-se diferentes alíquotas de solução formadora de filme para cada formulação (de 1 a 15, Tabela 4.5). Esse procedimento foi realizado com o intuito de controlar as espessuras para a repetibilidade das medidas e efeito das variáveis (concentração de glúten, etanol e pH) estudadas nas propriedades analisadas.

Para a escolha da alíquota utilizada em cada formulação, foram consideradas as concentrações de glúten. O aumento dessa concentração de 5 para 10% gerou a necessidade de utilizar alíquotas menores para padronizar a

espessura final dos filmes. Para a maior concentração de glúten (12,5%), a alíquota utilizada foi de 25 mL e para menor (2,5%) foi de 40 mL. As soluções formadoras de filmes secaram em média de 24 a 48 horas, esse tempo se relaciona às alíquotas utilizadas, sendo que ao se utilizarem maiores valores (40 mL) o tempo elevou-se, sendo maior ao utilizar menor concentração de glúten (2,5 g glúten/ 100 mL).

Tabela 4.5. Alíquotas utilizadas para cada formulação dos biofilmes de glúten e glicerol.

Formulação	Glúten (g/100 mL)	Etanol (mL/ 100 mL de solução)	pH	Alíquota (mL)
1	5	32,5	3	35
2	10	32,5	3	40
3	5	57,5	3	30
4	10	57,5	3	35
5	5	32,5	5	30
6	10	32,5	5	35
7	5	57,5	5	35
8	10	57,5	5	40
9	2,5	45	4	40
10	12,5	45	4	25
11	7,5	20	4	40
12	7,5	70	4	45
13	7,5	45	2	35
14	7,5	45	6	35
15	7,5	45	4	35

Os valores reais e codificados das 3 variáveis independentes (concentração de glúten, etanol e pH), bem como os resultados obtidos (permeabilidade ao vapor de água, solubilidade em água, resistência à tração e porcentagem de alongação) encontram-se na Tabela 4.6.

De uma maneira geral, os filmes elaborados com glúten e glicerol, em todas as variáveis estudadas (concentração de glúten, etanol e pH) apresentaram-se visualmente levemente amarelados e extensíveis.

Tabela 4.6. Delineamento experimental para a obtenção da elaboração de filmes à base de glúten plastificados com glicerol.

	Variáveis Independentes			Variáveis Dependentes			
	Glúten (g/100 mL) *	Etanol (mL/100mL) *	pH *	PVA (gmm/m ² diakPa)*	SOL (%)*	RT (MPa)*	ELO (%)*
1	5 (-1)	32,5 (-1)	3 (-1)	6,08 ± 0,26	23,83 ± 0,43	0,66 ± 0,17	150,55 ± 1,05
2	10 (+1)	32,5 (-1)	3 (-1)	12,72 ± 0,21	19,55 ± 0,13	0,90 ± 0,20	165,67 ± 1,00
3	5 (-1)	57,5 (+1)	3 (-1)	6,49 ± 0,24	23,79 ± 0,49	0,78 ± 0,26	167,72 ± 0,47
4	10 (+1)	57,5 (+1)	3 (-1)	9,11 ± 0,49	20,19 ± 0,42	1,20 ± 0,85	188,55 ± 0,33
5	5 (-1)	32,5(-1)	5 (+1)	6,28 ± 0,31	23,8 ± 0,22	0,45 ± 0,22	150,08 ± 0,81
6	10 (+1)	32,5 (-1)	5 (+1)	9,31 ± 0,55	20,55 ± 0,31	1,11 ± 0,34	164,36 ± 0,51
7	5 (-1)	57,5 (+1)	5 (+1)	8,19 ± 0,05	24,92 ± 0,54	0,77 ± 0,37	159,43 ± 0,30
8	10 (+1)	57,5 (+1)	5 (+1)	9,34 ± 0,26	21,46 ± 0,37	1,15 ± 0,58	171,23 ± 0,41
9	2,5 (-2)	45 (0)	4 (0)	5,44 ± 0,56	24,68 ± 0,41	0,36 ± 0,03	145,89 ± 0,62
10	12,5 (+2)	45 (0)	4 (0)	12,61 ± 0,03	18,86 ± 0,37	1,35 ± 0,45	190,83 ± 0,75
11	7,5 (0)	20 (-2)	4 (0)	9,61 ± 0,16	23,28 ± 0,54	0,82 ± 0,29	131,81 ± 0,26
12	7,5 (0)	70 (+2)	4 (0)	9,85 ± 0,38	20,27 ± 0,65	0,89 ± 0,47	159,11 ± 0,45
13	7,5 (0)	45 (0)	2 (-2)	10,14 ± 0,50	19,54 ± 0,24	1,27 ± 0,26	181,91 ± 0,25
14	7,5 (0)	45 (0)	6 (2)	9,81 ± 0,30	22,38 ± 0,42	1,09 ± 0,33	166,66 ± 0,70
15	7,5 (0)	45 (0)	4 (0)	8,81 ± 0,42	21,29 ± 0,22	0,75 ± 0,02	178,11 ± 0,93
16	7,5 (0)	45 (0)	4 (0)	8,26 ± 0,36	22,18 ± 0,24	0,81 ± 0,31	177,01 ± 0,50
17	7,5 (0)	45 (0)	4 (0)	8,68 ± 0,21	21,22 ± 0,49	0,84 ± 0,32	179,62 ± 0,62

Os valores entre parêntesis são os códigos dos níveis das variáveis independentes. * Média e erro padrão das replicatas. Onde: PVA é a permeabilidade ao vapor de água; SOL é a solubilidade em água; RT é a resistência à tração e ELO é a porcentagem de alongação.

4.2.1 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Na Tabela 4.7, estão apresentados os efeitos dos parâmetros estudados (concentração de glúten, etanol e pH) sobre a permeabilidade ao vapor de água. Verifica-se que a variável concentração de glúten, interação entre glúten e etanol, glúten e pH e etanol e pH influenciaram estaticamente a permeabilidade ao vapor de água a 95% de confiança. Verifica-se que o efeito concentração de glúten é positivo, ou seja, ao elevar a concentração de glúten de 5 para 10 g/100mL, o biofilme sofreu um aumento na permeabilidade ao vapor de água de 3,47 gmm/m²diakPa, em média. Apesar da variável concentração de glúten apresentar um efeito positivo, a sua combinação com etanol ou pH apresentou um efeito negativo, gerando diminuição na permeabilidade ao vapor de água, em média, de 1,47 e 1,27 gmm/m²diakPa, respectivamente. Enquanto a combinação entre concentração de etanol e pH apresentou efeito positivo, aumentando a permeabilidade ao vapor de água em 1,28 gmm/m²diakPa.

Tabela 4.7. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre a permeabilidade ao vapor de água dos filmes de glúten plastificados com glicerol.

Fator	Efeito	Erro padrão	p-valor
Média	8,2743*	0,4321	0,0000
Glúten (L)	3,4725*	0,3916	0,0000
Glúten (Q)	0,1435	0,3559	0,6987
Etanol (L)	-0,9750	0,3916	0,8105
Etanol (Q)	0,4960	0,3559	0,2060
pH (L)	-0,2425	0,3916	0,5554
pH (Q)	0,6185	0,3559	0,1258
Glúten x Etanol	-1,4750*	0,5539	0,0323
Glúten x pH	-1,2700*	0,5539	0,0555
Etanol x pH	1,2850*	0,5539	0,05340

* Efeitos estatisticamente significativos a $p \leq 0,05$

Realizando a comparação entre os efeitos dos fatores e suas interações (Tabela 4.7), observa-se que a concentração de glúten apresentou maior efeito sobre a permeabilidade ao vapor de água. Gontard; Guilbert e Cuq (1992) estudaram os efeitos da concentração de glúten, concentração de etanol e pH da solução formadora de filme em diversas propriedades, utilizando metodologia de superfície de resposta. Os autores perceberam que a elevação da concentração de etanol, em $\text{pH} > 4$, causou aumento da permeabilidade ao vapor de água, o que ocorreu em virtude da maior heterogeneidade dos filmes nas baixas concentrações de etanol. Em altas concentrações de etanol, baixo pH é requerido para obter-se uma estrutura homogênea dos filmes, pois, caso contrário, ocorre a exposição dos resíduos hidrofílicos da superfície das proteínas, o que melhora a afinidade de moléculas de vapor de água com as proteínas do glúten, que gera o aumento da permeabilidade ao vapor de água. Tanada-Palmu e Grosso (2002) estudaram o efeito da concentração de glúten, glicerol, etanol e pH em diversas propriedades dos biofilmes de glúten. Os autores verificaram aumento da permeabilidade proporcionalmente à elevação da concentração de etanol e glicerol.

A permeabilidade ao vapor de água dos filmes desenvolvidos variou de 5,44 a 12,72 $\text{gmm/m}^2\text{diakPa}$. Resultados semelhantes foram encontrados por Tanada-Palmu e Grosso (2002), que obtiveram resultados variando de 5,72 a 14,91 $\text{gmm/m}^2\text{diakPa}$. Tanada-Palmu e Grosso (2003) desenvolveram filmes à base de glúten proveniente de quatro tipos de farinhas de trigo brasileira (2 “fortes” e 2 “fracas”) e compararam suas propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água com filmes de glúten vital (comercial). A permeabilidade ao vapor de água variou de 5,72 a 14,65 $\text{gmm/m}^2\text{diakPa}$, sendo menor para os filmes desenvolvidos com glúten vital e maior para os filmes das farinhas “fracas”.

Após análise dos efeitos principais e das interações, obteve-se os coeficientes de regressão do modelo de 2ª ordem para a permeabilidade ao vapor de água (Tabela 4.8).

Tabela 4.8. Coeficiente de regressão do modelo quadrático multivariável para a permeabilidade ao vapor de água em filmes de glúten e glicerol.

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	p-valor
Média	8,2743*	0,4321	0,0000
Glúten (L)	1,7336*	0,1958	0,0000
Glúten (Q)	0,0717	0,1779	0,6987
Etanol (L)	-0,0487	0,1958	0,8105
Etanol (Q)	0,2480	0,1779	0,2060
pH (L)	-0,1212	0,1958	0,5554
pH (Q)	0,3092	0,1779	0,1258
Glúten x Etanol	-0,7375*	0,2769	0,0323
Glúten x pH	-0,6350*	0,2769	0,0555
Etanol x pH	0,6425*	0,2769	0,0534

*Coeficientes estatisticamente significativos a $p \leq 0,05$.

Utilizando-se os valores contidos na Tabela 4.8, obteve-se o modelo estatístico adotado (Equação 4.1) que relaciona a permeabilidade ao vapor de água às variáveis estudadas que apresentaram coeficiente de regressão estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$).

$$\begin{aligned} \text{PVA} = & 8,2743 + 1,7362 * \text{glúten} - 0,7375 \text{ glúten} * \text{etanol} - 0,6350 \text{ glúten} * \text{pH} \\ & + 0,6425 \text{ etanol} * \text{glúten} \end{aligned} \quad [4.1]$$

A análise de variância (ANOVA) obtida pelo ajuste dos dados ao modelo da Equação 4.1 é mostrada na Tabela 4.9. Pode-se observar que o modelo alcançado apresentou um coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,89. Comparando-se o F calculado (25,48) com o F tabelado (3,26), verificou-se que o primeiro é 7,81 vezes maior que o segundo, sendo o modelo, portanto, estatisticamente significativo, com o qual pode se obter as superfícies de resposta.

Tabela 4.9. ANOVA do ajuste do modelo obtido para a permeabilidade ao vapor de água dos filmes de glúten plastificados com glicerol.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Media Quadrática	F calculado	F tabelado	R²
Regressão	59,12	4	14,78	25,48	3,26	0,89
Resíduo	6,96	12	0,58			
Falta de ajuste	6,80	10				
Erro Puro	0,16	2				
Total	66,08	16				

As superfícies de respostas e curvas de contorno, obtidas a partir do modelo estatístico, estão apresentada nas Figuras 4.1 a 4.3. Na Figura 4.1, verificou-se que, com a diminuição da concentração de proteína (de 10,0 para 5,0%) e a diminuição da concentração de etanol (de 70 para 32,5 mL), a permeabilidade ao vapor de água se reduziu. O mesmo pode ser observado (Figura 4.2) com a diminuição do pH (de 6 para 3) e da concentração de glúten (de 10,0 para 5,0%). Analisando a Figura 4.3, conclui-se que, para obter-se menores valores de permeabilidade ao vapor de água, deve-se utilizar pH entre 4 e 6 e concentrações de etanol acima de 45 mL.

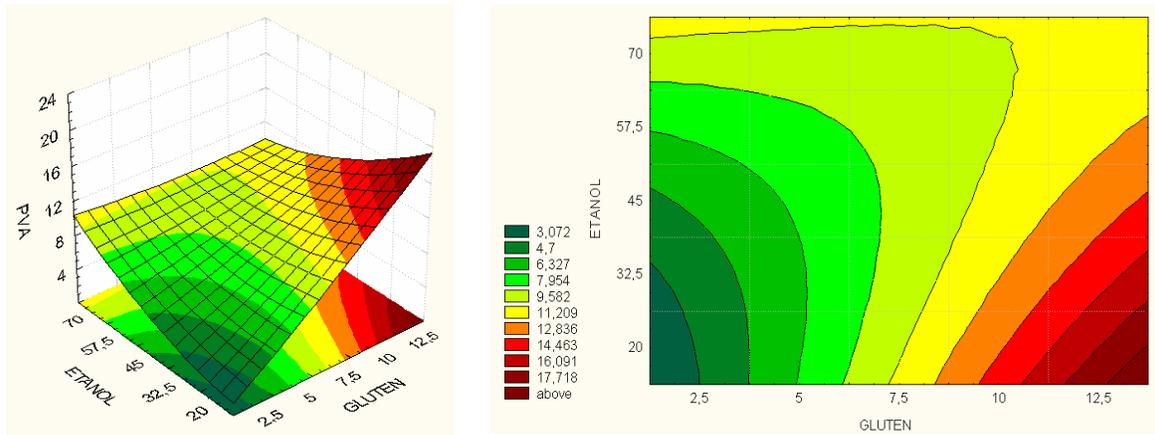


Figura 4.1. Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da permeabilidade ao vapor de água em função da concentração de glúten e etanol.

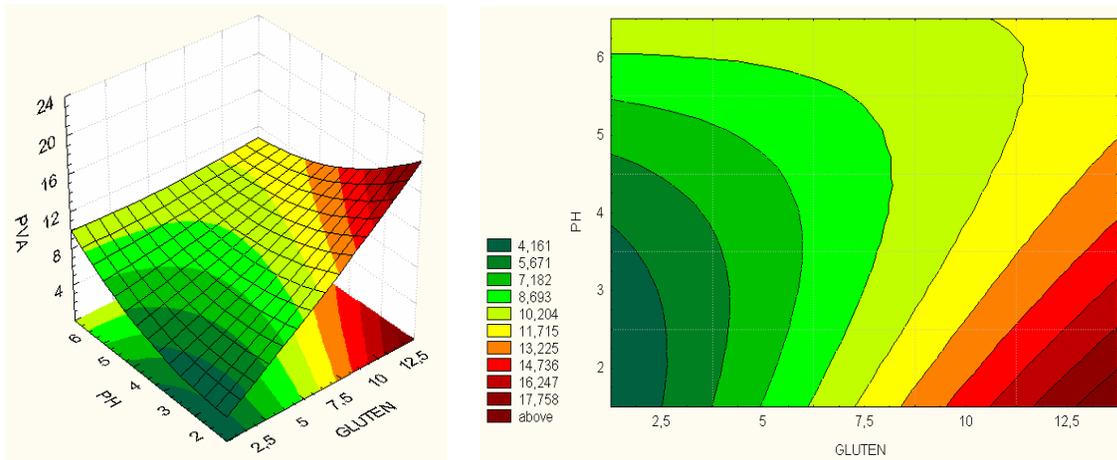


Figura 4.2. Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da permeabilidade ao vapor de água em função da concentração de glúten e pH.

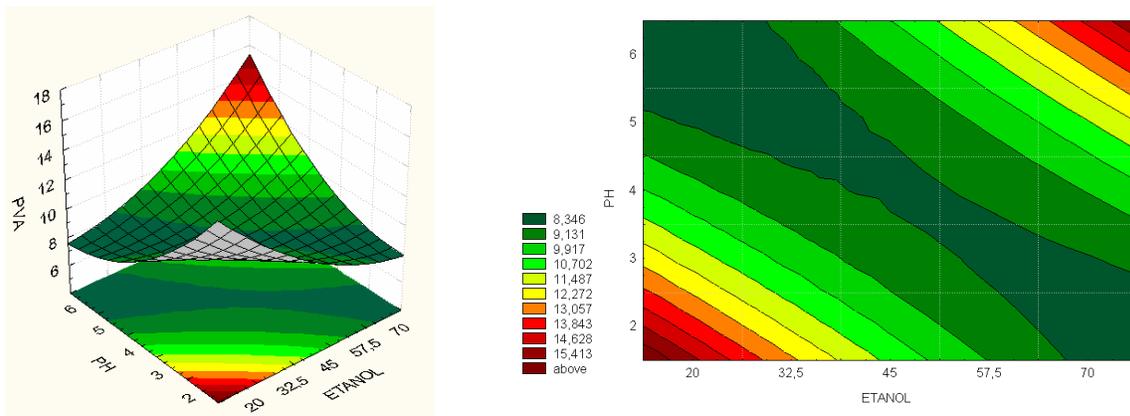


Figura 4.3. Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da permeabilidade ao vapor de água em função da concentração de etanol e pH.

4.2.2 Solubilidade em água (SOL)

Na Tabela 4.10, estão estimados os efeitos das variáveis independentes (concentração de glúten, concentração de etanol e pH) e suas interações sobre a resposta solubilidade em água. Pode-se observar que a única variável significativa ($p \leq 0,05$) foi a concentração de glúten, causando um efeito negativo, ou seja, com o aumento da concentração ocorreu a diminuição na solubilidade em água dos filmes, da ordem de 3,27%.

Tabela 4.10. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre a solubilidade em água dos filmes de glúten plastificados com glicerol.

Fator	Efeito	Erro padrão	p-valor
Média	21,8221*	0,6092	0,0000
Glúten (L)	-3,2787*	0,5521	0,0005
Glúten (Q)	0,1680	0,5018	0,7475
Etanol (L)	-0,4237	0,5521	0,4679
Etanol (Q)	0,1705	0,5018	0,7439
pH (L)	1,1312	0,5521	0,0796
pH (Q)	-0,2369	0,5018	0,6511
Glúten x Etanol	0,1175	0,7808	0,8846
Glúten x pH	0,2925	0,7808	0,7190
Etanol x pH	0,3575	0,7808	0,6609

* Efeitos estatisticamente significativos a $p \leq 0,05$.

Gontard, Guilbert e Cuq (1992), em estudos com filmes de glúten, relataram que ao utilizar maiores concentrações de etanol (70%) obtiveram maiores valores de solubilidade em água. Este efeito foi mais pronunciado ao trabalhar na faixa de pH entre 5 e 6. Os autores relataram que a alta concentração de etanol induz à formação de filmes heterogêneos, que podem ser desintegrados completamente e rapidamente ao serem dispersos em água. Tanada-Palmu e Grosso (2002) não observaram influência significativa ($p \leq 0,05$) em nenhuma das variáveis estudadas (concentração de glúten, de etanol, de glicerol e pH) na solubilidade em água.

A diminuição na solubilidade em água do filme protéico está associada a uma estrutura mais compacta e resistente, indicando um maior número de ligações entre cadeias, ou seja, uma matriz tridimensional mais resistente. Quanto maior o número de grupos SH, mais ligações dissulfídicas são formadas durante a secagem do filme, dificultando, dessa forma, o acesso das moléculas de água aos grupos hidrofílicos das cadeias, reduzindo a solubilidade (HANDA et al., 1999).

Os coeficientes de regressão obtidos, utilizando-se o programa Statistica 5.0, estão apresentados na Tabela 4.11. São significativos a 95% de confiança ($p \leq 0,05$) e foram considerados para a obtenção do modelo estatístico para a solubilidade em água (Equação 4.2).

Tabela 4.11. Coeficiente de regressão do modelo quadrático multivariável para a solubilidade em água.

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	p-valor
Média	21,8221*	0,6029	0,0000
Glúten (L)	-1,6393*	0,2760	0,0005
Glúten (Q)	0,0840	0,2509	0,7475
Etanol (L)	-0,2118	0,2760	0,4679
Etanol (Q)	0,0852	0,2509	0,7439
pH (L)	0,5656	0,2760	0,0796
pH (Q)	-0,1184	0,2509	0,6511
Glúten x Etanol	0,0587	0,3904	0,8846
Glúten x pH	0,1462	0,3904	0,7190
Etanol x pH	0,1787	0,3904	0,6609

* Coeficientes estatisticamente significativos a $p \leq 0,05$.

$$\text{SOL} = 21,8221 - 1,6393 * \text{glúten} \quad [4.2]$$

A análise de variância (ANOVA) obtida pelo ajuste dos dados ao modelo da Equação 4.2 é apresentada na Tabela 4.12. Verifica-se um coeficiente de correlação (R^2) de 0,73, e por meio do teste F, conferiu-se a significância

estatística ($p \leq 0,05$) do modelo à solubilidade em água. Comparando-se o F calculado (41,34) com o F tabelado (4,54), notou-se que o primeiro é 9,10 vezes que maior que o segundo. A partir do modelo obtido, pode-se gerar as superfícies de respostas em função das variáveis significativas, tal como apresentado nas Figuras 4.4 a 4.6.

Tabela 4.12. ANOVA do ajuste do modelo obtido para a solubilidade em água dos filmes de glúten plastificados com glicerol.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado	R ²
Regressão	43,00	1	43,00	41,34	4,54	0,73
Resíduo	15,71	15	1,04			
Falta de ajuste	15,14	13				
Erro Puro	0,57	2				
Total	58,71	16				

A relação entre a concentração de glúten e a de etanol pode ser observada na Figura 4.4. A região de valores de concentração de proteína, entre 10 e 12,5, e de etanol, em toda faixa estudada (20 a 70 mL/100 mL de solução), apresentou menor solubilidade. Na Figura 4.5, verifica-se que, na região entre os valores da concentração de glúten de 10 a 12,5% e valores de pH 2 a 3, os filmes também apresentaram menor solubilidade em água. Com relação à concentração de etanol e pH, pode ser observado (Figura 4.6) que a região entre valores de etanol de 45 a 70 mL/100 mL de solução e pH 2 definiu menores valores de solubilidade dos filmes.

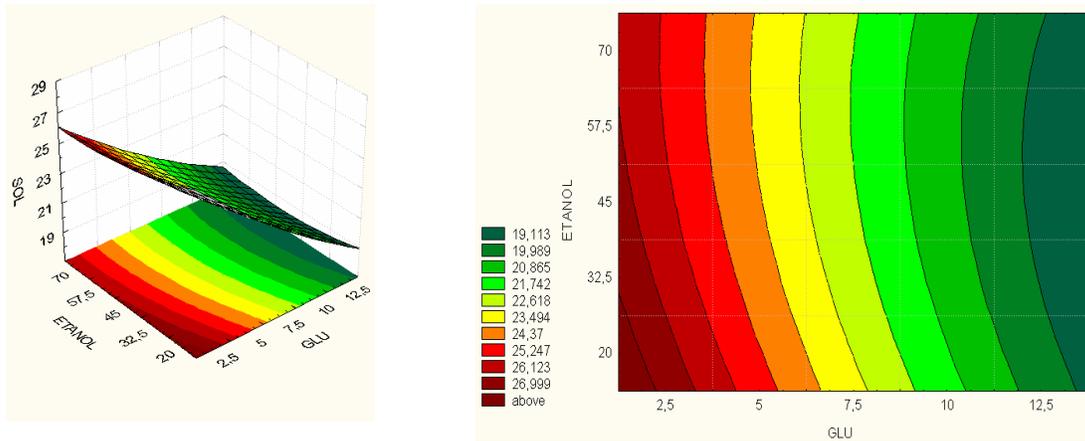


Figura 4.4. Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da solubilidade em água em função da concentração de glúten e etanol.

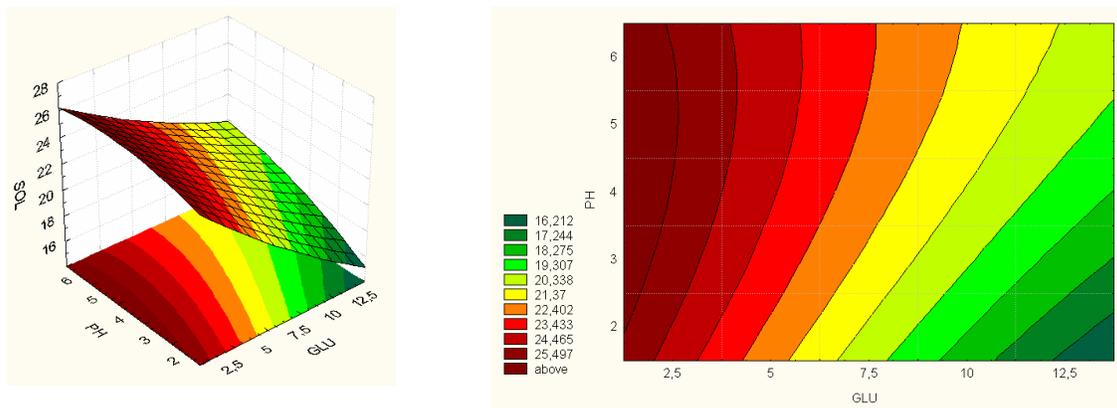


Figura 4.5. Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da solubilidade em água em função da concentração de glúten e pH.

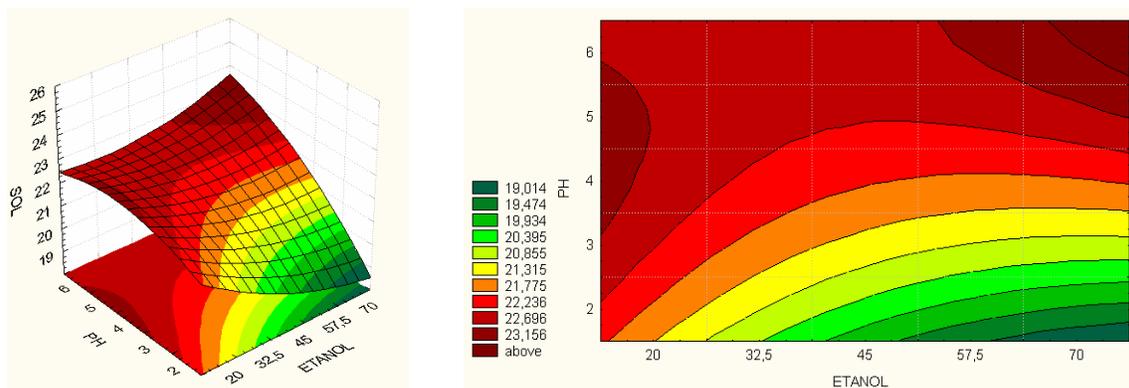


Figura 4.6. Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da solubilidade em água em função da concentração de etanol e pH.

4.2.3 Propriedades mecânicas

4.2.3.1 Resistência à tração (RT)

Os valores dos efeitos: (i) concentração de glúten, (ii) concentração de etanol e (iii) pH na resistência à tração estão apresentados na Tabela 4.13. Os efeitos dessas variáveis são estatisticamente significativos a 95% de confiança.

Tabela 4.13. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre a resistência à tração dos filmes de glúten plastificados com glicerol.

Fator	Efeito	Erro padrão	p- valor
Média	0,7843*	0,0571	0,0000
Glúten (L)	0,4600*	0,0518	0,0000
Glúten (Q)	0,0235	0,0471	0,6319
Etanol (L)	0,1150*	0,0518	0,0620
Etanol (Q)	0,0235	0,0471	0,6319
pH (L)	-0,0525	0,0518	0,3448
pH (Q)	0,1860*	0,0471	0,0055
Glúten x Etanol	-0,0250	0,0733	0,7430
Glúten x pH	0,0950	0,0733	0,2360
Etanol x pH	-0,0150	0,0733	0,8436

* Efeitos estatisticamente significativos a $p \leq 0,05$.

Ao elevar a concentração de glúten de 5,0 para 10,0%, e de etanol de 32,5 para 57,5%, a resistência à tração sofreu um aumento, em média, de 0,4600 e 0,1150 MPa, respectivamente. Por outro lado, ao aumentar o pH de 2 para 6, houve um aumento na RT de 0,1860 MPa, em média.

Gontard, Guilbert e Cuq (1992) verificaram a influência da concentração de glúten nas propriedades mecânicas dos filmes, concluindo que o aumento na quantidade de glúten eleva a resistência à tração. Os autores afirmam que, durante a secagem dos filmes, o ácido acético e o etanol evaporam, permitindo a formação de ligações cruzadas entre as cadeias, sendo que essa formação é

facilitada pela proximidade das cadeias em maiores concentrações de glúten. Observaram também que a diminuição do pH (menor que 4) acarretou um decréscimo nas propriedades mecânicas dos filmes em virtude da perda da coesividade da estrutura.

Tanada-Palmu e Grosso (2002) também verificaram que, ao aumentar a concentração de glúten de 6,0 para 9,0%, ocorreu uma elevação da resistência à tração do biofilme. Yoshida (2002) observou que um aumento na concentração de proteína 5,50 para 7,50% gerou elevação na tensão na ruptura da ordem de 0,4493 MPa.

A resistência à tração dos filmes de glúten desenvolvidos variou de 0,45 a 1,27 MPa. Resultados similares foram obtidos por Micard et al. (2000) em estudo da influência da agitação e vários tratamentos químicos e físicos em filmes de glúten. Os autores obtiveram filmes de glúten com resistência à tração, variando de 1,2 a 6,3 MPa, e alongação de 170 a 501%. Kayserilioglu et al. (2003) estudaram o efeito da temperatura de secagem dos filmes (20, 50 e 80°C) e da umidade relativa de secagem (35 e 70%) nas propriedades mecânicas dos filmes de glúten e observaram que, ao aumentar a temperatura, ocorreu elevação da resistência à tração (4,5 MPa/20°C, 6,3 MPa/50°C, 8,2 MPa/80°C), sendo maior em menor teor de umidade (35%). Esse comportamento explica-se pela formação de ligações cruzadas (ligações covalentes) durante a secagem em altas temperaturas (80°C). Kayserilioglu et al. (2001), em estudo da caracterização mecânica e bioquímica de filmes de glúten em função do pH, desenvolveram filmes de glúten com resistência à tração de 1,7 a 5,2 MPa, sendo maior a pH 11.

Gennadios et al. (1993) investigaram o efeito do pH nas propriedades de barreira e mecânicas dos filmes de glúten. Observaram variação da resistência à tração de 0,7 a 4,4 MPa. Os filmes de glúten de trigo se formaram a pH 2-4 e 9-13, sendo que essa formação foi inibida pela fraca dispersão protéica ao redor do ponto isoelétrico da proteína (pI igual a 7,6). Os filmes de glúten preparados em condições alcalinas apresentam resistência à tração maior que os filmes processados em condições ácidas. Tanada-Palmu e Grosso (2002)

desenvolveram filmes de glúten plastificado com glicerol em condições alcalinas, que apresentaram resistência à tração de 0,42 a 5,38 MPa.

Os coeficientes de regressão obtidos por meio do programa Statistica 5.0 estão apresentados na Tabela 4.14. São estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p \leq 0,05$) e foram considerados para a obtenção do modelo final.

Tabela 4.14. Coeficiente de regressão do modelo quadrático multivariável para RT.

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	p-valor
Media	0,7843*	0,0571	0,0000
Glúten (L)	0,2300*	0,0259	0,0000
Glúten (Q)	0,0117	0,0235	0,6319
Etanol (L)	0,0575*	0,0259	0,6200
Etanol (Q)	0,0117	0,0235	0,6319
pH (L)	-0,0265	0,0259	0,3448
pH (Q)	0,0930*	0,0235	0,0055
Glúten x Etanol	-0,0125	0,0366	0,7430
Gluten x pH	0,0475	0,0366	0,2360
Etanol x pH	-0,0075	0,0366	0,8436

* Coeficientes estatisticamente significativos a $p \leq 0,05$.

$$RT = 0,7843 + 0,2300 * \text{glúten} + 0,0575 * \text{etanol} + 0,0930 * \text{pH}^2 \quad [4.3]$$

A análise de variância (ANOVA), obtida pelo ajuste dos dados ao modelo da Equação 4.3, está apresentada na Tabela 4.15. Verifica-se um coeficiente de correlação (R^2) de 0,90. Por meio do teste de F, conferiu-se a significância do modelo, pois o F calculado (45,25) foi 13,26 vezes maior que o F tabelado (3,41). A partir do modelo obtido, pode-se gerar as superfícies de resposta e suas respectivas curvas de contorno em função das variáveis estudadas.

Tabela 4.15. ANOVA do ajuste do modelo obtido para resistência à tração dos filmes de glúten plastificados com glicerol.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado	R²
Regressão	1,086	3	0,362	45,25	3,41	0,90
Resíduo	0,109	13	0,008			
Falta de ajuste	0,105	11				
Erro Puro	0,004	2				
Total	1,195	16				

A influência da concentração de glúten, de etanol e pH na resistência à tração dos filmes de glúten pode ser analisada nas Figuras 4.7 a 4.9. Pode-se observar que a resistência à tração foi maior utilizando altas concentrações de glúten (acima de 10%), em todas as faixas de etanol (20 a 70 mL) e pH (2 a 6) (Figuras 4.7 e 4.8). Verifica-se, na Figura 4.9, que os filmes de glúten apresentaram maior resistência à tração na região entre valores de etanol superiores a 57,5 mL e pH 2 e 6.

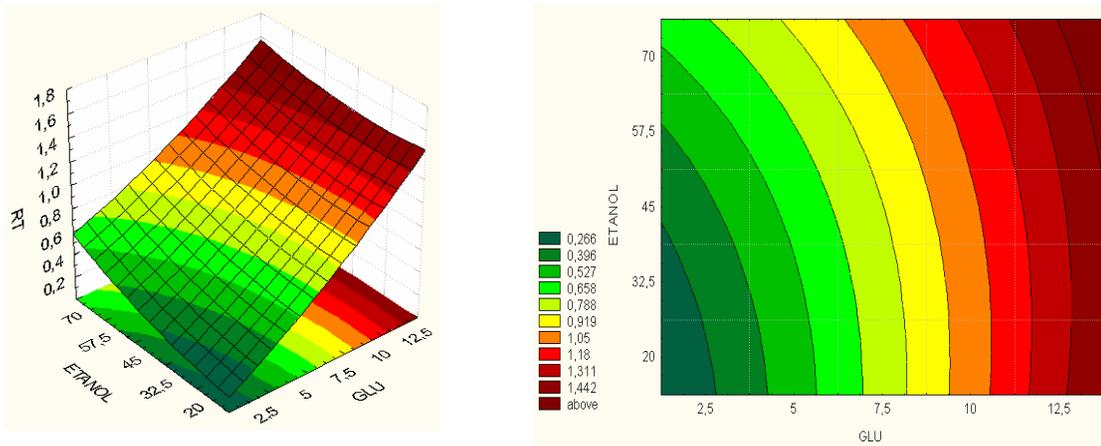


Figura 4.7 Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da resistência à tração em função da concentração de glúten e etanol.

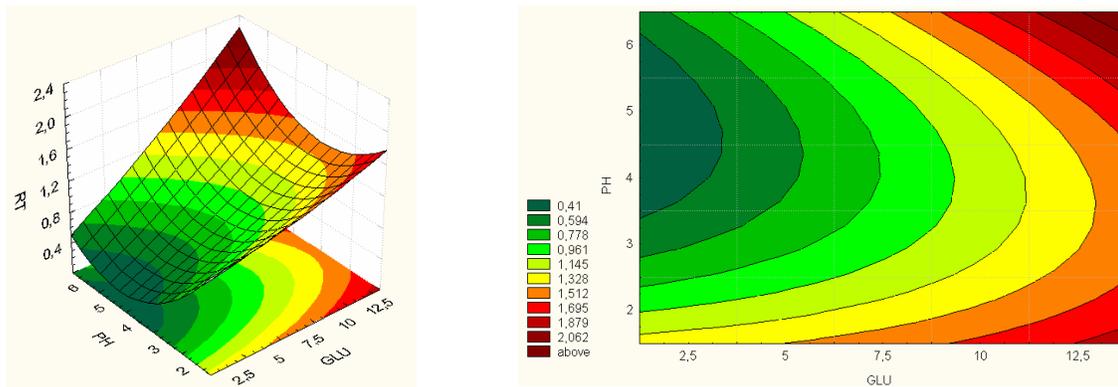


Figura 4.8. Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da resistência à tração em função da concentração de glúten e pH.

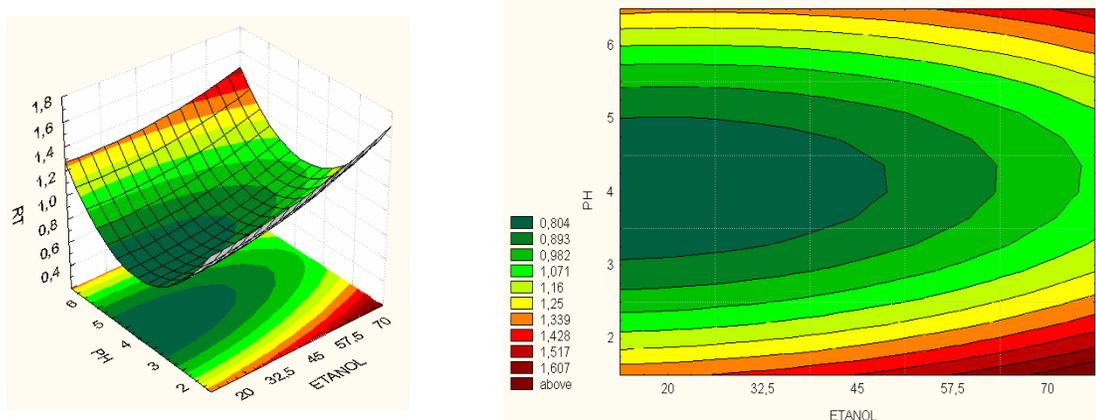


Figura 4.9. Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da resistência à tração em função da concentração de etanol e pH.

4.2.3.2 Elongação

Os valores dos efeitos das variáveis independentes estudadas sobre a porcentagem de alongação (ELO) são apresentados na Tabela 4.16. Verifica-se, com 95% de confiança, que a concentração de glúten linear e quadrática, concentração de etanol linear e quadrática, pH linear e a interação entre etanol e pH apresentaram um efeito estatisticamente significativo sobre a porcentagem de alongação. As concentrações de glúten e de etanol apresentaram um efeito positivo, ou seja, ao elevar-se de 5% para 10,0% (glúten) e de 32,5 para 57,2 mL (etanol), a ELO elevou-se, em média, de 19 e 14%, respectivamente. Entretanto, ao aumentar o pH de 3 para 5, a porcentagem de alongação diminuiu em média 7,2%. O efeito da interação entre concentração de etanol e pH reduziu a porcentagem de alongação em média 6%, em média.

Tabela 4.16. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre a porcentagem de alongação dos filmes de glúten plastificados com glicerol.

Fator	Efeito	Erro padrão	p-valor
Média	177,589*	0,7228	0,0000
Glúten (L)	18,9888*	0,6551	0,0011
Glúten (Q)	-5,1076*	0,5954	0,0133
Etanol (L)	13,8588*	0,6551	0,0022
Etanol (Q)	-16,5576*	0,5954	0,0012
pH (L)	-7,2363*	0,6551	0,0080
pH (Q)	-2,1451	0,5954	0,0691
Glúten x Etanol	0,8075	0,9265	0,4753
Glúten x pH	-2,4675	0,9265	0,1168
Etanol x pH	-5,9575*	0,9265	0,0234

* Efeitos estatisticamente significativos a $p \leq 0,05$.

Yoshida (2002), em estudo com filmes de proteína do soro do leite, verificou que a elevação da concentração de proteína de 5,50 para 7,50% causou um aumento na porcentagem de alongação de 5,89%. O mesmo comportamento foi

observado variando-se o pH de 5,90 para 7,90 e a concentração de glicerol de 2,50 para 4,50%, que aumentaram a porcentagem de alongação em 26,9% e 16,4%, respectivamente. A autora explicou que para altas concentrações de proteínas uma maior quantidade de grupos SH são adicionados, promovendo mais ligações covalentes S-S, formando filmes mais estáveis e com maior capacidade de alongar-se.

Gontard, Guilbert e Cuq (1992) notaram que, ao utilizar alta concentração de glúten (12,5g/100mL) e pH 6, os filmes de glúten obtidos eram muito elásticos. Tanada-Palmu e Grosso (2002), trabalhando com filmes de glúten com glicerol, alcançaram valores de porcentagem de alongação semelhantes aos deste estudo. Eles observaram que a porcentagem de alongação aumenta com a elevação da concentração de glúten (6 para 9%), ao se utilizar 32,5 mL de etanol.

Os coeficientes de regressão obtidos pelo programa Statistica 5.0 estão apresentados na Tabela 4.17. São estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p \leq 0,05$) e foram considerados para a obtenção do modelo final.

Tabela 4.17. Coeficiente de regressão do modelo quadrático multivariável para porcentagem de alongação.

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	p- valor
Média	177,5896*	0,7228	0,0000
Glúten (L)	9,4944*	0,3275	0,0011
Glúten (Q)	-2,5538*	0,2977	0,0133
Etanol (L)	6,9294*	0,3275	0,0222
Etanol (Q)	-8,2788*	0,2977	0,0012
pH (L)	-3,6181*	0,3275	0,0080
pH (Q)	-1,0726	0,2977	0,0691
Glúten x Etanol	0,4038	0,4632	0,4753
Glúten x pH	-1,2338	0,4632	0,1168
Etanol x pH	-2,9788*	0,4632	0,0233

* Coeficientes estaticamente significativos a $p \leq 0,05$.

$$\text{ELO} = 177,5896 + 9,4944 \cdot \text{glúten} - 2,5538 \cdot \text{gluten}^2 + 6,9294 \cdot \text{etanol} - 8,2788 \cdot \text{Etanol}^2 - 3,6181 \cdot \text{pH} - 2,9788 \cdot \text{etanol} \cdot \text{pH} \quad [4.4]$$

A Tabela 4.18 apresenta a análise de variância (ANOVA) da Equação 4.4. Pode-se observar que o modelo obtido apresentou um bom coeficiente de correlação ($R^2=0,97$). Comparando-se o F calculado (58,29) com o F tabelado (3,22), verificou-se que o primeiro é cerca de 18,10 vezes maior que o segundo, sendo o modelo, portanto, estatisticamente preditivo e significativo, com o qual pode-se obter as superfícies de resposta (Figuras 4.10 a 4.12).

Tabela 4.18. ANOVA do ajuste do modelo obtido para a porcentagem de alongação dos filmes de glúten plastificados com glicerol.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado	R ²
Regressão	3907,00	6	651,16	58,29	3,21	0,97
Resíduo	111,72	10	11,17			
Falta de ajuste	108,29	8				
Erro Puro	3,43	2				
Total	4018,72	16				

A análise da superfície de resposta e curvas de nível permitiu uma melhor visualização do efeito das variáveis na porcentagem de alongação, nas condições e intervalos utilizados neste estudo. Na Figura 4.10, verifica-se o efeito provocado pela concentração de glúten e de etanol. A porcentagem de alongação é maior na faixa de concentração de proteína entre 7,5 e 12,5% e etanol de 32,5 e 57,5 mL. O efeito da concentração de proteína e pH na porcentagem de alongação pode ser analisado pela Figura 4.11. Ao trabalhar com concentrações de glúten superiores a 7,5%, pode-se utilizar valores de pH em toda faixa estudada para obter-se filmes com altos valores de porcentagem de alongação. O mesmo pode ser observado entre a concentração de etanol e o pH e, na faixa de 45 a 57,5 mL de etanol, pode-se utilizar toda faixa de pH estudada (Figura 4.12).

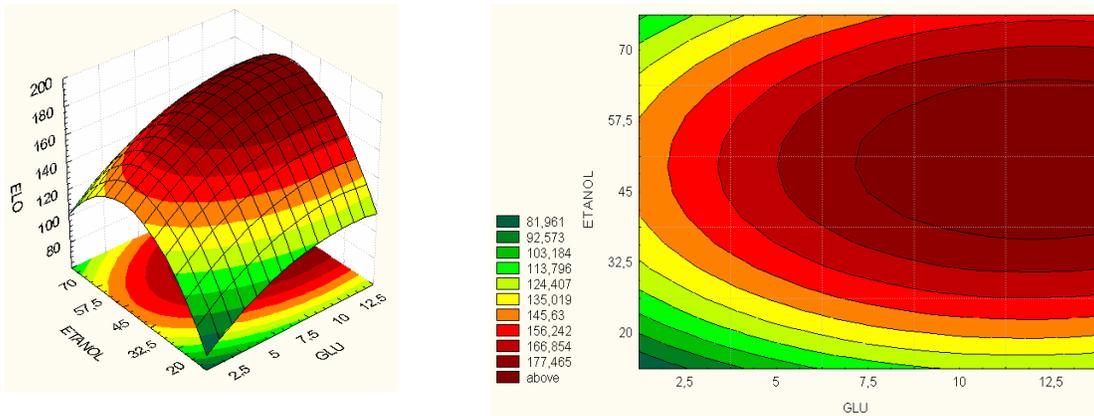


Figura 4.10 Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da porcentagem de alongação em função da concentração de glúten e etanol.

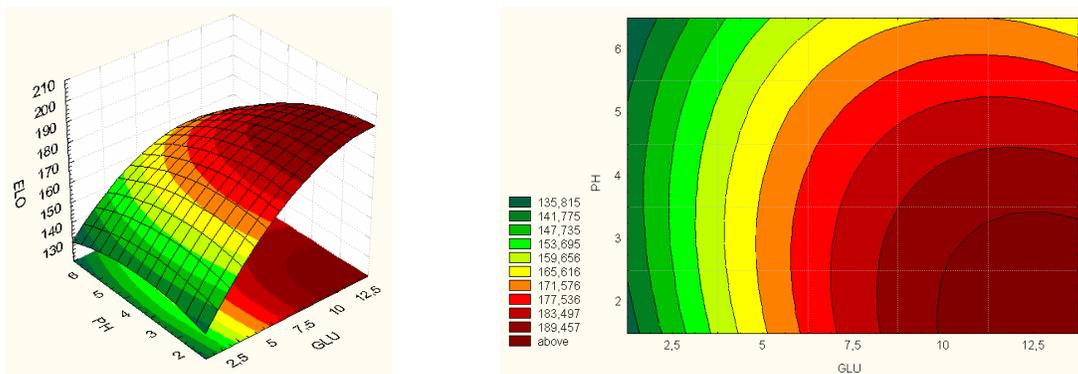


Figura 4.11. Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da porcentagem de alongação em função da concentração de glúten e pH.

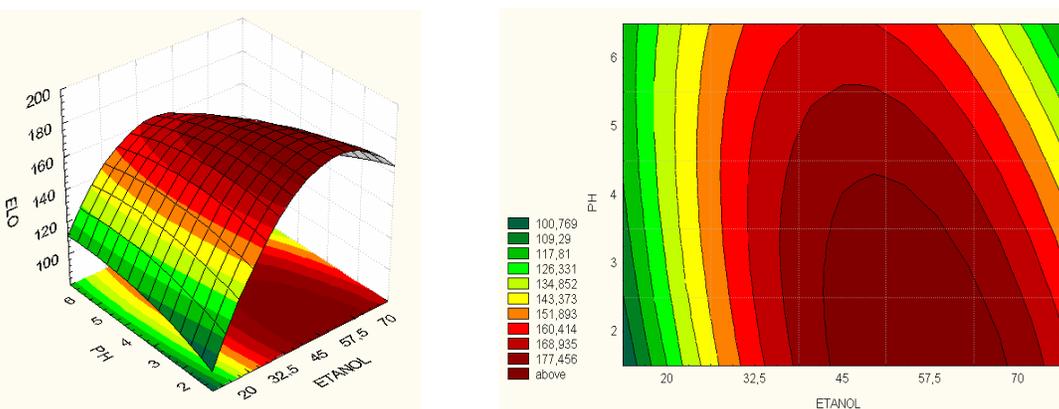


Figura 4.12. Superfície de resposta e respectiva curva de contorno da variação da porcentagem de alongação em função da concentração de etanol e pH.

4.2.4 Otimização das características físicas

O planejamento fatorial permitiu selecionar a melhor formulação de filme de glúten plastificado com glicerol, com a finalidade de obter um filme com baixa permeabilidade ao vapor de água e alta resistência à tração.

Gontard, Guilbert e Cuq (1992) afirmaram que em vez de determinar um ponto ótimo para as superfícies de respostas, é melhor escolher combinações de formulação baseada nas características desejadas para seu uso específico. Por exemplo, se o filme for utilizado em coberturas superficiais para manusear o produto, as propriedades principais para otimizar são as mecânicas e a aparência. Porém, se for usado como barreira ao vapor de água entre dois componentes de produtos alimentícios heterogêneos, é necessário um filme com a mais baixa permeabilidade ao vapor de água.

Em virtude do exposto, optou-se por combinar formulações com o intuito de obter-se filmes com menores valores de permeabilidade ao vapor de água e maiores de resistência à tração. Por meio do planejamento fatorial, foi possível verificar que, para as propriedades desejadas, as variáveis se comportaram de maneira oposta. As variáveis significativas para a permeabilidade ao vapor de água foram: (i) concentração de glúten (efeito positivo), (ii) interação entre concentração de glúten e de etanol (efeito negativo), (iii) interação entre concentração de glúten e pH (efeito negativo) e (iv) interação entre concentração de etanol e pH (efeito positivo). As variáveis expressivas para resistência à tração foram: (i) concentração de glúten (efeito positivo), (ii) concentração de etanol (efeito positivo) e (iii) pH (efeito positivo).

Os filmes de glúten desenvolvidos, de uma maneira geral, tiveram baixos valores de resistência à tração, sendo o maior valor de 1,27 MPa e, portanto, esta propriedade foi excluída como parâmetro de definição da melhor formulação, baseando-se a escolha somente na permeabilidade ao vapor de água.

A melhor formulação determinada, nesse caso, visando manter baixos valores de permeabilidade ao vapor de água, foi a concentração de glúten de 2,5 e 5 g/100 mL, concentração de etanol 20-32,5 ou 57,5-70 mL/100 mL e pH 2-3 e 5-6. Como para ajustar o pH da solução formadora de filme utiliza-se ácido acético, que exala um aroma muito forte durante o processo de secagem, optou-se por utilizar pH mais elevados (5-6), em razão da menor quantidade adicionada de ácido acético para o ajuste da solução.

Sendo assim, trabalhou-se com a seguinte formulação: glúten 2,5 e 5 g/100 mL, etanol 20 e 32,5 mL/100 mL e pH 5 e 6. As soluções formadoras de filme produzidas com 20 mL de etanol apresentaram pH próximo de 6, sendo necessário adicionar uma pequena quantidade de ácido acético para ajustar o pH para 6, quando a concentração de glúten era de 5 g, e nenhuma quantidade de ácido acético foi necessária quando a quantidade era igual a 2,5 g de glúten, pois o pH da solução era 6. As soluções nas quais o pH não foi ajustado não formaram filme. Isso ocorreu provavelmente em função da insolubilização da glutenina, que é insolúvel em etanol, ligeiramente em etanol à quente e solúvel em soluções alcalinas (KASARDA; NIMMO; KOHLER, 1971). As soluções com 5 g de glúten, às quais se adicionou maior quantidade de ácido acético formaram filmes extremamente frágeis que eram rompidos ao serem retirados do suporte, mesmo utilizando altas alíquotas (acima de 50 mL). Assim sendo, optou-se por fixar o pH em 5.

Portanto, foram elaborados filmes com 2,5 e 5 g de glúten/100 mL, concentração de etanol de 20 e 32,5 mL/100 mL e pH 5. Nas formulações desenvolvidas com 2,5g de glúten, foi utilizada a alíquota anteriormente estudada de 40 mL, mas os filmes obtidos se apresentaram frágeis. Dessa forma, testou-se alíquotas superiores (50 a 60 mL), o que provocou a formação de filmes extensíveis que sofriam deformações ao serem retirados do suporte. Além do inconveniente na retirada dos filmes do suporte, eles necessitavam, no mínimo, de 72 horas para secarem, principalmente ao utilizar a menor concentração de etanol (20 mL). Assim, foi descartada a concentração de glúten de 2,5 g.

Fixada a concentração de glúten, foram elaboradas duas formulações, com 5 g de glúten/100 mL de solução e variando o teor de etanol de 20 e 32,5 mL/100 mL, o pH constante e igual a 5. O filme desenvolvido com menor concentração de etanol demorou a secar e a alíquota precisou ser alterada, enquanto a outra formulação (idêntica à Formulação 5 do planejamento, Tabela 3.6) manteve-se nas mesmas condições, ou seja, alíquota de 30 mL e tempo de secagem de 24 horas.

A Formulação 5, que corresponde ao filme produzido com 5% de glúten, 32,5/100mL etanol, pH 5 e glicerol 20% (em relação à quantidade de proteína), em virtude da sua facilidade de obtenção (alíquota utilizada e tempo de secagem) e as suas propriedades, foi escolhida para a elaboração e caracterização de todos os filmes compostos.

4.3 Filmes simples à base de amido plastificados com glicerol

Os filmes simples à base de amido (mandioca, mandioca modificado, milho ceroso ou milho ceroso modificado) foram confeccionados a partir de solução formadora nas concentrações de 2 e 4%, plastificados com glicerol (5 e 10% em relação a massa seca de amido), e preparados com alíquotas variando de 20 a 35 mL. O plastificante foi incorporado à suspensão aquosa de amido antes de sua gelatinização em banho-maria, pois, com esse procedimento, observou-se (aparentemente) uma melhor incorporação do plastificante à matriz filmogênica. Larotonda et al. (2004), em biofilmes à base de fécula de mandioca, e Mali et al. (2002 e 2004), em biofilmes à base de amido de inhame, também adicionaram o plastificante antes do tratamento térmico da solução formadora de filme.

Os filmes de amidos, em todas as alíquotas estudadas, se mostraram levemente opacos, em alguns casos quebradiços (Figura 4.13) em outros extremamente aderidos às placas de acrílico, sobre as quais foram submetidos à secagem, não sendo possível a sua retirada.



Figura 4.13. Rachaduras no filme de amido após o processo de secagem.

Com a finalidade de facilitar o desprendimento dos filmes das placas de acrílico, foram avaliados: (i) o uso de *spray* de silicone e (ii) o aumento da alíquota da solução formadora de filme (40 a 80 mL). O silicone foi aplicado apenas nas bordas das placas, retirando-se seu excesso com papel absorvente. Mesmo assim, os filmes rachavam na tentativa de sua retirada do suporte. Os biofilmes resultantes mostraram-se muito desuniformes, como se o silicone aplicado tivesse interagido com a solução formadora, com conseqüente surgimento de bolhas muito grandes, chegando, muitas vezes, a transformar-se em perfurações. O aumento da alíquota não causou efeito no desenvolvimento dos filmes simples de amidos.

Em razão desses problemas detectados durante o desenvolvimento da pesquisa, não foi possível elaborar e caracterizar os filmes simples de amido de mandioca, de mandioca modificado, de milho ceroso e de milho ceroso modificado, plastificados com glicerol.

4.4 Filmes compostos

Os filmes simples que obtiveram melhores resultados, quanto às propriedades de permeabilidade ao vapor de água e resistência à tração, foram utilizados na confecção de filmes compostos. A solução formadora de filme de gelatina foi preparada com 10% de gelatina plastificada com 5% de glicerol, e a solução formadora de filme de glúten foi elaborada com 5% de glúten e 32,5 mL de etanol à pH 5, plastificada a 20% de glicerol. Como a caracterização dos filmes simples de amidos não foi possível, optou-se pela avaliação do efeito dos diferentes amidos diretamente nas propriedades dos filmes compostos.

Foram utilizadas alíquotas fixas de 20 mL para a confecção de todos os filmes compostos, a fim de se avaliar a influência da mistura das soluções formadoras nas diversas proporções estudadas (1:1, 1:4, 4:1 e 1:1:1) nas propriedades dos filmes. Essa alíquota foi selecionada por ser o menor volume necessário para formação dos filmes compostos.

4.4.1 Caracterização de filme composto de glúten e gelatina, plastificados com glicerol.

4.4.1.1 Aspecto visual

De um modo geral, os filmes elaborados com glúten e gelatina apresentaram-se manuseáveis e visualmente homogêneos.

4.4.1.2 Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água

Os valores de permeabilidade ao vapor de água dos filmes compostos de glúten e gelatina (Tabela 4.19) foram iguais a 3,91, 4,46 e 4,81 gmm/m²diakPa, para proporção de 1:1, 1:4 e 4:1, respectivamente. Não se observou diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os filmes. Os valores obtidos de permeabilidade ao vapor de água dos filmes compostos foram inferiores aos alcançados nos filmes

de gelatina pura (5,38 gmm/m²diakPa) e glúten puro (6,28 gmm/m²diakPa), ou seja, a combinação das duas proteínas propiciou uma melhora na permeabilidade ao vapor de água dos filmes. Baldwin et al. (1997) comentam que cada grupo dos materiais utilizados na formulação dos filmes tem suas vantagens e desvantagens, e muitas coberturas e filmes, atualmente, são produzidos por meio da sua combinação.

Tabela 4.19. Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água dos filmes de compostos glúten de trigo e gelatina, plastificados com glicerol (25°C).

Filmes	Proporções	Espessura (mm)	PVA (gmm/m ² diakPa)*	SOL (%)*
GLU/GEL	1:1	0,062 ± 0,009	3,91 ± 0,19 ^a	33,58 ± 0,29 ^a
GLU/GEL	1:4	0,058 ± 0,009	4,46 ± 0,28 ^a	30,20 ± 0,11 ^a
GLU/GEL	4:1	0,051 ± 0,008	4,81 ± 0,22 ^a	30,34 ± 0,17 ^a

*Média e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas por meio do teste de TUKEY. GEL= gelatina; GLU= glúten, PVA= permeabilidade ao vapor de água e SOL= solubilidade em água.

A solubilidade em água dos filmes variou de 30,20 a 33,58%, não sendo observada também diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os filmes. A solubilidade em água dos filmes compostos manteve-se na mesma ordem de grandeza dos simples de gelatina (30,34%) e maiores que os simples de glúten (23,80%).

Tanada-Palmu, Fakhouri e Grosso (2002) desenvolveram filmes compostos de gelatina e glúten e verificaram a influência da mistura nas propriedades. A permeabilidade ao vapor de água variou de 4,35 a 6,86 g.mm/m²diakPa, sendo menor no filme GLU/GEL na proporção 1:4. Os autores observaram que a permeabilidade ao vapor de água de todos os filmes compostos da mistura de gelatina e glúten diminuiu em relação aos filmes simples de glúten. Os resultados deste estudo foram semelhantes aos obtidos pelos autores.

4.4.1.3 Propriedades Mecânicas

Os valores de resistência à tração e a porcentagem de alongação encontrados para filmes compostos de gelatina e glúten encontram-se na Tabela 4.20.

Tabela 4.20. Propriedades mecânicas dos filmes compostos glúten de trigo e gelatina, plastificados com glicerol (25°C).

Filmes	Proporções	Espessura (mm)	RT (MPa)*	ELO (%)*
GLU/GEL	1:1	0,055 ± 0,006	22,43 ± 1,65 ^b	4,99 ± 0,24 ^b
GLU/GEL	1:4	0,051 ± 0,020	34,11 ± 1,53 ^a	4,89 ± 0,14 ^b
GLU/GEL	4:1	0,062 ± 0,031	12,60 ± 0,70 ^c	26,51 ± 1,60 ^a

*Média e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas por meio do teste de TUKEY. GEL= gelatina; GLU= glúten, RT= resistência à tração e ELO= alongação.

A resistência à tração dos filmes de glúten e gelatina 1:4 (34,11 MPa) mostrou-se maior que os valores obtidos para os demais. Estes foram menores que os obtidos para o filmes simples de gelatina (90,73 MPa) e maiores que para os simples de glúten (0,45 MPa). Resultados semelhantes foram encontrados por Tanada-Palmu, Fakhouri e Grossol (2002). Estes autores relataram que a adição de gelatina nas misturas aumentou sensivelmente a resistência à tração em relação aos filmes simples de glúten, no entanto, a porcentagem de alongação sofreu um decréscimo. Os valores de resistência à tração dos filmes compostos (33,93 a 69,94 MPa) obtidos por aqueles autores foram superiores ao deste estudo.

A maior porcentagem de alongação foi alcançada para o filme de maior concentração de glúten (Tabela 4.20). As proteínas do glúten apresentam a característica de formação de uma matriz viscoelástica, resultando em filmes flexíveis e elásticos. Vicentini (2003) verificou que a adição de glúten ao filme de fécula de mandioca alterou as curvas de força *versus* deformação, que passaram

de uma curva típica de materiais rígidos e quebradiços para outra típica de matérias flexíveis.

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que o filme GLU/GEL 1:4 foi o composto com essas misturas que obteve melhores resultados de permeabilidade ao vapor de água e resistência à tração.

4.4.2 Filmes compostos à base de amido e gelatina

Em virtude da impossibilidade de caracterização dos filmes simples de amido (mandioca, mandioca modificada, milho ceroso e milho ceroso modificado) nas concentrações formadas a partir de uma solução contendo 2 e 4%, a influência da adição de amido foi verificada diretamente na confecção dos filmes compostos. Foram desenvolvidos filmes compostos com a solução formadora de gelatina previamente definida (gelatina 10% e glicerol 5%) e dos amidos (2 e 4% de amido de mandioca, de mandioca modificada, de milho ceroso ou de milho ceroso modificado) plastificados com 5 e 10% de glicerol (em relação à massa seca de amido).

Os filmes produzidos com essa formulação foram caracterizados em relação a suas propriedades físicas. Na determinação da permeabilidade ao vapor de água, os filmes que continham a concentração de plastificantes igual a 5% (em relação à massa de amido) na solução formadora de filme de amido, romperam-se no processo de selagem das células com a parafina, indicando que essa concentração de plastificante era insuficiente para tornar o filme manuseável. O mesmo ocorreu no ensaio de propriedades mecânicas, em que, ao fixar o filme ao *probe*, ele se rompia, impossibilitando a análise. O tipo e a concentração de plastificante interferem diretamente nas características do filme a ser obtido (FAIRLEY et al., 1996). Dessa forma, conclui-se que a concentração de glicerol (5%) utilizada na suspensão de amido era insuficiente para o desenvolvimento dos filmes compostos com gelatina, independente do tipo de amido utilizado.

Como consequência, não foi efetuada a caracterização dos filmes compostos confeccionados com a solução de amido contendo 5% de glicerol (em relação à massa seca), mas apenas aqueles obtidos com a concentração de 10% na solução.

4.4.2.1 Caracterização dos filmes compostos de amido de mandioca nativo e modificado e gelatina, plastificados com glicerol.

A composição dos filmes compostos de amido de mandioca nativo ou modificado (2 e 4%) e gelatina elaborados e sua respectiva caracterização estão apresentados na Tabela 4.21 e 4.22.

4.4.2.1.1 Aspecto visual

Visualmente, todos os filmes obtidos se apresentaram íntegros, homogêneos, opacos, com ausência de partículas insolúveis e fáceis de manusear. Os com maiores proporções de solução formadora de filme de amido de mandioca nativo ou modificado se mostraram mais flexíveis, finos e mais opacos. Vicentini (2003) também obteve filmes de fécula de mandioca opacos, em razão da influência da espessura e da concentração de amido na solução formadora de filme.

4.4.2.1.2 Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água

Os valores de permeabilidade ao vapor de água e a solubilidade em água dos filmes compostos elaborados encontram-se na Tabela 4.21.

Tabela 4.21. Permeabilidade ao vapor de água e a solubilidade em água dos filmes de compostos de amido de mandioca nativo e modificado e gelatina plastificados com glicerol (25°C).

Filmes	Proporções	Espessura (mm)	PVA (gmm/m ² diakPa)*	SOL (%)*
AM 2%/GEL	1:1	0,058 ± 0,006	5,13 ± 0,12 ^{abc}	23,92 ± 0,33 ^{ef}
AM 2%/ GEL	1:4	0,066 ± 0,014	6,42 ± 0,04 ^a	26,21± 0,33 ^{de}
AM 2%/ GEL	4:1	0,046 ± 0,008	4,51 ± 0,32 ^{de}	28,80 ± 0,01 ^{cd}
AM 4%/ GEL	1:1	0,057 ± 0,015	5,37 ± 0,06 ^{bc}	20,61 ± 0,28 ^g
AM 4%/ GEL	1:4	0,065 ± 0,013	6,15 ± 0,19 ^{ab}	26,21 ± 0,13 ^{de}
AM 4%/ GEL	4:1	0,055 ± 0,007	4,35 ± 0,28 ^{cde}	27,32 ± 0,26 ^{cd}
AMM 2%/ GEL	1:1	0,052 ± 0,035	4,20 ± 0,09 ^{de}	32,68 ± 0,29 ^b
AMM 2%/ GEL	1:4	0,064 ± 0,050	4,98 ± 0,06 ^{abc}	38,63 ± 0,24 ^a
AMM 2%/ GEL	4:1	0,044 ± 0,010	3,11 ± 0,27 ^{de}	23,51± 0,03 ^{ef}
AMM 4%/ GEL	1:1	0,052 ± 0,021	2,86 ± 0,16 ^e	29,48 ± 0,20 ^c
AMM 4%/ GEL	1:4	0,069 ± 0,056	4,56 ± 0,25 ^{abcd}	29,75 ± 0,06 ^c
AMM 4%/ GEL	4:1	0,046 ± 0,024	3,87 ± 0,11 ^{cde}	18,35 ± 0,22 ^g

*Média aritmética e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas por meio do teste de TUKEY. AM= amido de mandioca nativo; AMM= amido de mandioca modificado; GEL= gelatina, PVA= permeabilidade ao vapor de água e SOL= solubilidade em água.

A permeabilidade ao vapor de água variou de 2,86 a 6,42 gmm/m²diakPa. Pode-se observar que os filmes compostos com maior proporção de amido de mandioca (proporção 4:1) obtiveram menores valores de permeabilidade ao vapor de água, em ambas as concentrações avaliadas (2 e 4%). Esse fato pode ocorrer em virtude de sua menor espessura, ou seja, a adição de amido produz filmes mais finos. Vários autores observaram o aumento linear da PVA em função da espessura (PARK; CHINNAN, 1995; SOBRAL 1999; FAKHOURI; BATISTA; GROSSO, 2003).

Mali et al. (2004), entretanto, observaram que a elevação da concentração de amido de cará nos filmes simples causou aumento da permeabilidade ao vapor de água. Os autores justificaram esse comportamento em razão do aumento dos

grupos hidroxil, favorecendo a ligação com a água, e, conseqüentemente, o aumento da permeabilidade ao vapor de água graças à maior higroscopicidade.

Pode-se observar (Tabela 4.21) que a maioria dos filmes desenvolvidos com amido de mandioca modificado e gelatina mostraram se menos permeáveis ao vapor de água que os filmes compostos confeccionados com amido de mandioca nativo. Isso se deve, provavelmente, à formação de uma rede mais densa e coesa com a utilização desse tipo de amido.

A utilização de maior proporção de gelatina nos filmes compostos com amido de mandioca nativo e modificado, tanto com 2 quanto com 4% provocou aumento da permeabilidade ao vapor de água. Isso resulta, possivelmente, do caráter hidrofílico da gelatina, que induz a interação com a água, ou ao fato de os filmes possuírem maiores valores de espessura.

Os valores de permeabilidade ao vapor de água dos filmes compostos de amido mandioca modificado (2 e 4%) e gelatina, em todas as proporções estudadas, foram menores que os filmes de gelatina pura (5,38 gmm/m²diakPa). Assim visto, a adição de amido de mandioca modificado propiciou melhora nessas propriedades. Em contrapartida, pode-se observar que os filmes compostos de amido de mandioca nativo, 2 e 4%, com gelatina, 1:4, obtiveram resultados superiores ao filme simples de gelatina, sendo iguais a 6,42 e 6,15 gmm/m²diakPa, respectivamente. Os valores alcançados também foram menores que os obtidos por Vicentini (2003) para filmes de fécula de mandioca (11,76 gmm/m²diakPa).

A elevação da concentração (2 para 4%) de amido mandioca nativo e modificado não causaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) em nenhuma das proporções estudadas.

A solubilidade em água variou de 18,35 a 38,63%. Valores semelhantes foram obtidos por Mali et al. (2002) ao desenvolver filmes com 4% de amido de cará plastificado com glicerol, que apresentaram solubilidade em água de 26,37%. Vicentini (2003) encontrou valores de solubilidade em água de 0 a 40% em função

da espessura para os filmes de fécula de mandioca. O aumento na concentração de amido de mandioca modificado (2 para 4%), em todas as proporções, causou uma diminuição estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) na solubilidade em água. O mesmo comportamento foi observado ao utilizar amido de mandioca nativo, na proporção 1:1.

4.4.2.1.3 Propriedades mecânicas

Os valores de resistência à tração e a porcentagem de alongação dos filmes compostos de amido de mandioca nativo e modificado com gelatina estão lançados na Tabela 4.22.

Tabela 4.22. Propriedades mecânicas dos filmes de compostos de amido de mandioca nativo e modificada e gelatina, plastificados com glicerol (25°C).

Filmes	Proporção	Espessura (mm)	RT (MPa)*	ELO (%)*
AM 2%/GEL	1:1	0,051 ± 0,006	96,08 ± 1,02 ^e	3,95 ± 0,19 ^{bcd}
AM 2%/GEL	1:4	0,068 ± 0,014	104,98 ± 1,70 ^{de}	5,17 ± 0,28 ^{abc}
AM 2%/GEL	4:1	0,040 ± 0,008	73,94 ± 2,04 ^g	2,73 ± 0,20 ^d
AM 4%/GEL	1:1	0,053 ± 0,015	82,71 ± 2,40 ^{fg}	3,52 ± 0,23 ^{cd}
AM 4%/GEL	1:4	0,061 ± 0,013	110,5 ± 1,94 ^d	4,76 ± 0,17 ^{abc}
AM 4%/GEL	4:1	0,049 ± 0,007	74,21 ± 2,00 ^g	3,07 ± 0,17 ^d
AMM 2%/GEL	1:1	0,050 ± 0,061	126,32 ± 3,02 ^c	6,27 ± 0,17 ^a
AMM 2%/GEL	1:4	0,069 ± 0,050	158,62 ± 1,20 ^a	5,75 ± 0,23 ^{ab}
AMM 2%/GEL	4:1	0,041 ± 0,010	81,84 ± 2,52 ^g	2,13 ± 0,24 ^d
AMM 4%/GEL	1:1	0,050 ± 0,021	102,65 ± 1,68 ^{de}	5,47 ± 0,31 ^{ab}
AMM 4%/GEL	1:4	0,071 ± 0,056	143,78 ± 1,24 ^b	5,78 ± 0,37 ^a
AMM 4%/GEL	4:1	0,042 ± 0,024	85,15 ± 2,83 ^f	4,79 ± 0,67 ^{abc}

*Média aritmética e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas por meio do teste de TUKEY. AM=amido de mandioca nativo; AMM=amido de mandioca modificado; GEL=gelatina; RT= resistência à tração e ELO= alongação.

A resistência à tração variou de 73,94 a 158,62 MPa. Os filmes compostos de amido de mandioca nativo ou modificado e gelatina, em todas as

concentrações estudadas, tiveram comportamento similar, ou seja, a resistência à tração foi maior para os filmes na proporção de 1:4 e menor para 4:1.

A adição de gelatina na mistura aumentou sensivelmente a resistência à tração dos filmes compostos, não sendo estaticamente significativo ($p \leq 0,05$) apenas para o filme com 2% de amido de mandioca nativo. Esse efeito foi maior nos fabricados com 2% de amido de mandioca modificado. Segundo Cuq et al. (1996a), a força na ruptura pode aumentar com o aumento da quantidade de matéria seca na superfície, que propicia o incremento superficial do número de cadeias de proteínas, que conduz ao aumento do número potencial de interações intermoleculares. A espessura é outro fator que pode ter contribuído para aumentar a resistência à tração. Park et al. (1993) observaram que a tensão e a deformação na ruptura aumentaram com a espessura de filmes de hidroxipropilcelulose.

Os filmes compostos desenvolvidos com amido de mandioca modificado mostraram-se mais resistentes que os com amido de mandioca nativo, isso pode confirmar os resultados alcançados para a permeabilidade ao vapor de água, que possivelmente ocorreu em virtude da formação de uma rede mais densa e coesa com a utilização desse amido.

A elevação da concentração de amido de mandioca modificado (2 para 4%) causou uma diminuição estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) na resistência à tração dos filmes compostos. No caso dos de amido de mandioca, esse comportamento apenas ocorreu nos filmes com proporção 1:1; nos demais não houve diferença significativa.

Mali et al. (2004), em estudo das propriedades de barreira mecânica e óptica em filmes de amido de cará, obtiveram filmes com resistência à tração variando de 6,03 a 15,96 N e alongação de 3,44 a 4,78%. Os autores observaram que a resistência à tração melhora com a elevação da concentração de amido. Durante a secagem da solução formadora, a água é evaporada, permitindo o surgimento de uma rede de amido e, durante esse estágio, a aproximação das

cadeias do amido é favorecida pela sua alta concentração, facilitando a formação de uma matriz mais densa. Xu et al. (2005) desenvolveram e caracterizaram filmes compostos de quitosana e amido. Verificaram que a proporção 1:1 apresentou maior valor de resistência à tração (40,25 MPa). Os autores atribuíram esse comportamento à formação de ligações de pontes de hidrogênio intermoleculares entre NH_3^+ da quitosana com OH^- do amido. O grupo amino (NH_2) da quitosana é protonado para NH_3^+ no solvente ácido láctico, enquanto a ordem cristalina da molécula de amido é destruída com a gelatinização, resultando a exposição de grupos OH e formação de ligações cruzadas com NH_3^+ da quitosana. Observaram, também, que essa é uma proporção crítica, pois a elevação da concentração de amido acima deste valor nos filmes compostos causa uma redução na resistência à tração. Eles argumentaram que essa diminuição possivelmente ocorreria porque as pontes de hidrogênio intramoleculares são formadas antes das intermoleculares, gerando a separação de fase entre os dois componentes. Chang, Cheah e Seow (2000) desenvolveram filmes de fécula de mandioca com resistência à tração de 20 MPa.

A porcentagem de alongação dos filmes compostos variou de 2,13 a 6,27%, sendo menor para o filme composto de amido de mandioca modificado 2% e gelatina (4:1) e maior para o mesmo, porém na proporção de 1:4.

A elevação da concentração de amido de mandioca modificado (2 para 4%) causou um aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) na porcentagem de alongação do filme na proporção 4:1; nos demais não foi observado. Os filmes compostos desenvolvidos mostraram menor porcentagem de alongação que o filme simples de gelatina ($6,85 \pm 0,42\%$).

Xu et al. (2005) observaram que a adição de amido ($>1,5$ g) causa perda da flexibilidade dos filmes compostos de quitosana e amido. Romero-Batista et al. (2005) estudaram a caracterização físico-química e microestrutural dos filmes preparados por gelatinização à quente e à frio de fontes não convencionais de amido (*Okenia*, banana e manga). Verificaram que, quando os filmes de amido foram preparados por método de gelatinização térmica, o módulo de elasticidade

foi maior, independentemente da fonte utilizada. Petersson e Standing (2005) estudaram as propriedades mecânicas de filmes compostos de amido de batata e monoglicerídeo, observando filmes com porcentagem de alongação variando de 2,2 a 10,3%.

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que o filme de amido de mandioca modificado 2% e gelatina (1:4) foi o filme composto que obteve melhores resultados de permeabilidade ao vapor de água e porcentagem de alongação.

4.4.2.2 Caracterização dos filmes composto de amido de milho ceroso nativo ou modificado e gelatina, plastificados com glicerol.

A composição, permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água de filmes compostos de amido de milho ceroso nativo ou modificado (2 e 4%) e gelatina em suas diversas proporções estão apresentados na Tabela 4.23 e 4.24.

4.4.2.2.1 Aspecto visual

Os filmes obtidos se apresentaram com coloração levemente opaca, íntegros, homogêneos, com ausência de partículas insolúveis e fáceis de manusear. Os com menores proporções de solução formadora de gelatina se mostraram mais flexíveis.

4.4.2.2.2 Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água

Os valores de permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água dos filmes compostos desenvolvidos encontram-se na Tabela 4.23.

Tabela 4.23. Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água dos filmes de compostos de amido de milho ceroso nativo ou modificado e gelatina plastificados com glicerol (25°C).

Filmes	Proporção	Espessura (mm)	PVA (gmm/m ² diakPa)*	SOL (%)*
AMC 2%/GEL	1:1	0,069 ± 0,014	3,64 ± 0,12 ^c	34,80 ± 0,50 ^e
AMC 2%/GEL	1:4	0,074 ± 0,021	4,30 ± 0,42 ^{bc}	31,96 ± 0,44 ^e
AMC 2%/GEL	4:1	0,052 ± 0,038	2,23 ± 0,34 ^d	32,27 ± 0,10 ^e
AMC 4%/GEL	1:1	0,051 ± 0,013	3,81 ± 0,38 ^c	28,42 ± 0,15 ^f
AMC 4%/GEL	1:4	0,066 ± 0,002	5,67 ± 0,39 ^{ab}	27,42 ± 0,10 ^f
AMC 4%/GEL	4:1	0,044 ± 0,015	4,66 ± 0,16 ^{bc}	23,70 ± 0,58 ^g
AMCM 2%/GEL	1:1	0,076 ± 0,021	4,32 ± 0,16 ^{bc}	46,86 ± 0,58 ^c
AMCM 2%/GEL	1:4	0,083 ± 0,003	6,31 ± 0,11 ^a	50,35 ± 0,56 ^b
AMCM 2%/GEL	4:1	0,062 ± 0,005	4,03 ± 0,28 ^c	45,41 ± 0,50 ^c
AMCM 4%/GEL	1:1	0,075 ± 0,008	4,57 ± 0,12 ^{bc}	51,82 ± 0,53 ^b
AMCM 4%/GEL	1:4	0,088 ± 0,011	6,29 ± 0,03 ^a	57,02 ± 0,67 ^a
AMCM 4%/GEL	4:1	0,061 ± 0,003	4,43 ± 0,06 ^{bc}	38,01 ± 0,30 ^d

*Média aritmética e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas por meio do teste de TUKEY. AMC=amido de milho ceroso; AMCM=amido de milho ceroso modificado; GEL=gelatina; PVA= permeabilidade ao vapor de água e SOL= solubilidade em água.

A permeabilidade ao vapor de água variou de 2,23 a 6,31 gmm/m²diakPa, sendo menor nos filmes de 2% amido de milho ceroso e gelatina (4:1) e maior nos filmes de amido de milho ceroso modificado 2% e gelatina 1:4.

Garcia, Martino e Zaritzky (2000a) estudaram o efeito da adição de lipídios (óleo de girassol) nas propriedades de barreira de filmes de amido de milho plastificado com glicerol ou sorbitol. Obtiveram filmes com permeabilidade ao vapor de água variando de 1,22 a 3,68 10¹⁰ gm⁻¹sec⁻¹.Pa⁻¹, sendo os valores mais baixos obtidos com a adição de lipídios. Isso ocorreu em virtude do aumento da hidrofobicidade do biofilmes.

O aumento da proporção de gelatina nos filmes compostos elevou a permeabilidade ao vapor de água em toda faixa estudada, bem como nos tipos de

amidos utilizados. Isso resulta da adição de proteína que aumenta a espessura, o que é afirmado por Chen (1995), quando verificou que a permeabilidade ao vapor de água de biofilmes varia com a espessura. Park e Chinnann (1995) estudaram o efeito da espessura nos biofilmes à base de zeína, glúten e derivados de celulose sobre a permeabilidade ao vapor de água, e observaram comportamento proporcional linear entre essa propriedade e a espessura.

A substituição do amido de milho ceroso nativo por amido de milho ceroso modificado nas misturas causou aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) nos filmes com concentração de 2%, nas proporções 1:4 e 4:1.

Os resultados de permeabilidade ao vapor de água alcançados para o filme simples de gelatina ($5,38 \pm 0,09$ gmm/m²diakPa) foram maiores que a maioria dos filmes compostos desenvolvidos, com exceção dos com 4% de amido de milho ceroso e gelatina e amido de milho ceroso modificado (2 e 4%) e gelatina, ambos nas proporções 1:4. Com isso, a mistura das soluções formadoras de filmes melhorou as propriedades de barreira ao vapor de água dos filmes simples de gelatina. A elevação da concentração de amido (2 para 4%) causou um aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) na permeabilidade ao vapor de água dos filmes compostos de amido de milho ceroso e gelatina e amido de milho ceroso modificado e gelatina, na proporção 4:1.

A solubilidade em água, dos filmes compostos desenvolvidos, variou de 23,70 a 57,02%. O aumento da concentração de amido de milho ceroso (de 2 para 4%) diminuiu de maneira estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) a solubilidade em água dos filmes compostos, em todas as proporções estudadas. O mesmo ocorreu para o filme com 4% de amido de milho ceroso modificado e gelatina (4:1). Ao contrário, nos filmes compostos de amido de milho ceroso modificado (2 e 4%) e gelatina nas proporções 1:1 e 1:4 não foi observada diferença estatística ($p \leq 0,05$) para a solubilidade em água.

Kim e Lee (2002) perceberam que o aumento da concentração de plastificante provocou diminuição da solubilidade em água em biofilmes de amido

altamente carboximetilado. O valor mínimo obtido foi de 59,08%, utilizando glicerol como plastificante. Tapia-Blácido, Sobral e Menegalli (2005) desenvolveram biofilmes de amido de amaranto com solubilidade em água de 39,80 a 62,70%.

Os valores obtidos de permeabilidade ao vapor de água se mostraram semelhantes aos obtidos com a utilização de amido de mandioca nativo ou modificado, porém a solubilidade em água mostrou-se superior.

4.4.2.2.3 Propriedades mecânicas

Na Tabela 4.24, são apresentados os valores de resistência à tração e a porcentagem de alongação dos filmes compostos de amido de milho ceroso nativo ou modificado (2 e 4%) e gelatina, nas proporções de 1:1, 1:4 e 4:1.

Tabela 4.24. Propriedades mecânicas dos filmes compostos de amido de milho ceroso nativo ou modificado e gelatina, plastificados com glicerol (25°C).

Filmes	Proporção	Espessura (mm)	RT (MPa)*	ELO (%)*
AMC 2%/GEL	1:1	0,065 ± 0,055	65,45 ± 2,41 ^{ef}	2,71 ± 0,66 ^{bc}
AMC 2%/GEL	1:4	0,079 ± 0,032	87,88 ± 2,42 ^{ab}	4,19 ± 0,31 ^{ab}
AMC 2%/GEL	4:1	0,050 ± 0,041	47,55 ± 2,48 ^g	3,46 ± 0,26 ^{abc}
AMC 4%/GEL	1:1	0,059 ± 0,010	69,62 ± 1,58 ^{de}	4,96 ± 0,25 ^a
AMC 4%/GEL	1:4	0,071 ± 0,011	79,73 ± 1,78 ^{bcd}	2,01 ± 0,23 ^c
AMC 4%/GEL	4:1	0,049 ± 0,003	31,75 ± 3,04 ^h	4,68 ± 0,39 ^a
AMCM 2%/GEL	1:1	0,062 ± 0,006	82,33 ± 2,12 ^{abc}	4,15 ± 0,26 ^{ab}
AMCM 2%/GEL	1:4	0,078 ± 0,033	98,43 ± 2,22 ^a	4,36 ± 0,20 ^{ab}
AMCM 2%/GEL	4:1	0,051 ± 0,026	54,05 ± 2,02 ^{fg}	3,18 ± 0,33 ^{abc}
AMCM 4%/GEL	1:1	0,070 ± 0,001	73,81 ± 2,13 ^{de}	3,23 ± 0,38 ^{abc}
AMCM 4%/GEL	1:4	0,078 ± 0,013	82,64 ± 2,00 ^{bc}	3,80 ± 0,38 ^{abc}
AMCM 4%/GEL	4:1	0,057 ± 0,009	49,93 ± 2,35 ^g	2,82 ± 0,22 ^{bc}

*Média aritmética e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas por meio do teste de TUKEY. AMC=amido de milho ceroso; AMCM=amido de milho ceroso modificado; GEL=gelatina, RT= resistência à tração e ELO= alongação.

A resistência à tração dos filmes compostos elaborados variaram de 31,75 a 98,43 MPa e a porcentagem de alongação de 2,01 a 4,96%. Os filmes compostos de amido de milho ceroso nativo ou modificado e gelatina desenvolvidos na proporção 1:4 mostraram maiores valores de resistência à tração, seguido pelas proporções 1:1 e 4:1. Portanto, como ocorrido nos filmes compostos de gelatina e glúten, amido de mandioca e gelatina e amido de mandioca modificado e gelatina, a adição de gelatina propiciou o aumento da resistência à tração dos filmes.

Arvanitoyannis, Nakayama e Aiba (1997) estudaram filmes elaborados a partir de uma mistura de gelatina e amido de batata. Observaram que um elevado conteúdo de gelatina (>20% p/p) conduziu a um aumento na resistência à tração e na porcentagem de alongação dos filmes. Arvanitoyannis, Psomiadou e Nakayama (1996), em estudo com filmes à base de amido de milho, observaram aumento no módulo de elasticidade de 23,8 para 29,5 MPa com a elevação da concentração de caseinato de sódio de 0 a 40%. No mesmo trabalho, quando os autores fixaram a proporção de amido de milho e gelatina (1:1) e variaram a concentração de glicerol de 0 para 26%, verificaram redução no módulo de elasticidade de 37,5 para 18,3 MPa.

O aumento da concentração de amido milho ceroso nativo ou modificado (de 2 para 4%) diminuiu a resistência à tração dos filmes compostos de amido de milho ceroso e gelatina, na proporção de 4:1, e amido de milho ceroso modificado e gelatina, nas proporções de 1:1 e 1:4. A substituição do amido de milho ceroso por amido de milho ceroso modificado causou um aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) na resistência à tração dos filmes compostos na concentração de 2% e proporção 1:1 e nos filmes a 4% e proporção de 4:1.

Os filmes compostos desenvolvidos com amido de milho ceroso nativo ou modificado mostraram-se menos resistentes que os produzidos com amido de mandioca nativo ou modificado. Isso pode ser explicado, provavelmente, pelo fato de o primeiro tipo possuir maior concentração de amilopectina. Lourdin; Della-Valle e Colonna (1995) produziram biofilmes de amilopectina, amilose e amido e

observaram que uma maior concentração de amilose aumentou a resistência à tração e a porcentagem de alongação, atingindo, para biofilmes de amilose pura, valores de 60 MPa e 6%, respectivamente.

Não foi possível observar diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) na porcentagem de alongação com a substituição dos amidos. A variação nas proporções dos dois polímeros só foi estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) para os filmes elaborados com AMC 4%/GEL 1:4

Com base nos resultados obtidos pela Tabela 24 e 25, conclui-se que o filme composto que apresentou melhores valores de permeabilidade ao vapor de água e a resistência à tração foi o com 2% de amido de milho ceroso e gelatina, na proporção 1:4.

4.4.3 Filmes compostos à base de glúten e amido, plastificados com glicerol

Não foi possível o desenvolvimento dos filmes compostos de glúten e amido, pois, após sua secagem, permaneceram muito aderidos às placas de acrílico, impossibilitando sua retirada. Além disso, os filmes apresentaram a borda quebradiça e rachavam com facilidade. Esse comportamento ocorreu com todos os amidos e em todas as proporções estudadas. O aspecto desses filmes, após o período de secagem, pode ser observado nas Figuras 4.14 e 4.15.

Na impossibilidade do desmolde dos filmes, tentou-se um recobrimento por pulverização de silicone no suporte, utilizando o mesmo procedimento realizado para os filmes simples de amido. O silicone foi aplicado na superfície das placas de acrílico, sendo, posteriormente, retirado seu excesso com papel absorvente. Porém, após a secagem, constatou-se um efeito semelhante ao observado para os filmes simples de amido, ou seja, houve formação de bolhas e orifícios. É provável que esse fato tenha ocorrido por alguma reação em virtude da presença do amido e não do glúten, uma vez que os filmes simples de glúten não apresentaram esta reação na presença do silicone.

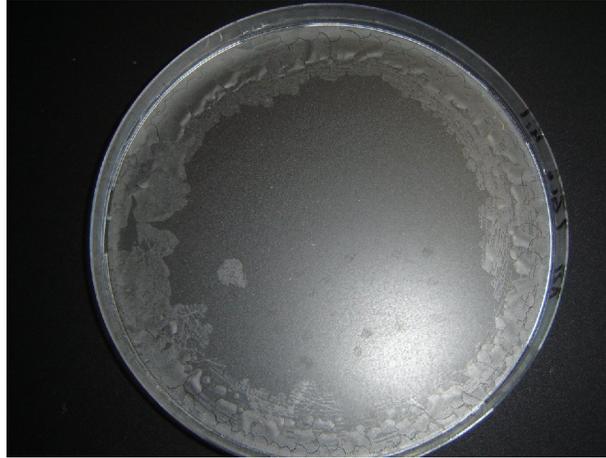


Figura 4.14. Filmes compostos de amido e glúten após processo de secagem.

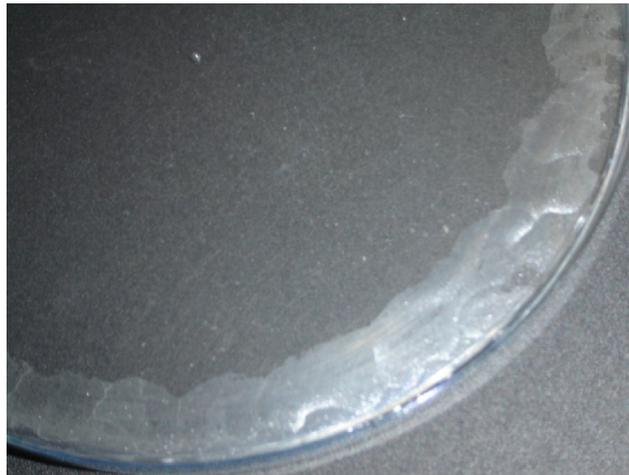


Figura 4.15. Borda dos filmes compostos de amido e glúten após o processo de secagem.

Desta forma, em razão dos problemas detectados durante o desenvolvimento desse filme, não foi possível sua obtenção e caracterização.

4.4.4 Caracterização dos filmes compostos de amido, gelatina e glúten, plastificados com glicerol

As proporções dos polímeros formadores de filmes: (i) amido de milho ceroso (2 e 4%), gelatina e glúten; (ii) amido de milho ceroso modificado (2 e 4%), gelatina e glúten; (iii) amido de mandioca (2 e 4%), gelatina e glúten; e (iv) amido de mandioca modificado (2 e 4%), gelatina e glúten, na proporção 1:1:1 plastificados com glicerol, estão apresentados na Tabela 4.25 e 4.26.

4.4.4.1 Aspecto visual

Os filmes compostos desenvolvidos apresentaram-se manuseáveis, visualmente homogêneos e com coloração levemente esbranquiçada, em função da presença de amido.

4.4.4.2 Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água

Os valores de permeabilidade ao vapor de água e a solubilidade em água dos filmes compostos encontram-se na Tabela 4.25.

Tabela 4.25. Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água dos diferentes tipos de filmes compostos à base de amido, gelatina e glúten (25°C).

Filmes	Proporções	Espessura (mm)	PVA (gmm/m ² diakPa)*	SOL (%)*
AMC 2%/GEL/GLU	1:1:1	0,058 ± 0,008	3,27 ± 0,37 ^{ab}	27,90 ± 0,08 ^{cd}
AMC 4%/GEL/GLU	1:1:1	0,059 ± 0,011	4,07 ± 0,48 ^{ab}	31,02 ± 0,37 ^{ab}
AMCM 2%/GEL/GLU	1:1:1	0,056 ± 0,003	4,03 ± 0,05 ^{ab}	21,54 ± 0,31 ^e
AMCM 4%/GEL/GLU	1:1:1	0,054 ± 0,004	3,83 ± 0,10 ^{ab}	35,42 ± 0,23 ^a
AM 2%/GEL/GLU	1:1:1	0,037 ± 0,004	3,22 ± 0,13 ^{ab}	32,35 ± 0,24 ^a
AM 4%/GEL/GLU	1:1:1	0,044 ± 0,035	4,48 ± 0,11 ^a	27,21 ± 0,45 ^d
AMM 2%/GEL/GLU	1:1:1	0,053 ± 0,006	3,09 ± 0,40 ^b	29,97 ± 0,24 ^{bc}
AMM 4%/GEL/GLU	1:1:1	0,051 ± 0,002	3,73 ± 0,17 ^{ab}	30,11 ± 0,43 ^b

*Média aritmética e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas por meio do teste de TUKEY. AMC= amido de milho ceroso; AMCM= amido de milho ceroso modificado; AM= amido de mandioca nativo; AMM= amido de mandioca modificado; GEL= gelatina, GLU= glúten; PVA= permeabilidade ao vapor de água e SOL= solubilidade em água.

A permeabilidade ao vapor de água variou de 3,09 a 4,48 gmm/m²diakPa. Apenas entre os filmes compostos de 4% amido de mandioca, gelatina e glúten e os de 2% amido de mandioca modificado, gelatina e glúten foi observada diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) na permeabilidade ao vapor de água.

A substituição de amido de mandioca por amido de mandioca modificado diminuiu a permeabilidade ao vapor de água. A elevação da concentração de amido (2 para 4%) causou aumento na permeabilidade ao vapor de água, com exceção dos filmes compostos de amido de milho ceroso modificado, gelatina e glúten. A adição de glúten diminuiu a permeabilidade ao vapor de água dos filmes compostos com exceção do 4% de amido de milho ceroso e gelatina (1:1). Os filmes compostos desenvolvidos apresentaram menor permeabilidade ao vapor de água que os filmes simples de gelatina (5,38 gmm/m²diakPa) e os filmes simples de glúten (6,28 gmm/m²diakPa). Pode-se verificar, então, que a mistura dos três biopolímeros resultou em filmes com boas propriedades de barreira ao vapor de água.

Os filmes elaborados com 2% de amido de mandioca, gelatina e glúten e os preparados com 4% amido de mandioca, gelatina e glúten apresentaram espessuras de 0,037 e 0,044 mm, respectivamente, sendo menores que as dos demais. Apesar de esses filmes apresentarem as menores espessuras, elas não influenciaram na permeabilidade ao vapor de água.

A solubilidade em água (Tabela 4.25) variou de 21,54 a 35,42%. A elevação da concentração de amido (2 para 4%) causou aumento na solubilidade em água dos filmes compostos de amido de milho ceroso e ceroso modificado. Os filmes compostos desenvolvidos com amido de mandioca nativo ou modificados mostraram maior SOL que os produzidos com amido de milho ceroso nativo ou modificados. A adição de glúten na mistura de gelatina e amido causou aumento na solubilidade em água dos filmes de 4% de amido de milho ceroso e gelatina; 2% de amido de mandioca e gelatina; 4% de amido de mandioca e gelatina e 4% de amido de mandioca modificado e gelatina, todos nas proporções 1:1.

4.4.4.3 Propriedades mecânicas

A Tabela 4.26 apresenta os valores de resistência à tração e a porcentagem de alongação dos filmes compostos de amido (milho ceroso; milho ceroso modificado; mandioca e mandioca modificado), gelatina e glúten, plastificados com glicerol.

Tabela 4.26. Propriedades mecânicas dos filmes compostos à base de amido (milho ceroso, milho ceroso modificado, mandioca e mandioca modificado), gelatina e glúten, plastificados com glicerol (25°C).

Filmes	Proporção	Espessura (mm)	RT (MPa)*	ELO (%)*
AMC 2%/GEL/GLU	1:1: 1	0,062 ± 0,058	65,74 ± 1,89 ^b	3,38 ± 0,41 ^a
AMC 4%/GEL/GLU	1:1: 1	0,055 ± 0,029	66,50 ± 0,98 ^b	3,37 ± 0,36 ^a
AMCM 2%/GEL/GLU	1:1: 1	0,059 ± 0,033	54,81 ± 0,45 ^c	4,17 ± 0,22 ^a
AMCM 4%/GEL/GLU	1:1: 1	0,049 ± 0,021	49,29 ± 0,46 ^c	4,33 ± 0,11 ^a
AM 2%/GEL/GLU	1:1: 1	0,041 ± 0,021	73,64 ± 1,37 ^a	4,46 ± 0,45 ^a
AM 4%/GEL/GLU	1:1: 1	0,046 ± 0,022	75,92 ± 2,24 ^a	3,79 ± 0,34 ^a
AMM 2%/GEL/GLU	1:1: 1	0,050 ± 0,019	76,35 ± 2,14 ^a	4,26 ± 0,29 ^a
AMM 4%/GEL/GLU	1:1: 1	0,056 ± 0,013	75,75 ± 2,00 ^a	4,00 ± 0,75 ^a

*Média e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas por meio do teste de TUKEY. AMC= amido de milho ceroso; AMCM= amido de milho ceroso modificado; AM= amido de mandioca nativo; AMM= amido de mandioca modificado; GEL= gelatina, GLU= glúten, RT= resistência à tração e ELO= alongação.

A resistência à tração variou de 49,29 a 76,35 MPa. A substituição de amido de milho ceroso por modificado, em ambas as concentrações (2 e 4%) na mistura de glúten e gelatina, causou uma diminuição estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) na resistência à tração. A substituição de amido de mandioca por modificado não causou diferença significativa ($p \leq 0,05$) no mesmo quesito dos filmes compostos desenvolvidos. O aumento da concentração de amido (de 2 para 4%) não alterou a resistência à tração, em todos os filmes estudados.

A mistura dos três biopolímeros causou diminuição na resistência à tração dos filmes simples de gelatina (90,73 MPa), assim como dos filmes compostos de amido de mandioca ou amido de mandioca modificado ou amido de milho ceroso modificado (2 e 4%) e gelatina, na proporção 1:1.

A porcentagem de alongação variou de 3,37 a 4,46%. Os valores de porcentagem de alongação (Tabela 4.26) não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Com base nos resultados apresentados nas Tabelas 4.25 e 4.26, o filme composto com os três biopolímeros que apresentou melhor propriedade de barreira ao vapor de água e resistência à tração foi o de amido de mandioca modificado (2%), gelatina e glúten.

4.5 Filmes compostos selecionados

Com base nos resultados obtidos, foram selecionados filmes compostos para serem utilizados na elaboração dos filmes ativos, sendo eles: (i) GLU/GEL, (ii) 2% de AMM/GEL, na proporção de 1:4 e (iii) 2% de AMM/GEL/GLU na proporção 1:1:1.

Esses filmes foram escolhidos em função das suas características. O filme composto de GLU/GEL (1:4) em função de possuir baixos valores de permeabilidade ao vapor de água (4,46 gmm/m²diakPa) e das características de sua própria formulação, sendo um dos solventes utilizado o etanol e o pH ser 5. Essas condições são recomendadas para produção dos filmes ativos, contendo sorbato de potássio, pois esse agente antimicrobiano é mais ativo em pH abaixo de 5. O filme de AMM/GEL (1:4), por apresentar os maiores valores de resistência à tração (158,62 MPa) e baixos valores de permeabilidade ao vapor de água (4,98 gmm/m²diakPa). E, por fim, o filme composto de 2% de AMM/GEL/GLU (1:1:1), em função de estudos com três tipos de biopolímeros serem pouco conhecidos, além desse filme apresentar os menores valores de permeabilidade ao vapor de água (3,09 gmm/m²diakPa).

4.5.1 Permeabilidade ao vapor de água, solubilidade em água, resistência à tração e porcentagem de alongação

A Tabela 4.27 representa os valores de permeabilidade ao vapor de água, solubilidade em água, resistência à tração e porcentagem de alongação obtidos na determinação com os três biofilmes selecionados.

Tabela 4.27. Permeabilidade ao vapor de água, solubilidade em água e propriedades mecânicas de filmes simples e compostos selecionados.

Filmes	PVA (gmm/m ² diakPa) *	SOL (%) *	RT (MPa) *	ELO (%) *
GLU/ GEL 1:4	4,46 ± 0,28 ^a	30,20 ± 0,11 ^b	34,11 ± 1,53 ^c	4,89 ± 0,14 ^a
AMM 2%/ GEL 1:4	4,98 ± 0,06 ^a	38,63 ± 0,24 ^a	158,62 ± 1,20 ^a	5,75 ± 0,23 ^a
AMM 2%/GEL/GLU 1:1:1	3,09 ± 0,40 ^b	29,97 ± 0,24 ^b	76,35 ± 2,14 ^b	4,26 ± 0,29 ^b

*Média aritmética e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas por meio do teste de TUKEY. GEL= gelatina; GLU= gluten, AMM= amido de mandioca modificado, PVA= permeabilidade ao vapor de água; SOL= solubilidade em água; RT= resistência à tração e ELO= alongação.

A permeabilidade ao vapor de água variou de 3,09 a 4,98 gmm/m²diakPa. Não foi observada diferença significativa ($p \leq 0,05$) nos filmes compostos de GLU/GEL (1:4) e AMM/GEL (1:4). O filme de AMM/GEL/GLU (1:1:1) apresentou o menor valor de permeabilidade ao vapor de água, diferindo estatisticamente dos demais.

A solubilidade em água (Tabela 4.27) variou de 29,97 a 38,63%, sendo maior para o filme composto AMM/GEL (1:4). Não se verificou diferença significativa ($p \leq 0,05$) quanto à solubilidade em água para os filmes compostos de GEL/GLU (1:4) e de AMM/GLU/GEL (1:1:1).

A resistência à tração variou de 34,11 a 158,62 MPa e a porcentagem de alongação de 4,26 a 5,75%. Notou-se diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação à resistência à tração entre todos os filmes compostos selecionados. A maior resistência à tração foi a do filme composto de AMM/GEL (1:4) e a menor a do de GLU/GEL (1:4). O filme de AMM/GLU/GEL (1:1:1) apresentou valor inferior de porcentagem de alongação, diferindo ($p \leq 0,05$) dos demais filmes.

4.6 Caracterização dos filmes ativos incorporados de sorbato de potássio

4.6.1 Aspecto visual

Os filmes ativos elaborados com 2 e 4% (p/v) de sorbato de potássio na solução formadora de filme mostraram-se manuseáveis e visualmente homogêneos. A adição de sorbato gerou uma coloração amarelada e um sensível incremento da plasticidade nos filmes, que era maior com o aumento da concentração do agente antimicrobiano de 2 para 4%. O filme de GLU/GEL adicionado com 4% de sorbato apresentou, em sua superfície, algumas manchas, provavelmente oriundas da segregação do agente antimicrobiano.

A incorporação de 4% sorbato de potássio à solução formadora de filme com os três biopolímeros (amido de mandioca, gelatina e glúten) promoveu a precipitação do sorbato (Figura 4.16), deixando-os esbranquiçados, opacos e difíceis de serem retirados inteiros da placa de acrílico. Esse aspecto não foi observado nos filmes com maior proporção de gelatina, que provavelmente contribui para a dissolução do sorbato. A pequena concentração de gelatina no filme elaborado com os três biopolímeros, possivelmente, não consegue evitar a formação de cristais na estrutura.

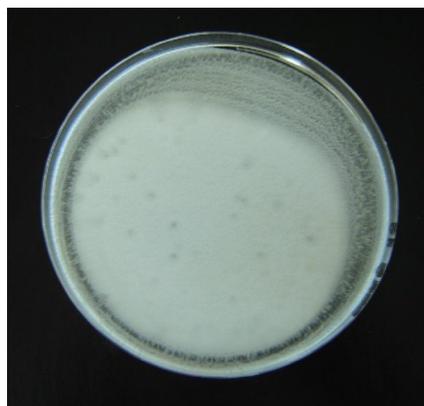


Figura 4.16. Aspecto visual do filme de AMM/GLU/GEL (1:1:1) adicionado de 4% de sorbato de potássio.

Silveira (2005) observou que a incorporação de ácido sórbico acima de 9% na matriz celulósica deixou os filmes quebradiços e opacos, o que foi atribuído à formação de cristais na estrutura do filme em razão da precipitação do ácido. Zactiti e Kieckbusch (2006) desenvolveram filmes de alginato com sorbato de potássio. Observaram que uma das limitações observadas durante a confecção dos filmes ativos foi a quantidade máxima de sorbato que poderia ser adicionada à solução formadora de filme. Quando eram superiores a 2000 mg/L, os filmes apresentavam-se opacos e com coloração esbranquiçadas, sendo possível verificar que parte do sorbato de potássio encontrava-se na sua superfície. Han e Floros (1997) observaram que a adição de sorbato de potássio provocou uma perda da transparência dos filmes de polietileno de baixa densidade.

4.6.2 Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água

A permeabilidade ao vapor de água dos filmes sem e com sorbato de potássio (2 e 4%) variou de 3,09 a 11,46 gmm/m²diakPa (Tabela 4.28). A adição de sorbato de potássio gerou um aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) na permeabilidade ao vapor de água de todos os filmes, quando comparados com os filmes sem sorbato, sendo maior naquele composto de AMM/GLU/GEL (1:1:1).

Tabela 4.28. Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água dos filmes compostos ativos incorporados de sorbato de potássio (25°C).

Filmes	Espessura (mm)	PVA (gmm/m ² diakPa)	SOL (%)
AMM/GEL (1:4)	0,069 ± 0,028	4,98 ± 0,10 ^d	38,63 ± 0,29 ^d
AMM/GEL (1:4) + 2% SORB	0,067 ± 0,023	7,78 ± 0,43 ^{bc}	40,49 ± 0,13 ^c
AMM GEL (1:4) + 4% SORB	0,066 ± 0,021	8,87 ± 0,17 ^b	50,81 ± 0,37 ^a
GLU/GEL (1:4)	0,051 ± 0,028	4,46 ± 0,24 ^d	30,20 ± 0,10 ^f
GLU/GEL (1:4) + 2% SORB	0,052 ± 0,025	7,07 ± 0,16 ^c	40,73 ± 0,08 ^c
GLU/GEL (1:4) + 4% SORB	0,051 ± 0,011	11,02 ± 0,17 ^a	48,11 ± 0,42 ^b
AMM/GLU/GEL (1:1:1)	0,056 ± 0,013	3,09 ± 0,32 ^e	29,97 ± 0,24 ^f
AMM/GLU/GEL (1:1:1) + 2% SORB	0,055 ± 0,022	11,46 ± 0,23 ^a	35,75 ± 0,08 ^e

*Média aritmética e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas por meio do teste de TUKEY. GEL= gelatina; GLU= glúten, AMM= amido de mandioca modificado, SORB= sorbato de potássio, PVA= permeabilidade ao vapor de água e SOL= solubilidade em água.

A adição de 2% de sorbato gerou um aumento de 56; 58 e 270% na permeabilidade ao vapor de água dos filmes compostos de amido de AMM/GEL (1:4); GLU/GEL (1:4) e AMM/GLU/GEL (1:1:1), respectivamente. A elevação na concentração de 2 para 4%, de sorbato nos filmes não causou diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) nos filmes com AMM/GEL (1:4), porém, proporcionou um aumento estatisticamente significativo nos de GLU/GEL glúten e gelatina (1:4). Os filmes de AMM/GLU/GEL (1:1:1) com 4% de sorbato, como comentado anteriormente, não foram caracterizados pela impossibilidade de formação de uma matriz contínua com tamanho apropriado para ser avaliada.

Zactiti e Kieckbusch (2006) desenvolveram filmes de alginato (2%) com sorbato de potássio (150, 450; 750 e 1050 mg/L). Verificaram que a elevação da concentração de sorbato de potássio nesses filmes ocasionou aumento na permeabilidade ao vapor de água. Eles relataram que um dos fatores que influencia a permeação do agente ativo é a estrutura do filme de alginato, que segundo Skjak-Braek et al. (1980) citado por Zactiti e Kieckbusch (2006), é

governada não somente pela concentração e estrutura química, mas também por sua cinética de formação, dependendo da concentração de cátions, das condições de armazenamento, da força iônica e do pH.

Kristo; Koutsoumanis e Biliaderis (2008) observaram que o aumento da concentração de sorbato de potássio e de lactato de sódio nos filmes de caseinado de sódio provocaram aumento na permeabilidade ao vapor de água. Os autores atribuíram esse comportamento à habilidade que ambos os agentes possuem em absorver moléculas de água, particularmente em altas umidades relativas (maior que 75%), aumentando, assim, a constante de difusão de vapor de água e, portanto, a permeabilidade ao vapor de água. Além disso, o sorbato e o lactato, em razão da presença de grupamento OH, poderiam competir mais fortemente pela água na rede do polímero, contribuindo para maior absorção de água que, por sua vez, causa um aumento do volume livre e, conseqüentemente, da permeabilidade ao vapor de água.

Por meio dos resultados alcançados no presente estudo, constatou-se que, possivelmente, a adição de sorbato de potássio funcionou como plastificante. Estes são, normalmente, moléculas pequenas, facilmente acopladas entre as cadeias poliméricas, podendo, quando adicionadas à matriz polimérica, gerar mudanças nas propriedades físicas, químicas e mecânicas (DE McHUGH; KROCHTA, 1994b). A incorporação de plastificante em biopolímeros modifica a organização molecular tridimensional da rede protéica, diminuindo as forças de atração intermoleculares e aumentando o volume livre do sistema (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2000).

A solubilidade em água (Tabela 4.28) variou de 29,97 a 50,81%. A adição de sorbato de potássio provocou um aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) na solubilidade em água em todos os filmes estudados. Isso ocorreu, provavelmente, pela própria dissolução do sorbato em água, solvente no qual ele é solúvel. Resultados semelhantes foram obtidos por Flores et al. (2007) que estudaram a influência da adição do sorbato de potássio nas propriedades físicas dos filmes de amido de mandioca.

Além disso, os filmes elaborados com sorbato de potássio, ao serem colocados em água, intumesciam consideravelmente. A presença do agente antimicrobiano, atuando como um plastificante adicional aumenta o volume livre na rede polimérica, deixando-a mais vulnerável e o filme, em contato com a água, a absorve facilmente ou facilita a liberação do sorbato. Esse mesmo mecanismo se reflete na permeabilidade ao vapor de água, aumentando consideravelmente seu valor.

4.6.3 Propriedades mecânicas

A Tabela 4.29 apresenta os valores de resistência à tração e a porcentagem de alongação dos filmes compostos ativos incorporados de sorbato de potássio, nas concentrações de 2 e 4% no filme final. A resistência à tração variou de 1,83 a 158,62 MPa e a porcentagem de alongação de 4,26 a 169,27%.

Tabela 4.29. Resistência à tração e porcentagem de alongação dos filmes compostos ativos incorporados de sorbato de potássio (25°C).

Filmes	Espessura (mm)	RT (MPa)*	ELO (%)*
AMM/GEL (1:4)	0,068 ± 0,017	158,62 ± 1,20 ^a	5,75 ± 0,23 ^e
AMM/GEL (1:4) + 2% SORB	0,070 ± 0,030	104,68 ± 3,09 ^b	58,11 ± 3,05 ^c
AMM/GEL (1:4) + 4% SORB	0,069 ± 0,021	38,09 ± 2,59 ^d	169,27 ± 1,85 ^a
GLU/GEL (1:4)	0,050 ± 0,009	34,11 ± 1,88 ^d	4,89 ± 0,17 ^e
GLU/GEL (1:4) + 2% SORB	0,050 ± 0,037	14,76 ± 0,62 ^e	45,18 ± 2,24 ^d
GLU/GEL (1:4) + 4% SORB	0,050 ± 0,011	1,83 ± 0,25 ^f	102,06 ± 2,14 ^b
AMM/GLU/GEL (1:1:1)	0,055 ± 0,028	76,35 ± 2,14 ^c	4,26 ± 0,29 ^e
AMM/GLU/GEL (1:1:1) + 2% SORB	0,055 ± 0,035	15,85 ± 0,49 ^e	101,55 ± 2,28 ^b

*Média aritmética e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas por meio do teste de TUKEY. GEL= gelatina; GLU= glúten, AMM= amido de mandioca modificado, SORB= sorbato de potássio, RT= resistência à tração e ELO= alongação.

A incorporação de sorbato de potássio causou um decréscimo estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) na resistência à tração dos filmes

compostos em relação ao controle, sendo maior com o aumento da quantidade de sorbato adicionada de 2% para 4%. O acréscimo de 2% de sorbato causou a diminuição aproximadamente de 34; 56 e 79% na resistência à tração dos filmes com AMM/GEL (1:4); GLU/GEL (1:4) e AMM/GLU/GEL (1:1:1), respectivamente. A elevação da concentração (de 2 para 4%) reduziu, aproximadamente, em 64 e 88% a resistência à tração dos filmes com amido de mandioca e gelatina (1:4) e glúten de trigo e gelatina (1:4), respectivamente.

Esses resultados estão de acordo com os observados em literatura. Pranoto; Rakshit e Salokhe (2005) estudaram o efeito da incorporação de nisina e sorbato de potássio na atividade antimicrobiana de filmes de quitosana. Observaram que a adição de 150 mg/g de sorbato de potássio reduziu, de 37,03 para 13,97 MPa, a resistência à tração dos filmes de quitosana. Fâma et al. (2005) estudaram as propriedades mecânicas dos filmes à base de amido de mandioca contendo sorbato de potássio. Eles também observaram uma redução no mesmo quesito. Han e Floros (1997) não verificaram alterações significativas nas propriedades de resistência à tração em filmes de polietileno incorporados com sorbato de potássio. Limjaroen et al. (2003) observaram a redução dessa propriedade à medida que se aumentou a concentração de sorbato de potássio nos filmes de cloreto de polivinilideno.

Kristo; Koutsoumanis e Biliaderis (2008) estudaram as propriedades mecânicas de filme de caseinato de sódio contendo sorbato de potássio. Observaram diminuição na resistência à tração com a adição do sorbato de potássio e atribuíram esse resultado ao efeito plastificante da água e do sorbato.

A incorporação de sorbato de potássio gerou um aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) na porcentagem de alongação de todos os filmes (Tabela 4.29). O aumento na concentração de sorbato de potássio (de 2 para 4%) intensificou esse aumento, sendo maior para o filme de AMM/GEL (1:4) com 4% de sorbato. Esse comportamento pode ter sido ocasionado pelo efeito plastificante do sorbato.

Pranoto; Rakshit e Salokhe (2005) verificaram uma elevação na porcentagem de alongação dos filmes de quitosana ao ser adicionado 100-150 mg/g de sorbato de potássio. Han e Floros (1997) não observaram diferença significativa nessa propriedade com a adição crescente, em filmes de polietileno, de sorbato de potássio, assim como Limjaroen et al. (2003) com filmes de cloreto de polivinilideno incorporados de 2 e 3% de sorbato de potássio.

As melhores formulações de filmes compostos ativos foram AMM/GEL e GLU/GEL, ambas com 2% de sorbato de potássio.

4.6.4 Permeabilidade ao oxigênio

A permeabilidade ao oxigênio dos filmes compostos com e sem a adição de sorbato está apresentada na Tabela 4.30. Essa propriedade variou de 16,30 a 28,21 $\text{cm}^3\mu\text{m}/\text{m}^2\text{dkPa}$, sendo menor para o filme de GLU/GEL 1:4 e maior para AMM/GEL 1:4.

Tabela 4.30. Permeabilidade ao oxigênio dos filmes compostos sem e com sorbato de potássio.

Filmes	PO ₂ ($\text{cm}^3\mu\text{m}/\text{m}^2\text{dkPa}$)
AMM/GEL (1:4)	28,21 ± 2,50 ^a
AMM/GEL (1:4) + 2% SORB	27,50 ± 1,56 ^a
AMM/GEL (1:4) + 4% SORB	28,05 ± 3,85 ^a
GLU/GEL (1:4)	16,30 ± 3,67 ^a
GLU/GEL (1:4) + 2% SORB	17,78 ± 0,04 ^a
GLU/GEL (1:4) + 4% SORB	19,51 ± 0,36 ^a
AMM/GLU/GEL (1:1:1)	25,47 ± 2,21 ^a
AMM/GLU/GEL (1:1:1) + 2% SORB	28,17 ± 2,95 ^a

*Média aritmética e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas por meio do teste de TUKEY. GEL= gelatina; GLU= glúten, AMM= amido de mandioca modificado, SORB= sorbato de potássio, PO₂= permeabilidade ao oxigênio.

A adição de sorbato de potássio, independentemente da concentração adicionada (2 e 4%) e da formulação utilizada, não causou diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) na propriedade em questão.

Limjaroen et al. (2003) desenvolveram filmes de cloreto de polivinilideno incorporados com diversas concentrações de ácido sórbico, sorbato de potássio ou nisina. Eles observaram que o aumento da concentração (de 2 para 3%) de ácido sórbico e sorbato de potássio causou elevação na permeabilidade ao oxigênio. Segundo os autores, os resultados demonstraram que os filmes contendo agentes antimicrobianos tiveram aumento dessa propriedade quando comparados ao filme controle, exceto nos que contém sorbato de potássio (2%) e ácido sórbico (1,5%).

4.6.5 Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias dos biofilmes elaborados, neste estudo, sem e com sorbato de potássio, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, são apresentadas nas Figuras de 4.17 a 4.19, sendo possível visualizar tanto a superfície quanto a secção transversal após fratura. Esta última foi promovida para evitar compactação da matriz com a utilização de instrumentos cortantes. Em algumas micrografias (Figura 4.17B; 4.18B e 4.19F), observa-se o aparecimento, na parte inferior, da fita de carbono que dá condução ao filme para sua visualização (representadas nas figuras pela letra "f"). Para observar-se a secção transversal dos filmes, foi necessária a inclinação do suporte em que estavam os *stubs* e, com isso, foi possível visualizar, em alguns casos, além da estrutura da espessura dos filmes, também a fita de carbono, na qual os filmes eram aderidos para posterior aplicação da camada de ouro e visualização ao microscópio.

A morfologia da superfície e secção transversal dos filmes compostos de GLU/GEL (1:4) sem e com a adição de sorbato de potássio (2 e 4% p/v) estão representadas nas Figuras 4.17A-F.

As superfícies do filme controle (Figura 4.17A) e do adicionado de 2% de sorbato de potássio (Figura 4.17C) apresentaram-se lisas e contínuas. Ao elevar a concentração do agente antimicrobiano, foi possível visualizar manchas na superfície do filme, provavelmente em virtude da precipitação do sorbato de potássio (representada pela letra “m”).

A secção transversal (Figura 4.17B, 4.17D e 4.17F) apresentou-se compacta, com pequenas estrias (representada pela letra “e”) de coloração branca inseridas na matriz polimérica. O mesmo comportamento foi observado por Carvalho e Grosso (2004) nos filmes de gelatina nativa. Esses autores verificaram que o aparecimento dessas estrias pode estar relacionado com a separação de fases do plastificante (glicerol) na matriz. As mesmas manchas observadas na superfície dos filmes com 4% de sorbato também foram verificadas na secção transversal (Figura 4.17F). Essas manchas observadas microscopicamente na superfície do filme também foram macroscopicamente visualizadas após a secagem dos filmes. Resultado semelhante foi verificado por Silveira (2005), em que a autora notou que a incorporação de ácido sórbico acima de 9% na matriz celulósica deixou os filmes quebradiços e opacos, sendo esse comportamento atribuído à formação de cristais na estrutura do filme em razão da precipitação do ácido sórbico, confirmado por microscopia. De modo geral, os filmes compostos de GLU/GEL (1:4) apresentaram uma secção transversal (Figura 4.17B, 4.17D e 4.17F) com estrutura fibrilar em função da formação de um emaranhado, possivelmente causado pela presença da gelatina. O arranjo da gelatina em tripla hélice parece favorecer a formação de superfície com uma estrutura mais contínua da matriz filmogênica, bem como uma secção transversal com estas características (CARVALHO; GROSSO, 2004).

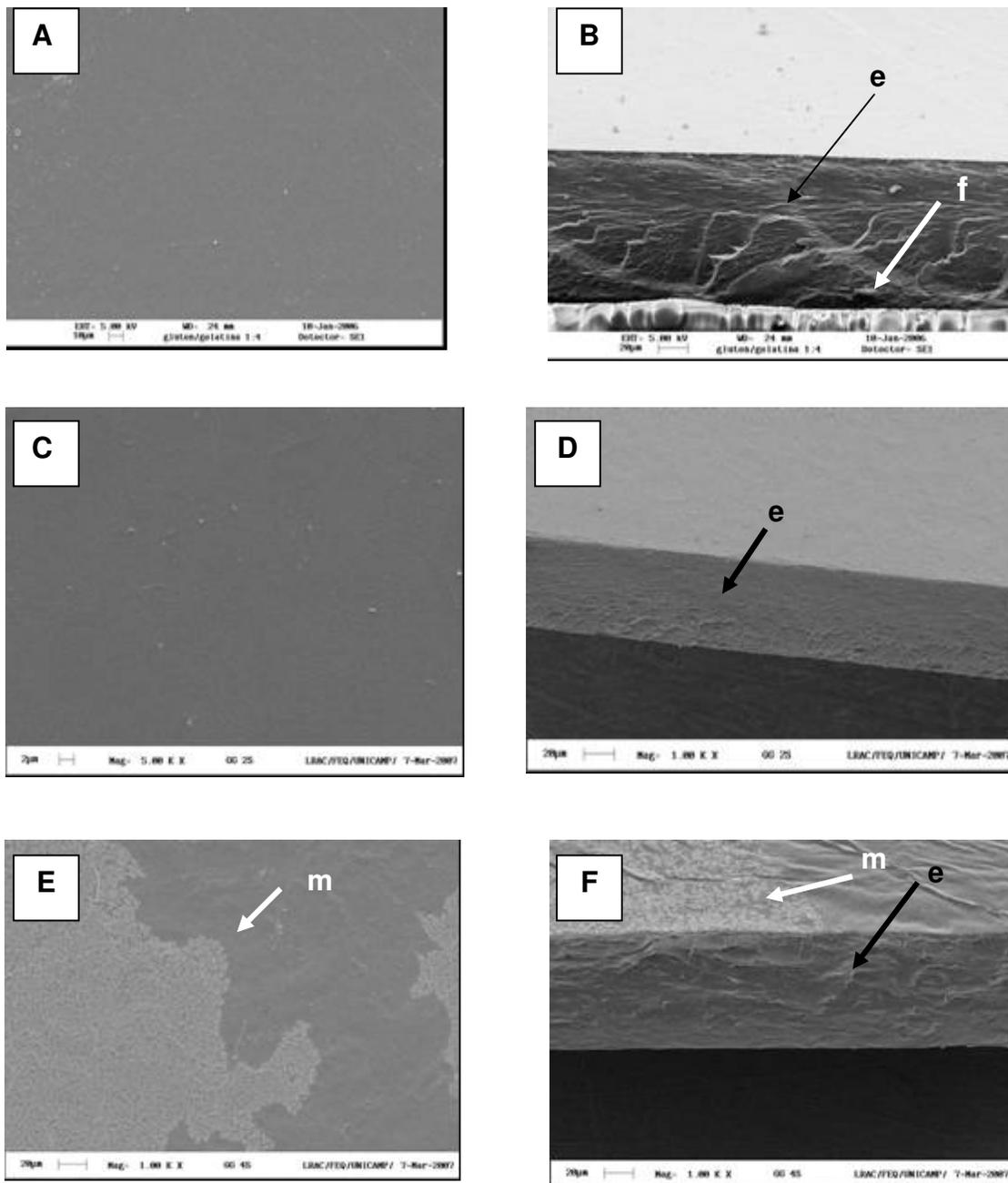


Figura 4.17. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para os filmes compostos de GLU/GEL (1:4): (A) Controle-superfície (0% de sorbato); (B) Controle-seção transversal (0% de sorbato); (C) adicionados com 2% sorbato de potássio-superfície; (D) adicionados com 2% sorbato de potássio secção transversal; (E) adicionados com 4% sorbato de potássio superfície; (F) adicionados com 4% sorbato de potássio secção transversal. (Onde: e= estria de plastificante; f = fita de carbono e m=mancha de sorbato de potássio).

A morfologia da superfície e secção transversal dos filmes compostos de 2% de AMM/GEL (1:4), sem e com a adição de sorbato de potássio (2 e 4% p/v), estão representadas nas Figuras 4.18 A-F. A superfície dos filmes controle (Figura 4.18A) e com sorbato em ambas as concentrações estudadas (2 e 4%) mostrou-se (Figura 4.18C e 4.18E) lisa, contínua e homogênea. A utilização de sorbato de potássio na máxima concentração (4%) não provocou as manchas observadas nos filmes de GLU/GEL (Figura 4.18F).

A secção transversal (Figura 4.18B, 4.18D e 4.18F) dos filmes de AMM/GEL 1:4 apresentou aspecto semelhante ao dos filmes de GLU/GEL, sendo compacta, com a presença de pequenas estrias de coloração branca inseridas na matriz polimérica, estrutura fibrilar e emaranhada e sem poros. A estrutura interna dos filmes de AMM/GEL com 2% de sorbato apresentou um aspecto mais regular (Figura 4.18D) que o das demais.

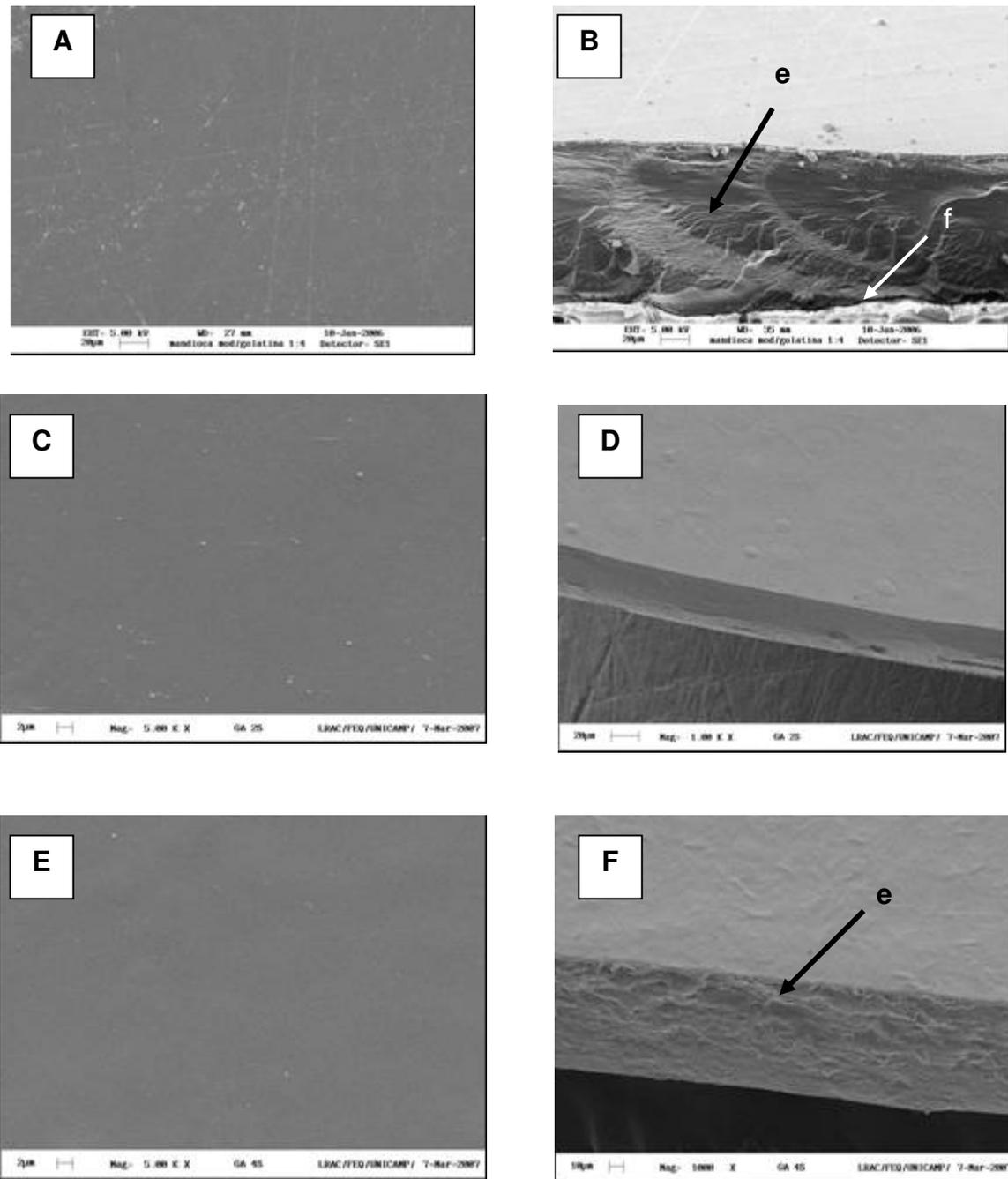


Figura 4.18. Micrografias obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura para os filmes compostos de AMM/GEL (1:4): (A) controle-superfície (0% de sorbato); (B) controle-seção transversal (0% de sorbato); (C) adicionados com 2% sorbato de potássio-superfície; (D) adicionados com 2% sorbato de potássio-seção transversal; (E) adicionados com 4% sorbato de potássio-superfície; (F) adicionados com 4% sorbato de potássio-seção transversal. (Onde: e= estria de plastificante; f = fita de carbono)

Nas Figuras 4.19A e 4.19B, são apresentadas as imagens de superfície e espessura dos filmes compostos de AMM/GLU/GEL (1:1:1) sem adição de sorbato. Observa-se que a mistura dos três biopolímeros não causou diferença na superfície dos filmes em relação aos demais filmes compostos com apenas dois biopolímeros, que se manteve lisa. Na Figura 4.19B, verificou-se também pequenas estrias com coloração branca inseridas na matriz polimérica, provavelmente provocadas pela separação de fase do plastificante. A adição de 2% de sorbato não causou alteração na superfície (Figura 4.19C) do filme, mantendo-a lisa, contínua e homogênea, porém o aumento da concentração de sorbato para 4% gerou irregularidades na superfície, com a presença de pequenos precipitados (Figura 4.19E). Esses precipitados também foram observados macroscopicamente, sendo que a superfície dos filmes se apresentou opaca e esbranquiçada (Figura 4.16). A secção transversal (Figura 4.19D) dos filmes com 2% de sorbato apresentou-se compacta e irregular e não foi possível visualizar as estrias observadas nos filmes controle. A elevação da concentração de sorbato de potássio (4%) causou aumento da irregularidade da estrutura interna do filme, em que é possível verificar menor orientação e o aparecimento de pequenos pontos brancos, que podem ser oriundos de partículas de sorbato insolúveis, pela saturação do sistema.

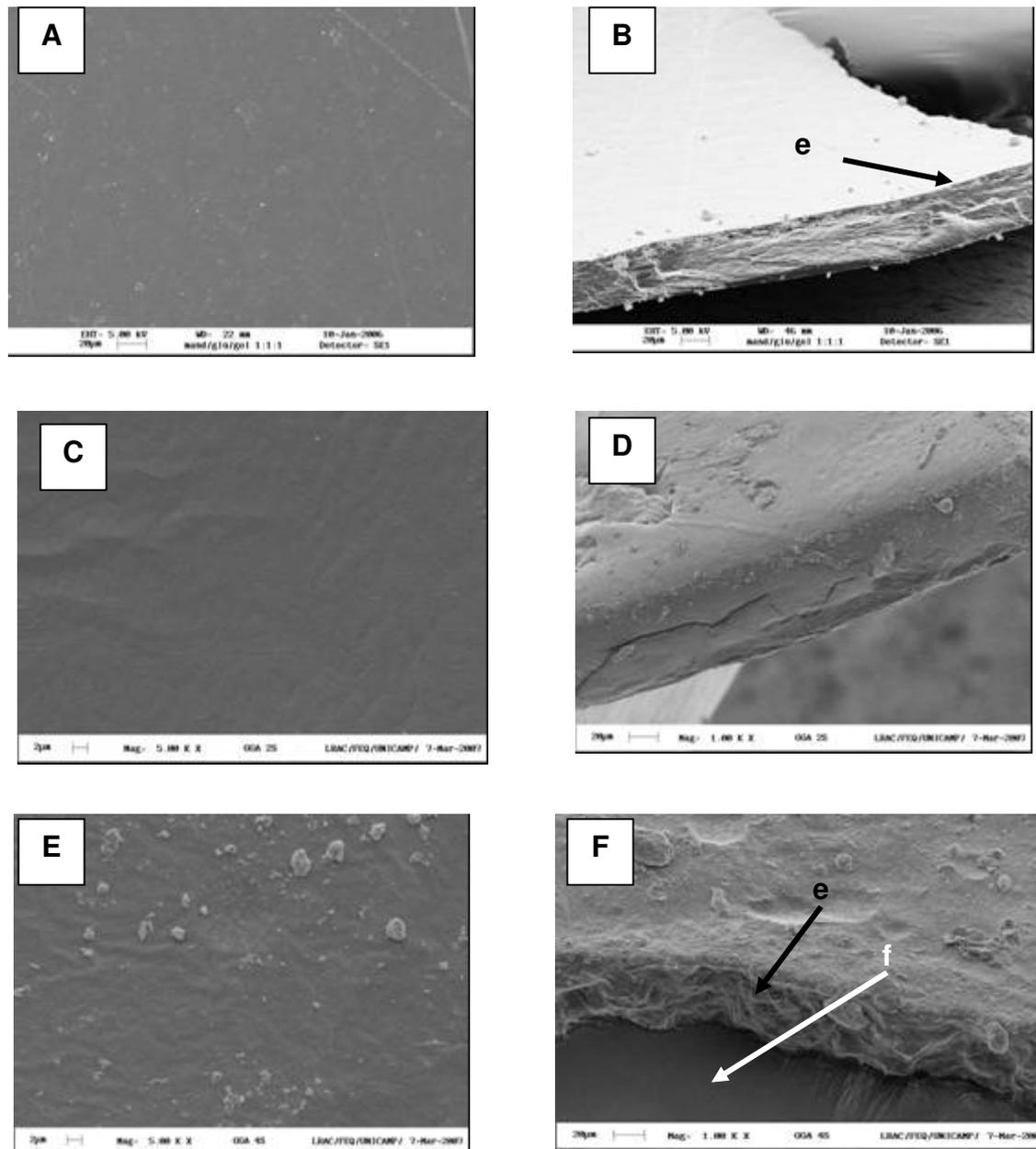


Figura 4.19. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para os filmes compostos de AMM/GLU/GEL (1:4): (A) controle-superfície (0% de sorbato); (B) controle-seção transversal (0% de sorbato); (C) adicionados com 2% sorbato de potássio-superfície; (D) adicionados com 2% sorbato de potássio-seção transversal; (E) adicionados com 4% sorbato de potássio-superfície; (F) adicionados com 4% sorbato de potássio-seção transversal. (Onde: e = estria de plastificante; f = fita de carbono).

4.6.6 Análise dinâmico mecânica

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

Através da análise dinâmico mecânica, foi possível obter o módulo de perda (E'') e o módulo de armazenamento (E') e, por conseguinte, a razão entre estes dois parâmetros que é denominada tangente de perda ($\tan \delta$). A diminuição do módulo de armazenamento e o aumento do pico da tangente de perda ($\tan \delta$) correspondem à transição típica de um material rígido (vítreo) para um estado borrachoso, ou seja, a transição vítrea (GALLIETTA et al., 1998).

Os critérios para a seleção dos dados de análise dinâmico mecânica são geralmente as curvas do módulo de perda (E'') ou da tangente de perda ($\tan \delta$). Os métodos dinâmicos mecânicos são muito sensíveis a transformações ou movimentos que ocorrem em nível molecular, sendo capazes de detectar não somente movimentos significativos, como o caso da temperatura de transição vítrea (T_g), mas também movimentos mais discretos, conhecidos como relaxações secundárias (LUCAS, SOARES; MONTEIRO, 2001; MOTHÉ; AZEVEDO, 2002;).

Inicialmente, foram realizadas análises dinâmico mecânica nos filmes compostos selecionados na primeira etapa (sem adição de sorbato de potássio), ou seja, GLU/GEL (1:4); 2% de AMM/GEL (1:4) e 2% de AMM/GEL/GLU (1:1:1). Posteriormente, os filmes ativos selecionados no teste de caracterização: GLU/GEL (1:4) e 2% de AMM/GEL (1:4), ambos com 2% de sorbato, foram caracterizados quanto às análises dinâmico mecânicas.

Os gráficos típicos de análise dinâmico mecânica dos filmes compostos de GLU/GEL (1:4); 2% de AMM/GEL (1:4); 2% de AMM/GEL/GLU (1:1:1), GLU/GEL

(1:4) com 2% de sorbato e 2% de AMM/GEL (1:4) com 2% de sorbato, mostrando a tangente de perda ($\tan \delta$), o módulo de armazenamento (E') e o módulo de perda (E'') em função da temperatura, estão representados nas Tabelas 4.31 e 4.32 e nas Figuras 4.20 a 4.24.

Os termogramas da análise dinâmica mecânica dos filmes compostos elaborados sem sorbato de potássio (Tabela 4.31 e Figuras 4.20 a 4.22) mostraram a presença de duas temperaturas de transição vítrea para todos os filmes.

Tabela 4.31. Temperatura de transição vítrea média e umidade dos biofilmes compostos.

Filmes	Umidade	Tangente Delta ($\tan \delta$),	
		Tg ₁	Tg ₂
GLU/GEL 1:4	9,11 ± 0,01	-67,57 ± 3,13 ^a	16,92 ± 0,07 ^a
2% AMM/GEL 1:4	11,45 ± 0,25	-66,46 ± 3,16 ^a	8,22 ± 0,26 ^a
2%AMM/GEL/GLU 1:1:1	9,44 ± 0,75	-59,90 ± 2,51 ^a	15,85 ± 3,56 ^a

Nota: letras diferentes, representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas pelo teste de Tukey. GEL= gelatina; GLU= glúten, AMM= amido de mandioca modificado, Tg= Temperatura de transição vítrea.

Para o filme de GLU/GEL (1:4), 2% de AMM/GEL (1:4) e 2% de AMM/GEL/GLU 1:1:1, a primeira transição foi observada na faixa de -67,67; -66,46 e -59,90°C e a segunda na faixa de 16,92; 8,22 e 15,85°C, respectivamente. As temperaturas de transição negativas observadas na primeira transição, possivelmente, estão relacionadas com a fração rica em plastificante indicando separação de fase entre a macromolécula e o plastificante (glicerol). Cherian et al. (1995) encontraram valor em torno de -62°C para o glicerol puro. Vanin et al. (2005) observaram valores de transição vítrea para o glicerol em torno de -54°C. Dessa forma, é possível concluir que a temperatura (-67,57; -66,46 e -59,90°C) das primeiras transições esteja mesmo relacionada à fração rica em plastificante, ou seja, o glicerol.

Pode-se observar, por intermédio da tangente de perda (Figuras 4.20 a 4.22), que a primeira transição se encontra com menor intensidade tendendo à linearidade e com o pico bem alargado (variando aproximadamente em uma faixa de -120 a -20°C), isso se deve principalmente à divisão entre o módulo de perda (E''), que se encontra em uma escala que varia de 8000 a 12000 MPa, pelo módulo de armazenamento (E'), que está em uma escala que varia de 400 a 600 MPa, para se obter o valor da tangente de perda e, conseqüentemente, a temperatura de transição vítrea.

A segunda transição observada está relacionada com a temperatura de transição da fase rica da mistura das macromoléculas. Apesar dos biofilmes compostos serem elaborados com mais de uma macromolécula, os mesmos apresentaram apenas uma transição. Provavelmente, isso ocorreu pela miscibilidade entre os componentes utilizados: glúten/gelatina, amido de mandioca modificado/gelatina e amido de mandioca modificado/gelatina/glúten.

Segundo Lucas, Soares e Monteiro (2001), sistemas miscíveis apresentam uma única T_g , intermediária aos valores de T_g 's dos componentes puros. A utilização do DMA para estudos de miscibilidade é baseada na observação de que sistemas miscíveis apresentam apenas um pico α combinado, cuja localização é dependente da composição (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

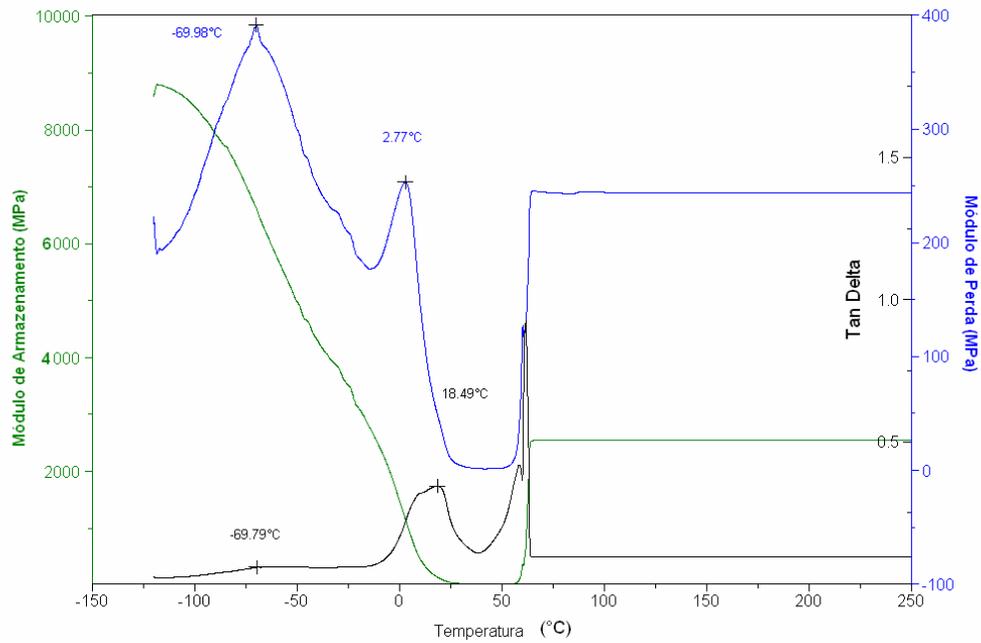


Figura 4.20. Termogramas de análise dinâmico mecânica do biofilme composto de glúten e gelatina 1:4.

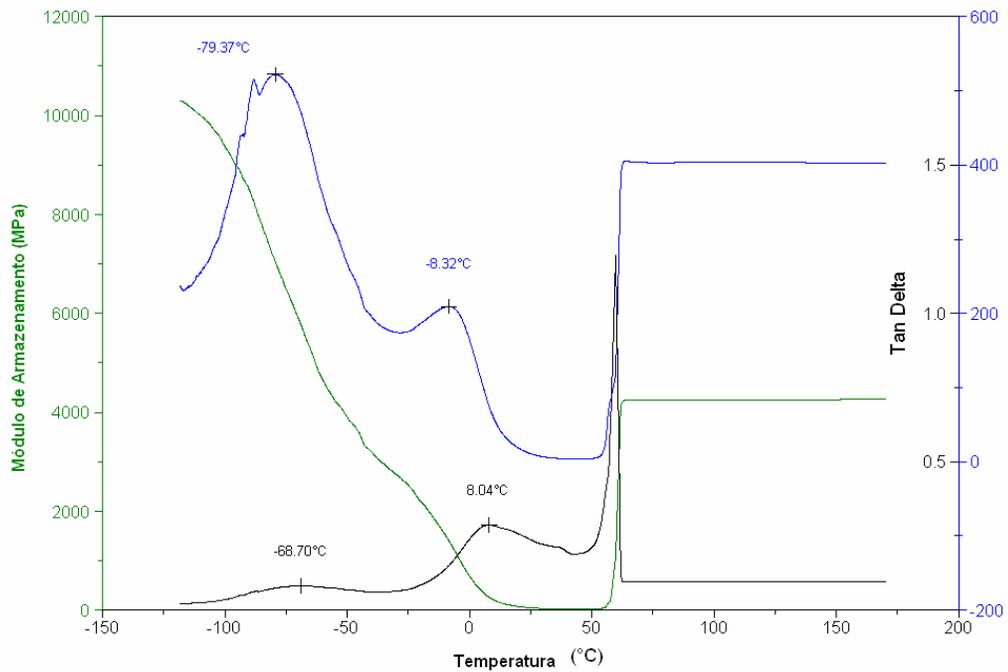


Figura 4.21. Termogramas de análise dinâmico mecânica do biofilme composto de 2% de amido de mandioca modificado e gelatina 1:4.

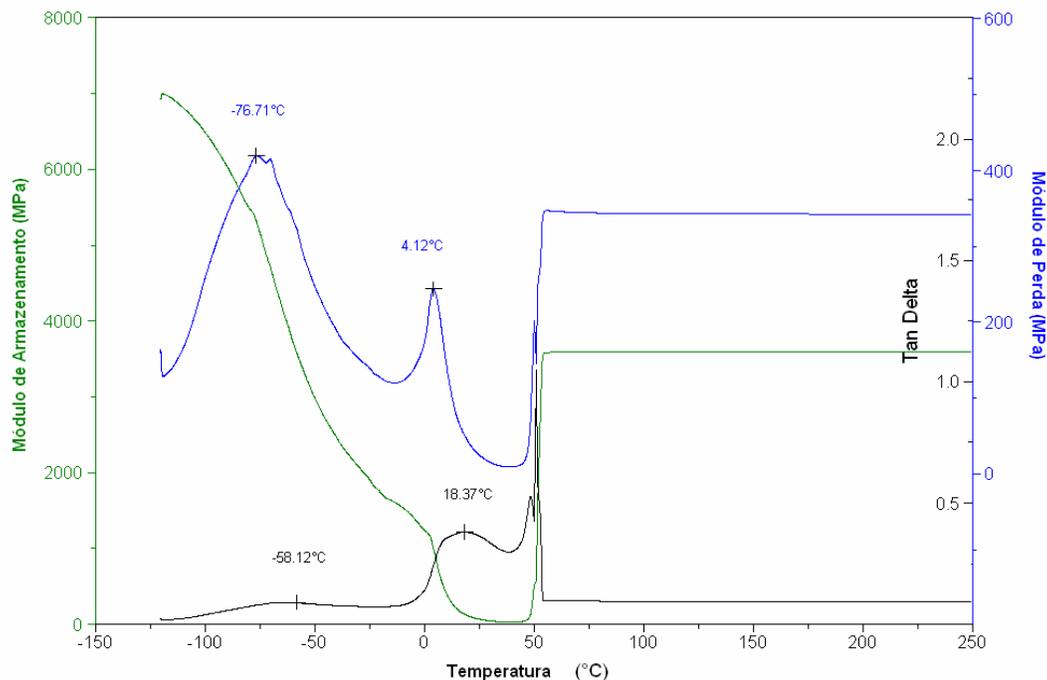


Figura 4.22. Termogramas de DMA dos biofilmes compostos de 2% de amido de mandioca modificado/gelatina e glúten 1:1:1.

Bertan et al. (2005) observaram por análise dinâmico mecânica que filmes de gelatina apresentaram uma temperatura de transição vítrea de 32,34°C e para os filmes de gelatina plastificados com triacetina duas temperaturas de transição vítrea (-61,01°C e 28,45°C), a primeira resultante do plastificante e a segunda referente à fase rica em gelatina. Sobral e Menegalli (2002) verificaram transição vítrea de 50,8°C para filmes de gelatina de couro bovino obtidos por DSC (*Differential scanning calorimetry*). Tanada-Palmu (2003) constatou uma temperatura de transição vítrea dos filmes de glúten plastificados com glicerol de 29,07°C. Vicentini (2003) observou duas temperaturas de transição vítrea para os filmes de fécula de mandioca plastificados com glicerol ou sorbitol, variando de -73,32 a 53,88°C. O autor percebeu, ainda, que esse comportamento só ocorreu quando a concentração de plastificante utilizada variou de 15 a 25%. Mali et al. (2006) observaram apenas um Tg nos filmes de amido de mandioca plastificados com glicerol, sendo a mesma 29,96°C.

Essa separação de fase, observada em todos os biofilmes compostos desenvolvidos sem sorbato, pode ser confirmada por microscopia eletrônica de varredura dos mesmos (Figura 4.17B; 4.18B e 4.19B), em que se verificou a presença de pequenas estrias de coloração branca inseridas na matriz polimérica, sendo que essas podem estar relacionadas com a separação de fases do plastificante (glicerol) na matriz.

A separação de fase entre a macromolécula e o plastificante também foi observada nos filmes de gelatina plastificados com glicerol (CARVALHO, 2002), em filmes de metilcelulose plastificado com polietileno glicol 400 (DEBEAUFORT; VOILLEY, 1997) e glúten com glicerol (CHERIAN et al., 1995). Arvanitoyannis; Nakayama e Aiba (1997) não observaram separação de fases em filmes de uma mistura de gelatina e amido, plastificados com glicerol ou sorbitol, porém os termogramas apresentados começaram em 0°C, acima da Tg dos plastificantes. Tanada-Palmu (2003) verificou apenas uma temperatura de transição vítrea (29,07°C) em filmes de glúten plastificados com glicerol, porém os termogramas começaram a -20°C.

Segundo a teoria clássica dos polímeros polares, a água atua como plastificante diminuindo a Tg dos polímeros completamente amorfos e parcialmente cristalinos. A água forma pontes de hidrogênio com as hidroxilas dos polímeros naturais polares, inserindo-se entre as cadeias e aumentando o volume livre. A plastificação, a nível molecular, acarreta um aumento do espaço intermolecular ou volume livre, diminuindo a viscosidade local, e, concomitantemente, elevando a mobilidade (FERRY, 1980).

Pelo fato de o biofilme de AMM/GEL (1:4) apresentar maior umidade (11,45) (Tabela 4.31) e, conseqüentemente, maior quantidade de água, a mesma pode ter contribuído para o filme apresentar menor valor de Tg. Segundo Biliaderis (1992) citado por Tapia-Blácido; Sobral e Menegalli (2005), um aumento no conteúdo de água do polímero produz uma diminuição do valor de Tg de forma notória.

Os termogramas da análise dinâmica mecânica dos filmes de AMM/GEL (1:4) com 2% de sorbato de potássio e GLU/GEL (1:4) com 2% de sorbato são apresentados nas Figuras 4.23 e 4.24 e Tabela 4.32.

Tabela 4.32. Temperatura média de transição vítrea e umidade dos biofilmes compostos ativos.

Filmes	Umidade	Tangente Delta ($\tan \delta$),	
		Tg ₁	Tg ₂
GLU/GEL 1:4	9,11 ± 0,01	- 67,57 ± 3,13 ^a	16,92 ± 0,07 ^a
GLU/GEL 1:4 + 2% SORB	10,44 ± 0,44	-81,70 ± 0,79 ^b	13,65 ± 0,33 ^b
AMM2% /GEL 1:4	11,45 ± 0,25	-66,46 ± 3,16 ^a	8,22 ± 0,26 ^d
AMM2% /GEL 1:4 + 2% SORB	13,51 ± 0,11	-74,46 ± 2,35 ^{ab}	12,50 ± 0,05 ^c

Nota: letras diferentes, representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas pelo teste de Tukey. GEL= gelatina; GLU= glúten, AMM= amido de mandioca modificado e Tg= temperatura de transição vítrea.

É possível observar a presença de duas temperaturas de transição vítrea nos termogramas dos filmes compostos de GLU/GEL (1:4) e AMM 2% /GEL (1:4), ambos adicionados de sorbato de potássio a 2% (Figuras 4.23 e 4.24). Para o filme de GLU/GEL (1:4) com 2% de sorbato e amido de mandioca 2% /gelatina (1:4) com 2% de sorbato a primeira transição foi observada na faixa de -81,70 e -74,46 e a segunda transição na faixa de 13,65 e 12,50, respectivamente. As temperaturas de transição negativas como nos filmes sem sorbato, possivelmente, estão relacionadas com a fase rica em plastificante (glicerol).

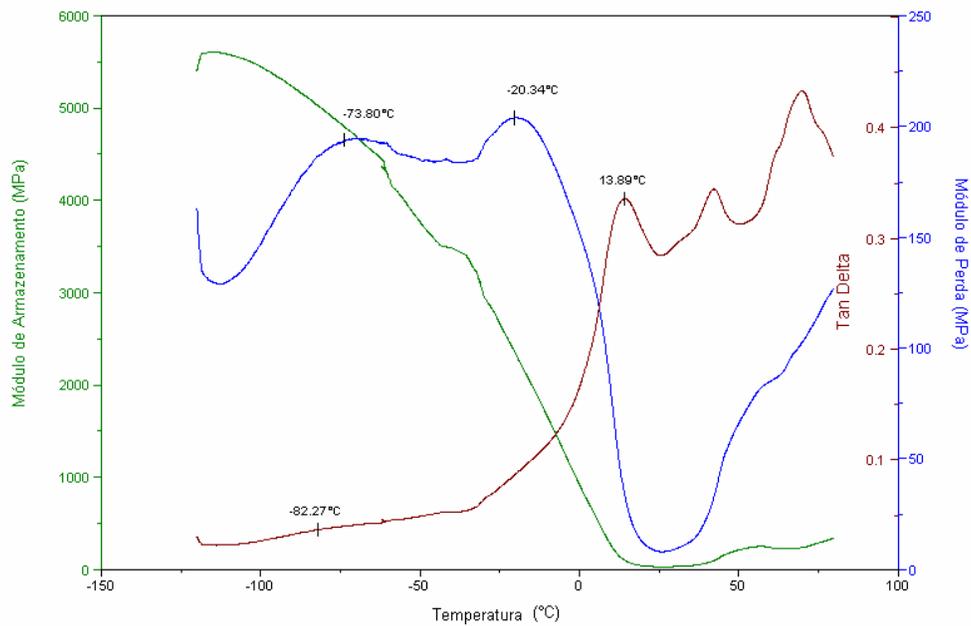


Figura 4.23. Termogramas de análise dinâmico mecânica do biofilme composto de glúten e gelatina 1:4 com 2% de sorbato de potássio.

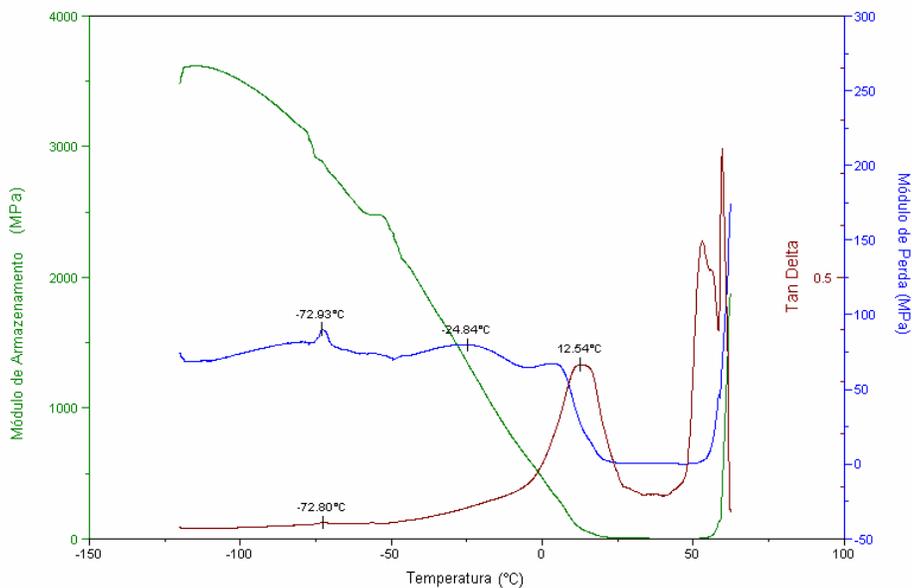


Figura 4.24. Termogramas de análise dinâmico mecânica do biofilme composto de 2% de amido de mandioca modificado e gelatina 1:4 com 2% de sorbato de potássio.

O uso de sorbato de potássio (2%) provocou um deslocamento na primeira temperatura de $-67,57$ para $-81,70$ e de $-66,46$ para $-74,46$ para os filmes de GLU/GEL (1:4) e 2% AMM/GEL (1:4), respectivamente. Provavelmente, esse deslocamento ocorreu em virtude do efeito plastificante adicional provocado pela adição do sorbato, que enfraqueceu as forças intermoleculares entre as cadeias poliméricas adjacentes, influenciando, dessa forma, no aumento da permeabilidade ao vapor de água (Tabela 4.28) e redução na resistência à tração (Tabela 4.29), como também na diminuição da temperatura de transição vítrea. Aliado ao efeito plastificante do sorbato, que pode ter provocado o deslocamento da primeira temperatura de transição vítrea, está o conteúdo de água. A adição de sorbato nos filmes compostos provocou aumento no conteúdo de umidade para os filmes GLU/GEL (1:4) com 2% de sorbato (de 9,11 para 10,44%) e AMM 2%/GEL (1:4) com 2% de sorbato (de 11,45 para 13,51%).

A segunda temperatura de transição vítrea está relacionada com a temperatura de transição da fase rica da misturas dos biopolímeros utilizados: glúten/gelatina e amido de mandioca modificado/gelatina. Mesmo com a adição de sorbato de potássio (2%) no sistema, há o aparecimento de apenas uma transição, indicando miscibilidade entre os componentes.

A adição de sorbato de potássio provocou uma redução de 16,92 para 13,65 na segunda temperatura de transição para o filme de GLU/GEL. O mesmo comportamento não foi observado para os filmes de AMM/GEL (1:4), onde a adição de sorbato provocou um aumento nesta propriedade de 8,22 para 12,50 (Tabela 4.32).

No caso do filme de GLU/GEL 1:4, provavelmente, esse comportamento foi causado pela maior facilidade de incorporação (miscibilidade) do sorbato e glicerol na matriz deste filme, acarretando maior plastificação do filme, fato evidenciado pela presença de picos mais largos e integrados, tendendo a ser um único pico no termograma desse filme (Figura 4.23). A maior facilidade de plastificação dos filmes de GLU/GEL (1:4) pode ter sido a causa da redução da segunda temperatura de transição vítrea, observada com a adição de sorbato de potássio.

A adição de sorbato causou um aumento na Tg_2 de 8,22 para 12,50 (Tabela 4.32) nos filmes de AMM/GEL (1:4). Esse comportamento ocorreu, provavelmente, pelo fato de o sorbato de potássio, nesse filme, não estar totalmente miscível com AMM, fazendo com que o mesmo ocupasse lugar ou ficasse “solto” na matriz do biopolímero, provocando, dessa maneira, o impedimento da movimentação molecular. Com isso, houve um deslocamento da temperatura de transição vítrea para valores mais altos.

Comparando-se os termogramas dos filmes de GLU/GEL (1:4) e AMM/GEL (1:4), ambos sem sorbato (Figura 4.20 e 4.21) com os mesmos filmes adicionados de sorbato de potássio (Figura 4.23 e 4.24), observa-se que a adição do agente antimicrobiano provocou alargamento do pico relativo à transição.

Segundo Lucas, Soares e Monteiro (2001), a largura do pico que ocorre na transição vítrea relaciona-se com a homogeneidade da fase que está sofrendo o processo. Em sistemas parcialmente miscíveis, é comum ocorrer solubilidade das cadeias de uma fase na outra, o que pode ser acompanhado pelo alargamento do pico relativo à transição vítrea da fase na qual cadeias da outra fase estão solubilizadas. Arvanitoyannis, Nakayama e Aiba. (1997) discutem a questão de ser muito difícil detectar transições de sistemas complexos, como gelatina/amido/polióis/água, em particular em baixo conteúdo de umidade. O efeito do sinergismo entre os componentes pode resultar em um alargamento da transição.

Famá et al. (2006) estudaram o efeito da concentração de sorbato de potássio (0; 1000; 2000 e 3000 $\mu\text{g/g}$) e pH (5 ou 6,7), na cor, umidade, cristalinidade e propriedades dinâmicas mecânicas de biofilmes de amido de mandioca. Os autores observaram duas temperaturas de transição vítrea nos filmes, sendo elas -62°C e outra entre -30 e 10°C . A primeira foi atribuída à fração rica em plastificante (glicerol) e a segunda, mais larga e em menor intensidade, foi dependente do nível de acidez e concentração de sorbato de potássio. Os autores observaram, ainda, que o aumento na concentração do antimicrobiano produziu

um deslocamento para baixo nas temperaturas de transição vítrea dos filmes de amido de mandioca a pH 5 e 6,7.

Kristo et al. (2008) estudaram as propriedades térmicas, mecânicas e barreira ao vapor de água dos filmes de caseinato de sódio contendo agentes antimicrobianos (lactato de sódio e sorbato de potássio). Os autores observaram que o aumento da concentração de lactato de sódio (0; 10 e 20%) e sorbato de potássio (0; 10 e 25%) nos filmes de caseinato de sódio, provocou deslocamento da temperatura de transição vítrea para temperaturas mais altas, sendo esse comportamento mais pronunciado com o uso do lactato de sódio.

Observou-se, em todos os termogramas (Figura 4.20 a 4.24), a presença de uma fase anômala em torno de 75°C, que ocorreu pelo aquecimento e rompimento do filme durante a análise, impedindo que a faixa de temperatura fosse completada até o valor desejado.

Uma das características necessárias do plastificante é que seja compatível e solúvel no biopolímero. A separação de fase nos biofilmes indica a não ocorrência de 100% de mistura entre o plastificante e biopolímero (GONTARD; RING, 1996). Por outro lado, como os filmes são materiais de baixa umidade, os plastificantes encontram-se relativamente concentrados, podendo causar problemas (SOBRAL, 2000). Desse modo, a separação de fases deveria implicar na perda da flexibilidade do filme, porém, segundo Debeaufort e Voilley (1997), os plastificantes podem atuar, também, como lubrificantes das cadeias dos biopolímeros, facilitando a flexibilidade do filme.

Assim sendo, com base nos dados obtidos, é possível verificar que, independente dos tipos de filmes compostos elaborados, sem e com sorbato, não houve uma mistura homogênea dos componentes utilizados, informação essa ratificada pela análise de microscopia eletrônica de varredura (item 4.6.5). A presença de duas temperaturas de transição vítrea, assim como de pequenas estrias resultantes da adição de plastificante, podem ter sido provocadas por saturação do sistema causada pela concentração utilizada de glicerol.

Acima da T_g, a estrutura polimérica é pouco ordenada e viscosa, assim como abaixo da T_g, a conformação polimérica é mais rígida. A taxa de permeabilidade ao vapor de água do filme no estado borrachoso (acima de T_g) é muito maior que a permeação da mesma barreira no estado vítreo (KOELSH; LAMBUZA, 1992). Em virtude desse fato, aconselha-se a estocagem dos filmes a temperaturas abaixo da T_g, para que não haja movimentação molecular, impedindo a reorganização das moléculas e conseqüente alteração nas propriedades dos filmes, como, por exemplo, aumento na permeabilidade ao vapor de água e diminuição da resistência à tração.

4.6.7 Ensaio de difusão em halo

4.6.7.1 Isolamento e identificação das espécies fúngicas

Os pães produzidos foram armazenados à temperatura ambiente em sacos de polietileno. Após 7 dias, foi observada a presença de microorganismos e efetuada a análise para enumeração e classificação dos fungos isolados. Foi observado um crescimento de $2,6 \times 10^6$ UFC/g. Os fungos identificados foram (Figura 4.25): (A) *Eurotium chevalieri*; (B) *Eurotium amstelodami*; (C) *Wallemia sepii*, (D) *Cladosporium sp* e (E). *Penicillium raistrickii*

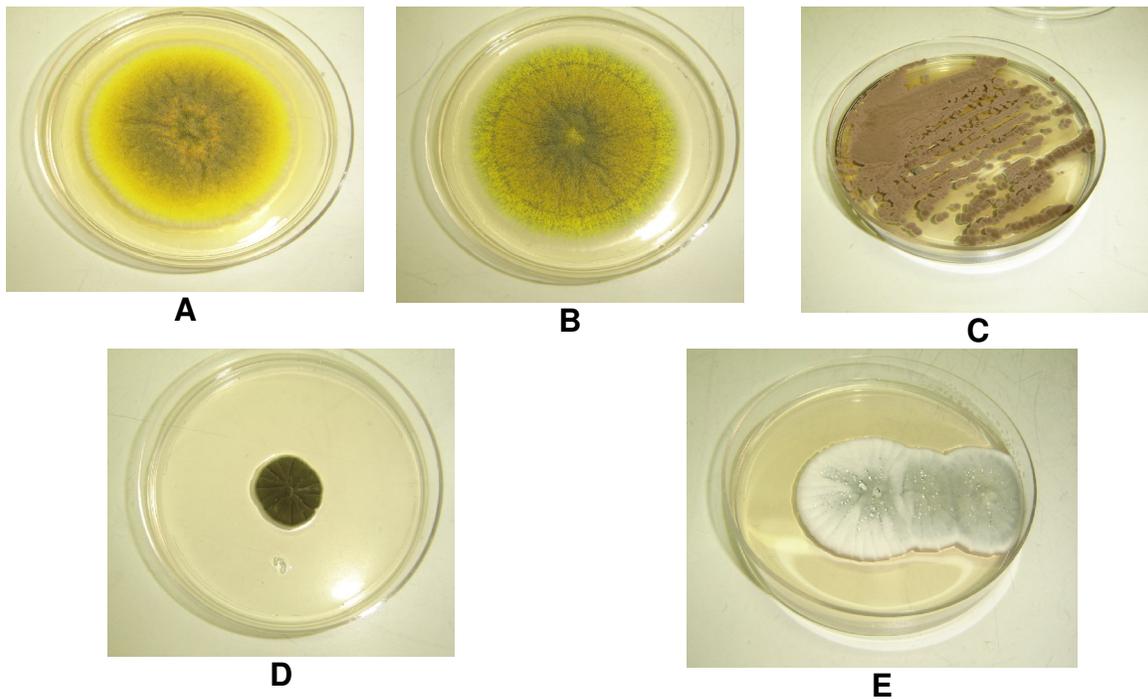


Figura 4.25. Fungos isolados para o teste de difusão do halo. (A) *Eurotium chevalieri*; (B) *Eurotium amstelodami*; (C) *Wallemia sebi*, (D) *Cladosporium sp* e (E) *Penicillium raistrickii*.

4.6.7.2 Determinação da efetividade antimicrobiana dos filmes compostos contendo sorbato de potássio

O ensaio de difusão em halo para determinação da efetividade antimicrobiana foi realizado com todos os filmes compostos selecionados adicionados com 2 e 4% de sorbato de potássio (p/v) em solução.

A concentração da suspensão estão apresentadas na Tabela 4.33. Os resultados obtidos estão demonstrados nas Tabelas 4.34 a 4.38.

Tabela 4.33 . Concentração da suspensão de esporos utilizada em ensaio de difusão em halo.

Espécie fúngica	Concentração da suspensão (esporos/mL)
<i>Eurotium chevalieri</i>	$3,1 \times 10^2$
<i>Eurotium amstelodami</i>	$1,8 \times 10^2$
<i>Wallemia sepii</i>	$3,7 \times 10^3$
<i>Penicillium raistrickii</i>	$5,4 \times 10^2$
<i>Cladosporium sp.</i>	$2,1 \times 10^3$

A Tabela 4.34 apresenta o perfil microbiológico dos filmes sem e com sorbato de potássio (2 e 4%) sobre o fungo *Eurotium chevalieri*. A adição de sorbato de potássio (2 e 4%) aos filmes de AMM/GEL (1:4); GLU/GEL (1:4) e AMM/GLU/GEL (1:1:1) não causou diferença significativa ($p \leq 0,05$) na redução do número de unidades formadoras de colônia.

Tabela 4.34. Perfil microbiológico da eficiência dos filmes ativos pelo teste de difusão em placa para *Eurotium chevalieri*.

Filmes	UFC/ mL *	Diâmetro da zona de inibição (mm)**
AMM/GEL (1:4)	$3,10 \times 10^2$ ^a	0 ^b
AMM/GEL (1:4) + 2% SORB	$2,20 \times 10^2$ ^a	$0,66 \pm 0,18$ ^{ab}
AMM/GEL (1:4) + 4% SORB	$1,90 \times 10^2$ ^a	$3,33 \pm 0,57$ ^{ab}
GLU/GEL (1:4)	$3,10 \times 10^2$ ^a	0 ^b
GLU/GEL (1:4) + 2% SORB	$1,90 \times 10^2$ ^a	$1,66 \pm 0,38$ ^{ab}
GLU/GEL (1:4) + 4% SORB	$2,00 \times 10^2$ ^a	$3,66 \pm 0,58$ ^a
AMM/GLU/GEL (1:1:1)	$3,30 \times 10^2$ ^a	0 ^b
AMM/GLU/GEL (1:1:1) + 2% SORB	$2,30 \times 10^2$ ^a	0 ^b
AMM/GLU/GEL (1:1:1) + 4% SORB	$2,60 \times 10^2$ ^a	0 ^b

UFC: Unidade formadora de colônia. *Média aritmética das replicatas. ** Média aritmética e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas através do teste de TUKEY. GEL= gelatina; GLU= glúten, AMM= amido de mandioca modificado, SORB= sorbato de potássio.

Juntamente com a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) por placa, foi realizada a medida do halo de inibição formado ao redor do filme. Pelo fato desse halo não ter sido formado de maneira homogênea, foi medido como a menor distância entre o filme e a UFC mais próxima. Pode-se observar (Tabela 4.34) que o halo variou de 0 a 3,66 mm. Não foi observada diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o filme controle (sem sorbato de potássio) e os adicionados de sorbato (2 e 4%) para os filmes AMM/GEL e AMM/GEL/GLU quanto o diâmetro do halo. A adição de 4% de sorbato no filme GLU/GEL promoveu um aumento significativo no diâmetro do halo em relação ao filme controle, porém não em relação ao adicionado de 2% do agente antimicrobiano.

Pela Figura 4.26, pode-se visualizar o efeito inibitório promovido pela adição de sorbato de potássio nos filmes, principalmente em GLU/GEL e AMM/GEL e em menor intensidade para o AMM/GEL/GLU. Há crescimento de fungos sobre a superfície dos filmes controles em todos os casos, não sendo este efeito observado nos filmes com sorbato. É possível visualizar nitidamente a redução do crescimento do fungo *Eurotium chevalieri* com a adição de sorbato por meio da formação do halo

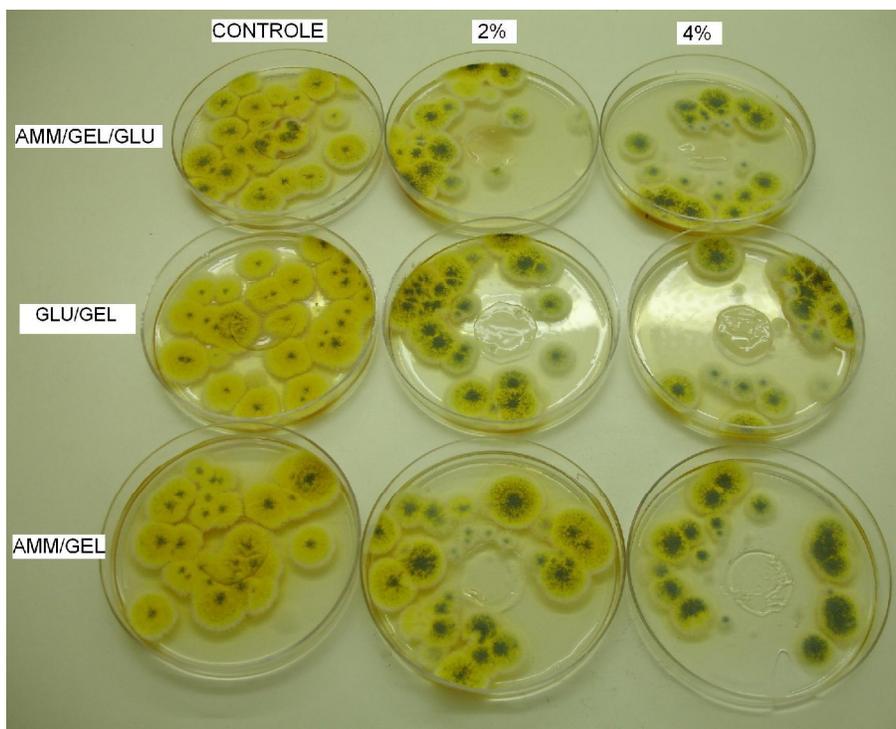


Figura 4.26. Avaliação da sensibilidade microbiana aos diferentes filmes ativos em presença de *Eurotium chevalieri*, pela técnica da difusão em ágar.

A Tabela 4.35 apresenta o perfil microbiológico da eficiência dos filmes ativos em relação ao fungo *Eurotium amstelodami*. Pode-se observar que não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) quanto o número de unidades formadoras de colônias (UFC) com a adição de sorbato de potássio em nenhuma concentração, assim como no tipo de filme utilizado.

Tabela 4.35. Perfil microbiológico da eficiência dos filmes ativos pelo teste de difusão em placa para *Eurotium amstelodami*.

Filmes	UFC/ mL*	Diâmetro da zona de inibição (mm)**
AMM/GEL (1:4)	$1,80 \times 10^2$ ^a	0 ^c
AMM/GEL (1:4) + 2% SORB	$1,20 \times 10^2$ ^a	$1,33 \pm 0,18$ ^c
AMM/GEL (1:4) + 4% SORB	$1,20 \times 10^2$ ^a	$8,33 \pm 0,83$ ^a
GLU/GEL (1:4)	$1,50 \times 10^2$ ^a	0 ^c
GLU/GEL (1:4) + 2% SORB	$1,50 \times 10^2$ ^a	$1,33 \pm 0,17$ ^c
GLU/GEL (1:4) + 4% SORB	$1,30 \times 10^2$ ^a	$7,00 \pm 1,25$ ^{ab}
AMM/GLU/GEL (1:1:1)	$1,60 \times 10^2$ ^a	0 ^c
AMM/GLU/GEL (1:1:1) + 2% SORB	$1,40 \times 10^2$ ^a	$2,33 \pm 0,44$ ^{bc}
AMM/GLU/GEL (1:1:1) + 4% SORB	$1,30 \times 10^2$ ^a	$3,33 \pm 0,44$ ^{abc}

UFC: Unidade formadora de colônia. *Média aritmética das replicatas. ** Média aritmética e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas por do teste de TUKEY. GEL= gelatina; GLU= glúten, AMM= amido de mandioca modificado, SORB= sorbato de potássio.

Por outro lado, a adição de sorbato de potássio provocou um aumento significativo ($p \leq 0,05$) no halo de inibição formado. Tanto para o filme de AMM/GEL como para GLU/GEL, esse aumento (de 2 para 4%) causou uma elevação significativa ($p \leq 0,05$) no halo de inibição. No caso do filme com os três biopolímeros (AMM/GLU/GEL), não promoveu diferença significativa ($p \leq 0,05$) no tamanho do halo. A adição de 2% de sorbato não causou diferença significativa em relação ao controle para todos os filmes estudados.

Na Figura 4.27, é possível visualizar o aumento do halo de inibição com a adição crescente de sorbato de potássio em todos os filmes estudados. No filme controle (sem agente antimicrobiano), observa-se crescimento do fungo por toda extensão da placa e por toda superfície dos filmes. Os filmes de AMM/GEL e GLU/GEL, ambos com 4% de sorbato, apresentaram maior halo de inibição.

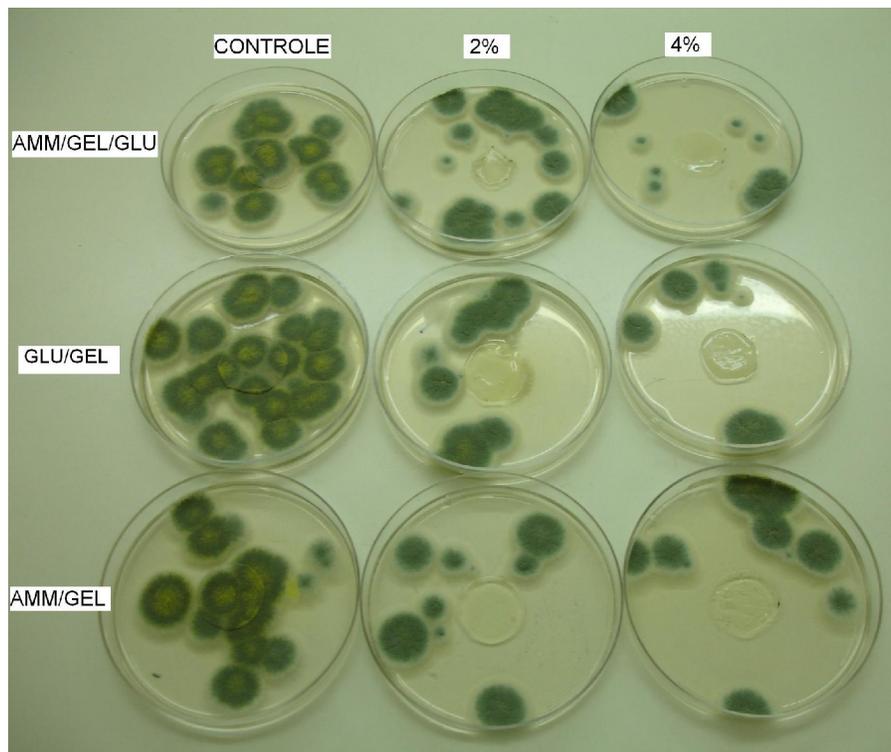


Figura 4.27. Avaliação da sensibilidade microbiana ante os diferentes filmes ativos em presença de *Eurotium amstelodami*, pela técnica da difusão em ágar.

A Tabela 4.36 indica o efeito dos filmes ativos desenvolvidos sobre o crescimento de *Wallemia sepii*. A adição de 2% de sorbato de potássio promoveu uma redução significativa ($p \leq 0,05$) no crescimento de *Wallemia sepii* para o filme de AMM/GEL e AMM/GLU/GEL em relação ao controle, porém o aumento da concentração de 2 para 4% nesse filmes não causou diferença na inibição do crescimento do fungo quanto as unidades formadoras de colônia. A incorporação de sorbato de potássio diminuiu o número de unidades formadoras de colônia de *Wallemia sepii* para o filme de GLU/GEL, sendo essa inibição potencializada com a elevação da concentração de sorbato de 2 para 4%.

Tabela 4.36. Perfil microbiológico da eficiência dos filmes ativos pelo teste de difusão em placa para *Wallemia sepii*.

Filmes	UFC/mL*	Diâmetro da zona de inibição (mm)**
AMM/GEL (1:4)	$3,72 \times 10^3$ ^a	0 ^c
AMM/GEL (1:4) + 2% SORB	$2,82 \times 10^3$ ^b	$1,33 \pm 0,19$ ^{bc}
AMM/GEL (1:4) + 4% SORB	$2,93 \times 10^3$ ^{bc}	$3,67 \pm 0,51$ ^{abc}
GLU/GEL (1:4)	$3,76 \times 10^3$ ^a	0 ^c
GLU/GEL (1:4) + 2% SORB	$2,52 \times 10^3$ ^d	$4,67 \pm 0,83$ ^{ab}
GLU/GEL (1:4) + 4% SORB	$2,10 \times 10^3$ ^e	$5,67 \pm 1,01$ ^a
AMM/GLU/GEL (1:1:1)	$3,74 \times 10^3$ ^a	0 ^c
AMM/GLU/GEL (1:1:1) + 2% SORB	$2,59 \times 10^3$ ^{cd}	$1,33 \pm 0,19$ ^{bc}
AMM/GLU/GEL (1:1:1) + 4% SORB	$2,55 \times 10^3$ ^d	$1,66 \pm 0,19$ ^{abc}

UFC: Unidade formadora de colônia. *Média aritmética das replicatas. ** Média aritmética e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas pelo teste de TUKEY. GEL= gelatina; GLU= glúten, AMM= amido de mandioca modificado, SORB= sorbato de potássio.

O halo de inibição formado variou de 0 a 5,67 mm, sendo maior para o filme de GLU/GEL (1:4) contendo 4% de sorbato, o qual também apresentou menos unidades formadoras de colônia ($2,1 \times 10^6$ UFC/mL). A adição de sorbato em ambas as concentrações não causou diferença significativa ($p \leq 0,05$) nos filmes de AMM/GEL e AMM/GLU/GEL com relação ao controle. Foi observada diferença significativa ($p \leq 0,05$) no diâmetro do halo de inibição com a adição de sorbato de potássio para os filmes de GLU/GEL, porém a elevação da concentração de sorbato de 2 para 4% não interferiu no tamanho do halo.

Pela fotografia da Figura 4.28, é possível visualizar o crescimento de *Wallemia sepii* por toda a extensão da placa, inclusive sobre a superfície do filme controle. A adição de sorbato de potássio provocou a formação de um halo de inibição na placa, sendo maior na maior concentração utilizada (4%). O filme de GLU/GEL com 4% de sorbato de potássio apresentou maior halo de inibição.

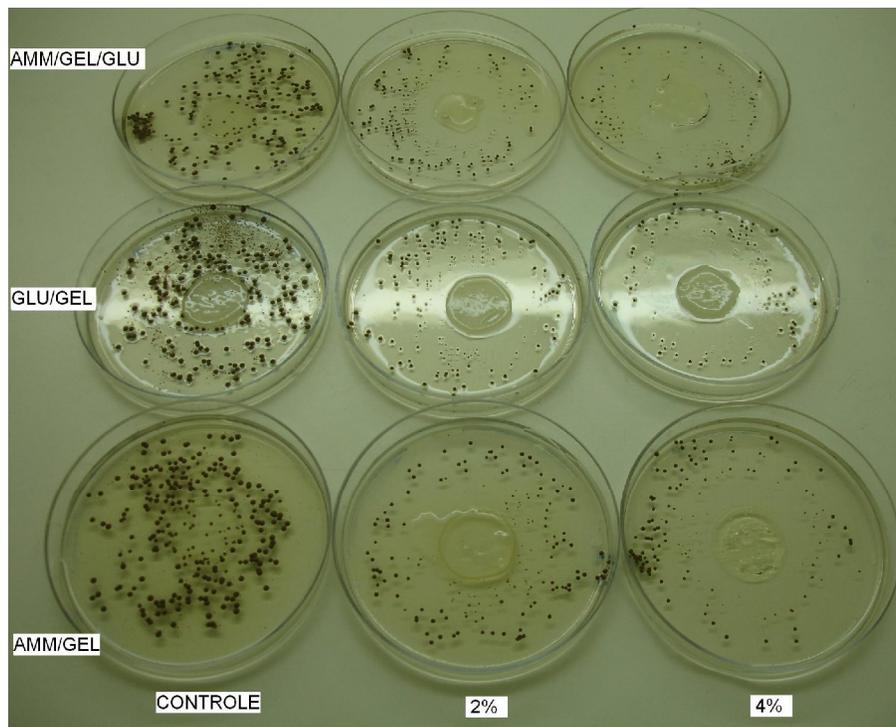


Figura 4.28. Avaliação da sensibilidade microbiana frente aos diferentes filmes ativos em presença de *Wallemia sepii* pela técnica da difusão em ágar.

A Tabela 4.37 apresenta o efeito dos filmes ativos sobre o fungo *Penicillium raistrickii*. A adição de sorbato de potássio em ambas as concentrações (2 e 4%) não provocou diferença significativa nos filmes de AMM/GLU/GEL. Nos de AMM/GEL (1:4), a adição provocou uma redução significativa ($p \leq 0,05$) no número de unidades formadoras de colônias, porém o aumento de 2 para 4% não causou diferença nessa redução. Comportamento semelhante ocorreu com o filme de GLU/GEL, no qual a elevação da concentração de sorbato de 2 para 4% não interferiu na redução do crescimento do fungo.

Tabela 4.37. Perfil microbiológico da eficiência dos filmes ativos pelo teste de difusão em placa para *Penicillium raistrickii*.

Filmes	UFC/mL*	Diâmetro da zona de inibição (mm)**
AMM/GEL (1:4)	5,40 x 10 ² ab	0 ^b
AMM/GEL (1:4) + 2% SORB	3,70 x 10 ² c	0 ^b
AMM/GEL (1:4) + 4% SORB	3,30 x 10 ² c	2,33 ± 0,18 ^a
GLU/GEL (1:4)	5,50 x 10 ² a	0 ^b
GLU/GEL (1:4) + 2% SORB	4,50 x 10 ² abc	0 ^b
GLU/GEL (1:4) + 4% SORB	4,10 x 10 ² bc	2,66 ± 0,51 ^a
AMM/GLU/GEL (1:1:1)	5,40 x 10 ² ab	0 ^b
AMM/GLU/GEL (1:1:1) + 2% SORB	5,10 x 10 ² ab	0 ^b
AMM/GLU/GEL (1:1:1) + 4% SORB	5,30 x 10 ² ab	0 ^b

UFC: Unidade formadora de colônia. *Média aritmética das replicatas. ** Média aritmética e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas pelo teste de TUKEY. GEL= gelatina; GLU= glúten, AMM= amido de mandioca modificado, SORB= sorbato de potássio.

O halo de inibição formado variou de 0 a 2,66 mm. Os únicos filmes ativos que apresentaram a formação de halo de inibição foram AMM/GEL e GLU/GEL, ambos com 4% de sorbato de potássio. Não foi observada diferença significativa entre o tamanho dos halos dos dois filmes.

A Figura 4.29 apresenta a formação do halo de inibição, principalmente para os filmes de GLU/GEL e AMM/GEL, ambos com 4% de sorbato. Os filmes controles (sem a adição de sorbato) apresentaram crescimento em toda extensão da placa, independentemente do tipo de filme. A adição de 2% não induziu à formação do halo de inibição, porém diminuiu o crescimento sobre a superfície.

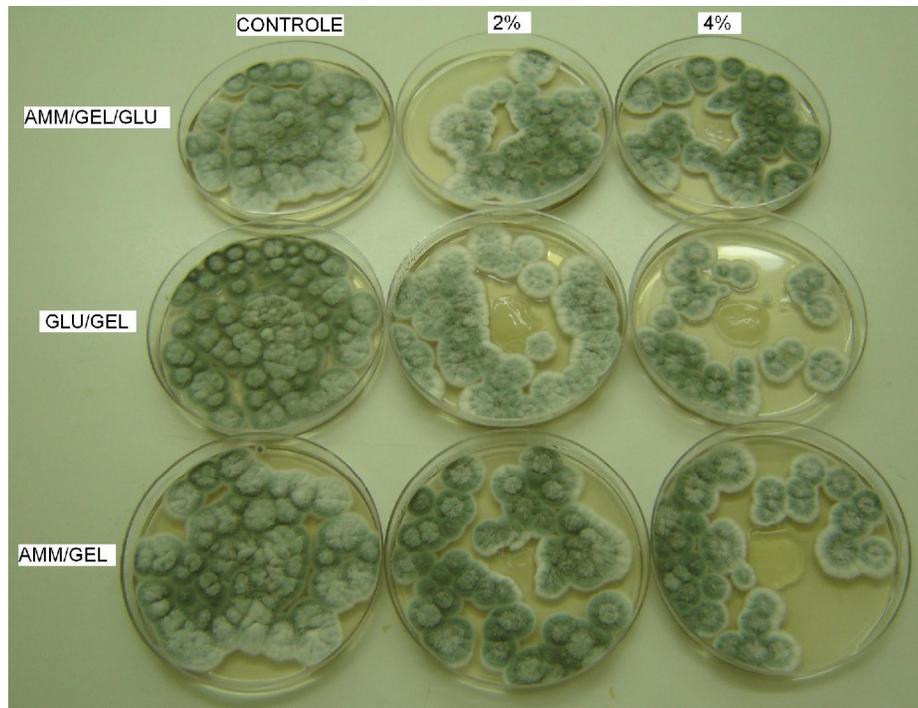


Figura 4.29. Avaliação da sensibilidade microbiana ante os diferentes filmes ativos em presença de *Penicillium raistrickii* pela técnica da difusão em ágar.

A Tabela 4.38 apresenta resultados do efeito dos filmes ativos desenvolvidos sobre o crescimento de *Cladosporium sp.* A adição de sorbato de potássio gerou redução significativa ($p \leq 0,05$) no crescimento de *Cladosporium sp.* para todos os filmes, sendo maior para o de GLU/GEL. A elevação da concentração de sorbato de potássio de 2 para 4%, gerou uma redução significativa ($p \leq 0,05$) no crescimento de *Cladosporium sp.* para o filme de AMM/GLU/GEL. O mesmo comportamento não foi observado para os demais filmes (AMM/GEL e GLU/GEL), em que o aumento da concentração do agente antimicrobino (2 para 4%) não causou redução no crescimento.

Tabela 4.38. Perfil microbiológico da eficiência dos filmes ativos pelo teste de difusão em placa para *Cladosporium sp.*

Filmes	UFC/mL*	Diâmetro da zona de inibição (mm)**
AMM/GEL (1:4)	$2,15 \times 10^3$ ^a	0 ^c
AMM/GEL (1:4) + 2% SORB	$1,52 \times 10^3$ ^b	$8,33 \pm 0,39$ ^a
AMM/GEL (1:4) + 4% SORB	$1,49 \times 10^3$ ^{bc}	$9,33 \pm 0,14$ ^a
GLU/GEL (1:4)	$2,10 \times 10^3$ ^a	0 ^c
GLU/GEL (1:4) + 2% SORB	$1,05 \times 10^3$ ^e	$4,33 \pm 0,54$ ^b
GLU/GEL (1:4) + 4% SORB	$1,02 \times 10^3$ ^e	$8,67 \pm 0,39$ ^a
AMM/GLU/GEL (1:1:1)	$2,10 \times 10^3$ ^a	0 ^c
AMM/GLU/GEL (1:1:1) + 2% SORB	$1,41 \times 10^3$ ^c	$2,33 \pm 0,14$ ^{bc}
AMM/GLU/GEL (1:1:1) + 4% SORB	$1,20 \times 10^3$ ^d	$1,66 \pm 0,14$ ^{bc}

UFC: Unidade formadora de colônia. *Média aritmética das replicatas. ** Média aritmética e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas por meio do teste de TUKEY. GEL= gelatina; GLU= glúten, AMM= amido de mandioca modificado, SORB= sorbato de potássio.

O halo de inibição formado variou de 0 a 9,33 mm, sendo maior para o filme de AMM/GEL contendo 4% de sorbato. A adição de sorbato em ambas as concentrações (2 e 4%) não causou diferença significativa ($p \leq 0,05$) nos filmes de AMM/GLU/GEL, quanto ao tamanho do halo. A adição de 2% de sorbato provocou um aumento significativo ($p \leq 0,05$) nos filmes de AMM/GEL quanto ao tamanho do halo, porém o aumento na concentração do agente antimicrobino (2 para 4%) não alterou de maneira significativa o tamanho do halo. O mesmo comportamento não foi observado para o filme de GLU/GEL, o qual o aumento da concentração de sorbato provocou um aumento significativo ($p \leq 0,05$) no tamanho do halo.

Na Figura 4.30, é possível visualizar o crescimento de *Cladosporium sp* por toda a extensão da placa, inclusive sobre a superfície do filme controle. A adição de sorbato de potássio provocou a formação de um halo de inibição na placa, sendo maior na maior concentração de sorbato utilizada (4%), principalmente para o filme de GLU/GEL.

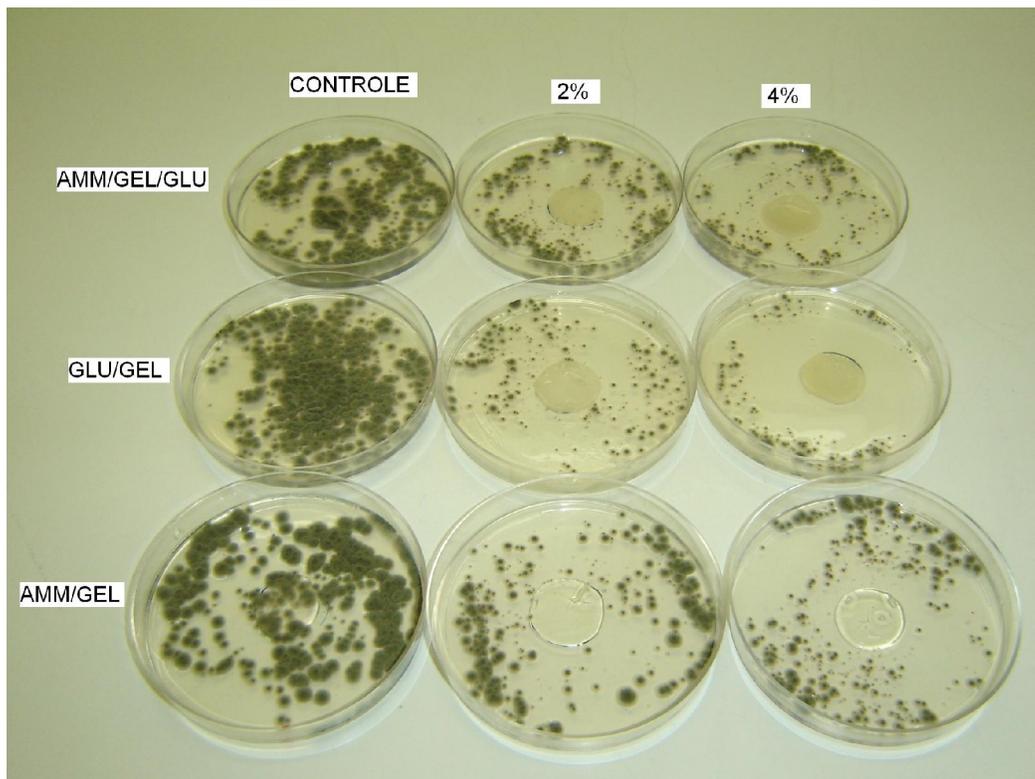


Figura 4.30. Avaliação da sensibilidade microbiana ante os diferentes filmes ativos em presença de *Cladosporium sp.* pela técnica da difusão em ágar.

Vários autores avaliaram a eficiência de filmes ativos contra microorganismos por meio do teste de difusão em halo. Pranoto; Rakshit e Salokhe (2005) estudaram a atividade antimicrobiana de filmes de quitosana incorporados de nisina e sorbato de potássio contra *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*; *L. monocytogenes* e *Bacillus cereus*. Os autores observaram a formação de halo apenas nos testes com *Staphylococcus aureus*; *L. monocytogenes* e *Bacillus cereus*. Somente o filme confeccionado com nisina apresentou diferença significativa no tamanho do halo com o aumento de concentração do agente antibactericida. Chen, Yeh e Chiang (1996) avaliaram a atividade de filmes de metilcelulose e quitosana contendo benzoato de sódio ou sorbato de potássio, onde observaram em todos os filmes desenvolvidos a formação de zonas de inibição representativas.

Em estudo realizado por Pereira et al. (2006), filmes antimicrobianos laminados, incorporados com natamicina, foram avaliados quanto à eficiência antimicrobiana. Os autores observaram a formação de halos de inibição em presença de *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* e *Penicillium sp*, mostrando que existiu eficiência antimicrobiana dos filmes testados. A elevação da concentração de natamicina proporcionou aumento da atividade antimicrobiana do filme, provocando maior liberação do antifúngico para o meio de cultura. O *Penicillium roqueforti* apresentou maior susceptibilidade à ação da natamicina que os *Aspergillus niger* e *Penicillium sp*. Limjaroen et al. (2003) desenvolveram filmes de cloreto de polivinilideno incorporados de diversos agentes antimicrobianos (lactoferrina, diacetato de sódio, nisina, sorbato de potássio e ácido sórbico) e verificaram sua atividade pelo teste de difusão em halo contra *L. monocytogenes*. Os autores não observaram atividade antimicrobiana para os filmes contendo lactoferrina e diacetato de sódio, que não apresentaram halo de inibição. A elevação da concentração de nisina (2 para 2,5p/v) e ácido sórbico (1,5 para 2% p/v) no filme aumentou o diâmetro do halo de inibição. Os filmes contendo sorbato de potássio (1; 2 e 3%) apresentaram zona de inibição, porém não diferiram entre si.

O teste de difusão em halo tem como objetivo verificar a eficiência dos filmes ativos ante um microorganismo alvo, neste caso, cinco espécies de fungos. Com base nos resultados obtidos por meio desse teste, o filme com maior eficiência antimicrobiana foi o GLU/GEL com 2% de sorbato.

4.7 Aplicação de biofilmes ativos em fatias de pão-de-forma

Com base nos resultados de caracterização física e do perfil microbiológico, os filmes de GLU/GEL 1:4, sem e com 2% de sorbato foram selecionados para avaliar seu potencial de uso como embalagem ativa no acondicionamento de pão de forma.

As fatias de pão de forma, justapostas, foram intercaladas com os filmes (fatia/filme/fatia/filme/fatia) (Figura 3.1), colocadas em sacos de polietileno de baixa densidade (PEBD) e seladas. A amostra controle consistiu no mesmo conteúdo, mas sem o biofilme entre as fatias. Foram realizadas as seguintes determinações: perda de peso; textura; umidade, atividade de água, análise microbiológica e extração e quantificação de sorbato de potássio. As análises foram realizadas no 1º; 4º e 7º dia de armazenamento a 25°C e umidade relativa de 63%.

4.7.1 Perda de peso

A Tabela 4.39 apresenta a perda de peso das fatias para os três tratamentos estudados.

Tabela 4.39. Perda de peso de fatias de pão-de-forma acondicionadas, durante o armazenamento.

DIAS	PEBD	GLU/GEL 1:4	GLU/GEL 1:4 + 2% SORB
Perda de Peso (g)*			
1º	45,94 ± 0,25 ^{ab}	49,45 ± 0,30 ^{aA}	50,63 ± 0,41 ^{aA}
4º	45,70 ± 0,24 ^{ab}	49,16 ± 0,31 ^{aA}	50,35 ± 0,42 ^{aA}
7º	45,50 ± 0,25 ^{ab}	48,76 ± 0,29 ^{aA}	50,14 ± 0,42 ^{aA}

*Média aritmética e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas na mesma amostra, enquanto letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre médias obtidas de diferentes amostras, por meio do teste de TUKEY. GEL= gelatina; GLU= glúten, SORB= sorbato de potássio, PEBD= polietileno de baixa densidade.

Não foi observada diferença significativa ($p \leq 0,05$) quanto à perda de peso entre os tratamentos isolados durante o tempo de armazenamento (7 dias). Em contrapartida, foi observada diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras, ou seja, as fatias embaladas com filmes em seu interior apresentaram maiores pesos em sua embalagem final quando comparadas às fatias embaladas apenas com o saco de polietileno. Esta diferença, provavelmente, foi causada pelo acréscimo

promovido pela inclusão de filmes no interior da embalagem e não propriamente dito pela alteração do peso das fatias durante o armazenamento.

4.7.2 Textura dos pães

Conforme pode ser observado na Tabela 4.40, os valores de força de compressão dos pães variaram de 220,10 a 225,91 gf (no 1° dia); 433,58 a 480,27 gf (no 4° dia) e 626,80 a 726,97 gf (no 7° dia). Durante o decorrer do tempo de vida de prateleira (1° para 7° dia), houve um aumento na força de compressão (gf) de 285; 315 e 321% para os tratamentos, PEBD, GEL/GLU 1:4 e GLU/GEL 1:4 + 2 SORB, respectivamente. Esse aumento na força de compressão dos pães durante o armazenamento ocorreu devido ao processo de retrogradação do amido, que faz com que as moléculas de amido comecem a perder para o meio ambiente a água que haviam absorvido durante a formação da massa. Segundo Bobbio e Bobbio (2001), o aumento de firmeza de pães durante o armazenamento é atribuído, quase que exclusivamente, à retrogradação do amido.

Tabela 4.40. Firmeza das fatias de pães-de-forma acondicionadas, durante o armazenamento.

DIAS	PEBD	GLU/GEL 1:4	GLU/GEL 1:4 + 2% SORB
Firmeza (gf)*			
1°	220,10 ± 1,85 ^{CB}	228,88 ± 1,35 ^{CA}	225,91 ± 1,26 ^{CAB}
4°	433,58 ± 1,95 ^{BC}	461,45 ± 1,14 ^{BB}	480,27 ± 1,89 ^{BA}
7°	626,80 ± 1,65 ^{AC}	719,32 ± 1,61 ^{AB}	726,97 ± 2,36 ^{AA}

*Média aritmética e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas na mesma amostra, enquanto letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre médias obtidas de diferentes amostras, por meio do teste de TUKEY. GEL= gelatina; GLU= glúten, SORB= sorbato de potássio, PEBD= polietileno de baixa densidade.

No 4° e 7° dia de análise, a alteração no tipo de tratamento (fatias embaladas sem ou com filmes, bem como o tipo de filme utilizado) gerou uma

diferença significativa ($p \leq 0,05$) no perfil de textura das fatias. De modo geral, os tratamentos nos quais foi observada maior força de compressão das fatias foram GLU/GEL 1:4 + 2 SORB; GEL/GLU 1:4 e PEBD, respectivamente. Os filmes que foram adicionados entre as fatias são elaborados com substâncias de natureza hidrofílica, ou seja, possuem alta afinidade pela água. Assim, provavelmente, esse aumento ocorreu em virtude da perda de umidade das fatias para o filme e para o meio ambiente, potencializando o aumento de sua rigidez. Isso é confirmado pela variação das características físicas dos filmes que se apresentavam mais plastificados e pegajosos chegando a aderir e envolver as fatias.

4.7.3 Conteúdo de umidade

O conteúdo de umidade das fatias de pão de forma durante o armazenamento está apresentado na Tabela 4.41. É possível observar que os valores de umidade variaram de 28,74 a 33,60% durante o armazenamento. Os resultados de umidade observados, neste estudo, estão de acordo com valores informados na literatura, e que se situam próximos a 30% (ESTELLER; LANNES, 2005).

Tabela 4.41. Conteúdo de umidade das fatias de pães-de-forma acondicionadas, durante o armazenamento.

DIAS	PEBD	GLU/GEL 1:4	GLU/GEL 1:4 + 2% SORB
Umidade (%)*			
1°	33,60 ± 0,50 ^{aA}	32,54 ± 0,37 ^{aAB}	30,60 ± 0,47 ^{aB}
4°	32,55 ± 0,41 ^{aA}	30,59 ± 0,45 ^{bAB}	29,07 ± 0,51 ^{aB}
7°	32,28 ± 0,17 ^{aA}	30,27 ± 0,32 ^{bB}	28,74 ± 0,51 ^{aB}

*Média aritmética e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas na mesma amostra, enquanto letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre médias obtidas de diferentes amostras, por meio do teste de TUKEY. GEL= gelatina; GLU= glúten, SORB= sorbato de potássio, PEBD= polietileno de baixa densidade.

Para as fatias embaladas em sacos de polietileno sem filmes e para as embaladas com filme de GLU/GEL 1:4 contendo 2% de sorbato, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$), durante o período de armazenagem. O único ensaio que registrou redução significativa, do 1º para o 4º dia, foi o com GLU/GEL 1:4. Essa tendência de perda de umidade provoca o endurecimento das fatias e explica os resultados observados na análise de textura (item 4.7.2). Segundo Labuza e Hyman (1998), a migração de umidade, em um alimento, vai ocorrer continuamente, de uma região para outra, como forma de equilíbrio dinâmico entre os componentes e o meio.

Comparando-se o efeito do tipo de armazenamento na umidade, é possível observar que as fatias em que não se usaram os filmes intercalados apresentaram maior teor de umidade quando comparados às fatias com filmes. No primeiro e quarto dia (Tabela 4.41), houve uma redução significativa no teor de umidade das fatias sem filmes quando comparadas à dos filmes de GLU/GEL 1:4 com 2% de sorbato. No sétimo dia, essa diferença se estendeu também para o armazenamento com o filme sem sorbato.

Segundo Esteller e Yoshimoto (2004), o envelhecimento do pão não está relacionado à perda de umidade da massa. Um pão analisado após 5 dias (armazenado em “condições apropriadas”) possuiria a mesma umidade que um pão “fresco”, embora apresentasse ao paladar a sensação de estar mais seco, detectado em análise de textura.

Soares et al. (2002) desenvolveram filmes ativos de acetato de celulose que foram submetidos a ensaios iguais aos usados neste trabalho. Observaram que, durante o período de estocagem (14 dias), o conteúdo de umidade inicial de 32,5% atingiu 36% no último dia. Os autores justificaram esse comportamento em função da permeabilidade ao vapor de água da embalagem.

4.7.4 Atividade de água

A Tabela 4.42 apresenta a variação do valor da atividade de água das fatias de pães de forma durante o período de armazenamento. Os valores obtidos estão de acordo com os observados na literatura (SOARES et al., 2002).

Tabela 4.42. Valores de atividade de água das fatias de pães-de-forma acondicionadas, durante o armazenamento.

DIAS	PEBD	GLU/GEL 1:4	GLU/GEL 1:4 + 2% SORB
Atividade de água (a_w)*			
1°	0,97 ± 0,00 ^{aA}	0,95 ± 0,01 ^{aB}	0,94 ± 0,00 ^{aC}
4°	0,96 ± 0,00 ^{bA}	0,94 ± 0,01 ^{bA}	0,94 ± 0,00 ^{aA}
7°	0,94 ± 0,00 ^{bA}	0,94 ± 0,00 ^{bA}	0,92 ± 0,00 ^{bB}

*Média aritmética e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas na mesma amostra, enquanto letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre médias obtidas de diferentes amostras, por meio do teste TUKEY. GEL= gelatina; GLU= glúten, SORB= sorbato de potássio, PEBD= polietileno de baixa densidade.

O uso de filmes de GLU/GEL 1:4, assim como apenas a embalagem de polietileno, provocou uma redução significativa ($p \leq 0,05$) na atividade de água das fatias durante o período de armazenamento, principalmente do 1° para o 4° dia, não apresentando diferença do 4° para o 7° dia. Essa diferença (do 4° para o 7° dia) só foi observada para as fatias embaladas com filme ativo (GLU/GEL 1:4 + 2% SORB).

A alteração no tipo de embalagem utilizada provocou uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) na atividade de água no 1° e 7° dia. No primeiro dia, foi mais intensa, sendo observada atividade de água de 0,97; 0,95 e 0,94 para os tratamentos de PEBD, GLU/GEL 1:4 e GLU/GEL 1:4 + 2% SORB, respectivamente. Já, no 7° dia foi observada diferença apenas entre os tratamentos de PEBD e GLU/GEL + 2% SORB e GLU/GEL e GLU/GEL + 2% SORB. A redução na atividade de água das fatias ocorreu em razão da migração

de água das fatias para os filmes, como também para o ambiente de estocagem. Soares et al. (2002), no estudo já mencionado anteriormente, observaram o mesmo fenômeno de redução de 0,95 para 0,92.

Mesmo com a redução da atividade de água durante o período de 7 dias, esse índice ainda permaneceu alto, independentemente do tipo de tratamento utilizado, propiciando o crescimento de microorganismos. Segundo Taniwaki e Silva (2001), a atividade de água é um fator dominante no controle da deterioração dos alimentos, pois o crescimento dos microorganismos é absolutamente dependente da disponibilidade de água livre. Assim, quanto menor for a atividade de água, menor será o número de grupos microbianos capazes de crescer nesse produto e menor será sua velocidade de multiplicação, retardando a deterioração. Adambounou et al. (1983) relata que o valor ótimo de atividade de água para o crescimento de microorganismos encontra-se entre 0,92 e 0,99.

4.7.5 Análise microbiológica

Um dos fatores limitantes na vida de prateleira de muitos produtos é o crescimento microbiano. Pela Figura 4.31, é possível visualizar as fatias de pães de forma acondicionadas em três tipos embalagem (PEBD; GLU/GEL (1:4) e GLU/GEL (1:4) + 2 SORB) no 1º; 4º; 7º e 9º dia de armazenamento. Ao atingir o 9º dia, observou-se o aparecimento visível de fungos em todos os tratamentos, sendo então, encerrado o experimento.

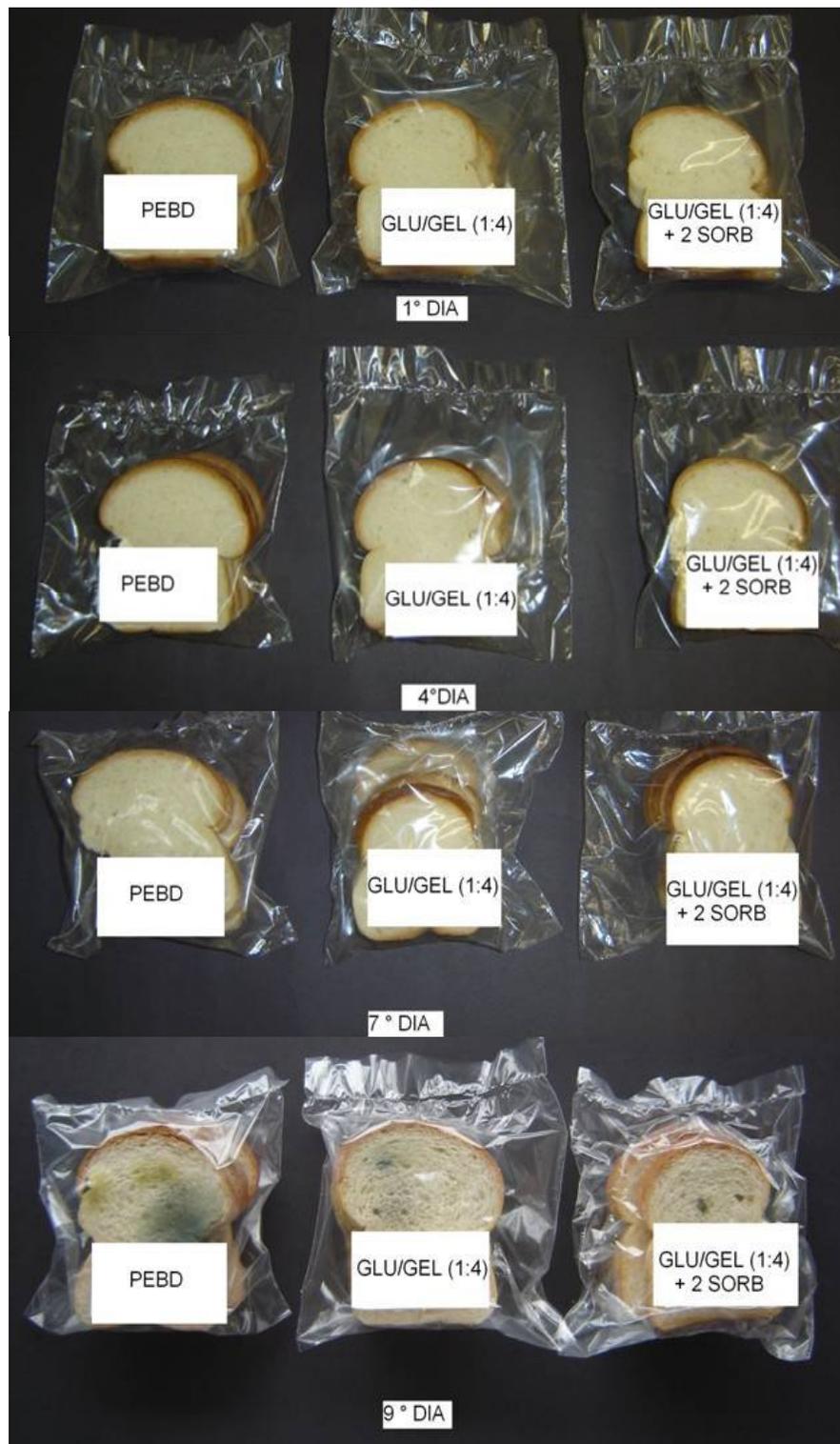


Figura 4.31. Aspecto das fatias de pães de forma acondicionados, durante a vida de prateleira.

Segunda a legislação vigente RDC 12 (ANVISA, 2001), atualmente, não existe limite para contagem de bolor e levedura em pão. Entretanto, baseada na legislação anterior a Portaria 451 (ANVISA, 1997), o limite de tolerância para pães é 5×10^3 UFC/g de bolores e leveduras. Os resultados das análises microbiológicas (Tabela 4.43), obtidos no tempo inicial (1º dia) para todos os tratamentos e no 4º dia para o tratamento PEBD e GLU/GEL 1:4 + 2% SORB, apresentam-se dentro dos padrões da legislação vigente. No 7º dia, para todos os tratamentos, a contagem obtida de bolores e leveduras foi superior ao limite de tolerância permitido.

Tabela 4.43. Contagem total de bolores e leveduras em fatias de pães-de-forma acondicionadas, durante o armazenamento.

DIAS	PEBD	GLU/GEL 1:4	GLU/GEL 1:4 + 2% SORB
Contagem de bolores e leveduras (UFC/g)*			
1º	1×10^{cA}	1×10^{cA}	1×10^{bA}
4º	$4,57 \times 10^{2 bA}$	$9,33 \times 10^{3 bA}$	$1,54 \times 10^{2 bB}$
7º	$5,24 \times 10^{5 aA}$	$6,02 \times 10^{5 aA}$	$9,12 \times 10^{4 aA}$

*Média aritmética das replicatas. Nota: letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas na mesma amostra, enquanto letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre médias obtidas de diferentes amostras, por meio do teste TUKEY. GEL= gelatina; GLU= glúten, SORB= sorbato de potássio, PEBD= polietileno de baixa densidade.

Durante os sete dias de monitoramento, foi observado (Tabela 4.43) um aumento significativo ($p \leq 0,05$) no número de unidades formadoras de colônias (UFC/g), para os tratamentos de PEBD e GLU/GEL 1:4. Para o tratamento GLU/GEL 1:4 + 2% SORB, não foi observada diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o 1 e 4º dia.

O aumento do tempo de armazenamento provocou uma elevação na contagem de bolores e leveduras dos pães, sendo maior no último dia de análise (7º dia), porém não diferindo ($p \leq 0,05$) entre si com relação ao tipo de tratamento utilizado. O único dia em que foi observada diferença significativa foi no 4º dia,

quando o tratamento GLU/GEL 1:4 + 2% SORB apresentou uma redução no número de bolores e leveduras quando comparado aos demais.

Soares et al. (2002) estudaram o efeito do sorbato de potássio em filmes de acetato de celulose em retardar o crescimento microbiano de pães. Os autores observaram crescimento inicial de 4 log UFC/g e, ao final de 14 dias, um crescimento em torno de 7 log UFC/g. Os filmes elaborados com 4% de sorbato de potássio tiveram um desempenho um pouco melhor que os demais. Não foi possível verificar se o resultado observado no uso de filmes com 4% de sorbato foi significativamente melhor que os demais, pois os autores não fizeram análise estatística dos dados. Porém, pelo aspecto visual foi possível observar uma inibição do crescimento de bolores com o uso dos filmes ativos.

Apesar do filme de GLU/GEL + 2% SORB ter se mostrado eficiente no ensaio de difusão em halo, ao ser usado no acondicionamento de pães de forma não apresentou o mesmo desempenho. Isso provavelmente ocorreu em virtude das variáveis adicionais envolvidas na etapa de acondicionamento, as quais não estavam presentes no teste de difusão em halo, tais como: manipulação do padeiro, contaminação das matérias-primas utilizadas e do próprio ambiente de preparo e acondicionamento, variação de temperatura durante a vida de prateleira, diversidade de microbiota presente no pão, etc.

4.7.6 Extração e quantificação de sorbato de potássio

Na Tabela 4.44, é possível observar a quantidade de sorbato de potássio liberada em 45 g de pão de forma. Segundo a resolução n°4 (ANVISA, 1988), a quantidade de sorbato permitida em produtos de panificação é de 0,1% (sorbato/100g), ou seja, é permitido 0,045 g de sorbato de potássio em 45 g de pão.

Tabela 4. 44. Quantificação de sorbato de potássio em 45 g de pão de forma, durante o armazenamento.

DIAS	GLU/GEL 1:4 + 2% SORB
Gramas de sorbato de potássio/45g de pão de forma	
1°	0,000585 ± 0,000001 ^c
4°	0,004027 ± 0,000005 ^b
7°	0,045225 ± 0,00010 ^a

*Média aritmética e erro padrão das replicatas. Nota: letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas na mesma amostra, por meio do teste TUKEY. GEL= gelatina; GLU= glúten, SORB= sorbato de potássio.

A quantidade de sorbato de potássio presente na embalagem (45 g) apresentou um aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) durante a vida de prateleira, variando de 0,000585; 0,004027 e 0,045225, no 1°, 4° e 7° dia de armazenamento, respectivamente. Assim, a quantidade de sorbato liberada no 7° dia chegou ao limite permitido pela legislação.

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que, apesar dos filmes ativos terem apresentado um bom desempenho no teste de difusão, ao serem aplicados no produto, mesmo liberando a máxima concentração permitida na legislação, não propiciaram extensão na vida de prateleira.

5.0 Conclusões

A metodologia desenvolvida neste trabalho de pesquisa permitiu a elaboração e a caracterização de filmes compostos ativos, bem como sua aplicação no acondicionamento de pães-de-fôrma.

A seguir, são apresentadas as principais conclusões envolvendo essas características.

1. Entre os biofilmes simples de gelatina desenvolvidos, o elaborado com 10 g de gelatina e 5% de glicerol apresentou menores valores de permeabilidade ao vapor de água (5,38 gmm/m²diakPa) e maior de resistência à tração (90,73 MPa).
2. Utilizando a metodologia de superfície de resposta, foi possível selecionar a formulação formadora de filme simples à base de glúten elaborada com 5 g desse biopolímero, 32,5 mL de etanol/100mL de solução, pH 5 e 20% glicerol, para as etapas posteriores, que apresentou facilidade de elaboração e melhores propriedades de barreiras que as demais.
3. Os filmes compostos selecionados em relação à permeabilidade ao vapor de água e resistência à tração foram: (i) GLU/GEL 1:4 (4,46 gmm/m²diakPa e 34,11 MPa); (ii) AMM/GEL 1:4 (4,98 gmm/m²diakPa e 158,62 MPa); (iii) AMC/GEL 1:4 (4,30 gmm/m²diakPa e 87,88 MPa) e (iv) AMM/GEL/GLU 1:1:1 (3,09 gmm/m²diakPa e 76,35 MPa).
4. Os fungos isolados e identificados no pão de forma foram: (i) *Eurotium chevalieri*; (ii) *Eurotium amstelodami*; (iii) *Wallemia sepii*, (iv) *Penicillium raistrickii* e (v) *Cladosporium sp.*

5. Os filmes ativos elaborados com 2 e 4% (p/v) de sorbato de potássio em solução mostraram-se manuseáveis e visivelmente homogêneos. A adição de sorbato de potássio provocou aumento na permeabilidade ao vapor de água, na solubilidade em água e na porcentagem de alongação e uma redução na resistência à tração de todos os filmes compostos. A adição de sorbato de potássio não provocou alteração na permeabilidade ao oxigênio dos filmes.

6. As superfícies dos filmes compostos ativos desenvolvidos mostraram-se lisas e homogêneas, com exceção dos filmes de GLU/GEL e AMM/GLU/GEL, ambos com 4% de sorbato de potássio. A secção transversal apresentou-se compacta, com a presença de estrias. O filme de AMM/GLU/GEL com 4% de sorbato revelou uma secção transversal irregular e descontínua.

7. O filme que apresentou maior eficiência na redução do crescimento dos fungos isolados foi: GLU/GEL com 2% de sorbato.

8. A aplicação do filme GLU/GEL 1:4 sem e com 2% de sorbato — intercalados entre as fatias de pão justapostas e colocadas em sacos de polietileno de baixa densidade (PEBD) — provocou um aumento da dureza (gf); diminuição da umidade e atividade de água, quando comparado ao controle (apenas PEBD). No último dia de verificação (7° dia), a análise microbiológica (contagem total de bolores e leveduras) extrapolou o limite máximo permitido para todas as aplicações. Portanto, estes filmes não foram eficientes na extensão da vida útil do produto.

6.0 Sugestões para trabalhos futuros

- Avaliar outros agentes antimicrobianos.
- Testar outros tipos de materiais poliméricos para avaliar a difusão do agente antimicrobiano.
- Estudar a aplicação dos filmes ativos em outros alimentos.

7.0 Referências Bibliográficas

AACC – AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Bread Firmness by Universal Testing Machine**, Method 74-09, v. 1, p. 1-7, 1995a.

AACC – AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Moisture-air-oven methods**, Method 44-15A, v. 1, p. 1-4, 1995b.

ADAMBOUNOU, T.L., CASTAIGNE, F., DILLON, J.C. Abaissement de l'activité de l'eau de légumes tropicaux par déshydratation osmotique partielle. **Sciences des Aliments**, Paris: Lavoisier Abonnements, v.3, n. 4, p. 551-567, 1983.

AKIN, H; HASIRCI, N. Preparation and characterization of crosslinked gelatin microspheres. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 58, p. 95-100, 1995.

ALVES, V. D.; MALI, S. M.; BELÉIA, A.; GROSSMAN, M. V. E. Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 941-946, 2007.

ANTUNES, A. J.; CANHOS, V. P. **Aditivos em Alimentos–Série Tecnologia Agroindustrial**. Governo do Estado de São Paulo; Secretária da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia – Coordenadoria da Indústria e Comércio. São Paulo, 1985.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Portaria Nº 451, de 19 de setembro de 1997. Disponível em http://www.pgsys.com.br/links/p_451_1.htm. Acesso 08/02/2008

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução nº4 de 24 de novembro de 1988. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18839&word=/> Acesso em 08/02/2008.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144>. Acesso 18/07/2008

APOTEK-**Tecnologia em embalagens**. Disponível em:<http://www.apotek.com.br/>. Acesso em :01/02/2006

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J.H. Review of antimicrobial food packaging **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, p. 113-126, 2002.

ARVANITOYANNIS, I. S.; NAKAYAMA, A; AIBA, S Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. **Carbohydrate Polymer**, v. 37, p. 371- 382, 1997.

ARVANITOYANNIS, I. S.; PSOMIADOU, E.; NAKAYAMA, A. Edible films made from sodium caseinate, starches, sugars or glycerol. Part 1. **Carbohydrate Polymer**, v. 31, n. 4, p. 179-192, 1996.

ASSIS, O. B. G.; LEONI, A. M. Filmes comestíveis de quitosana. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 30, jan/junho, p. 33-38, 2003.

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, p. 1177-1182, 1990.

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

ASTM. Tensile properties of thin plastic sheeting. **Annual Book of ASTM Standards**, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, D 882-83, 1995b.

AYRANCI, E.; ÇETIN, E. The effect of protein isolate of *Pistacia terebinthus* L. on moisture transfer properties of cellulose-based edible films. **Lebensmittel-Wissenschaft-und-Technologie**, v. 28, n. 2, p. 241-244, 1995.

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

BANKER, G. S. Film coating theory and pratice. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 55, p. 81-92, 1966.

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.

BENGTSSON, M.; KOCH, K.; GATENHOLM, P. Suface octanoylation of high-amylose potato starch films. **Carbohydrate Polymer**, v. 54, p. 1-11, 2003.

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

BERTAN, L. C.; TANADA-PALMU, P. S.; SIANI, A. C.; GROSSO, C. R. F. Effect of fatty acids and 'Brazilian elemi' on composite films based on gelatin. **Food Hydrocolloids**, v.19, n.1, p.73-82, 2005.

- BERTUZZI, M. A; ARMADA, M.; GOTTIFREDI, J. C. Physicochemical characterization of starch based films. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p. 17-25, 2007.
- 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.
- BILIADERIS, C G The structure and interactions of starch with food. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 69, p. 60-78, 1991.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**. Livraria Varela, 3° Ed., p. 100, 2001.
- BODMEIER, R.; PAERATAKUL, O. Plasticizer uptake by aqueous colloidal polymer dispersions used for the coating of solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v.152, p.17-26, 1997.
- BUTLER, B.L.; VERGANO, P. J.; TESTIN, R. F.; BUNN, J.M. WILES, J. L. Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 5, p. 953-958, 1996.
- CAO, N.; FU, Y.; HE, J. Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 21,n. 7, p. 1153-1162, 2007.
- 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.
- CARVALHO, R.A.; GROSSO, C. R. F. Efeito do tratamento térmico e enzimático nas propriedades de filmes de gelatina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, jul-set, p. 495-501, 2006a.
- CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F Properties of chemically modified gelatin films. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 01, p. 45-53, 2006b.
- CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Characterization on gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 717-726, 2004
- CARVALHO, R. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes à base de gelatina**, Tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 1997.
- CHANG, Y. P.; CHEAH, P. B.; SEOW, C. C. Plasticizing-antiplasticizing effects of water on physical properties of tapioca starch films in glass state, **Journal Food Science**, v. 65, n. 3, p. 445-451, 2000.

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

CHEN, M-C; YEH, G. H-C; CHIANG, B-H. Antimicrobial and physicochemical properties of methycellulose and chitosan films containing a preservative. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 20, p. 379-390, 1996

CHERIAN, G.; GENNADIOS, A; WELLER, C.; CHINACHOTI, P. Thermo mechanical behavior of wheat films: Effects of sucrose, glycerin, and sorbitol. **Cereal Chemistry**, v. 72, n. 1, p. 1-6, 1995.

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

CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Edible packaging film based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 6, p. 1369-1374, 1995.

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

CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Rheological Model for the mechanical properties of myofibrillar protein-based films. **Journal of Food Science**, v. 44, n.4, p. 1116-1122, 1996b.

CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n.3, p. 622-626, 1997.

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

DE McHUGH, T. H.; KROCHTA, J.M. Permeability properties of edible films 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, 1994b.

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

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

DEVLIEGHERE; F; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, v.14, p. 273-285, 2004

DOANE, W. M. USDA Research on starch-based biodegradable plastics. **Starch/ Stärke**, v. 42, p. 293-303, 1992.

DOLE, P.; JOLY, C.; ESPUCHE, E.; ALRIC, I.; GONTARD, N. Gas transport properties of starch based films. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 335-342, 2004.

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

DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. American Public Health Association, 2001.

ESTELLER, M. S.; LANNES, S. C. S. Parâmetros complementares para fixação de identidade e qualidade de produtos panificados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 802-806, 2005.

ESTELLER, M. S.; YOSHIMOTO, R. M. de O. Uso de açúcares em produtos panificados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 602-607, 2004.

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

FAKHOURI, F. M.; BATISTA, J. A.; GROSSO, C. R. F. Desenvolvimento e caracterização de filmes comestíveis de gelatina, triacetina e ácidos graxos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 301-308, 2003.

FAMÁ, L.; FLORES, S. K.; GERSCHENSON, L.; GOYANES, S. Physical characterization of cassava starch biofilms with special reference to dynamic mechanical properties at low temperatures. **Carbohydrate Polymer**, v. 66, p. 8-15, 2006.

FAMÁ, L.; ROJAS, A. R.; GOYANES, S. GERSCHENSON, L. Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbate. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 38, p. 631-639, 2005.

FERRY, J D **Viscoelastic properties of polymers**, 3ªEd. New York, John Wiley & Sons, p.641, 1980.

FLORES, S.; FAMÁ, L.; ROJAS, A. M.; GOYANES, S.; GERSCHENSON, L. Physical properties of tapioca-starch edible films: influence of filmmaking and potassium sorbate. **Food Research International**, v. 40, p. 257-265, 2007.

FORSSELL, P. M.; MIKKILÄ, J. M.; MOATES, G. K.; Parker, R. Phase and glass transition behavior of concentrated barley starch-glycerol-water mixtures, a model for thermoplastic starch. **Carbohydrate Polymers**, vol. 34, p. 275-282, 1997

FRAGA, K. F.; SOARES, N. F. F.; SANTOS, M. M.S.; FONTES, E. A. F.; PEREIRA, R. M.; MELO, N. R. Avaliação da migração de natamicina dos filmes antimicrobianos para a superfície de queijo tipo Gorgonzola. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, JUIZ DE FORA-MG, v. 61, n. 351, p. 12-16, 2005.

FRITZ, H. G. SEICENDSTUCKER, T., BOLZ. U.; JUZA, M.; SCHROETER, T; ENDRES, H. J. Study on production of thermoplastics and fibers based mainly on biological materials. **Science Research Development**, European Commision, EUR 16102, 1994.

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

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

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

GARCIA, V.; COLONNA, P. BOUCHET, B.; GALLANT, D. J. Structural changes of cassava starch granules after heating at intermediate water contents. **Starch/Stärke**, v. 49, n. 5, p. 171-179, 1997.

GENNADIOS, A; WELLER, C. L. Edible film and coatings from wheat and corn proteins. **Food Technology**, v 44, n 10, p. 63-69, 1990.

GENNADIOS, A; BRANDENBURG, A; WELLER, C; TESTIN, R.F. Effect of pH of wheat gluten and soy protein isolate. **Food Chemistry**, 41, p. 1835-1839, 1993.

GENNADIOS, A.; MCHUGH, T. H.; WELLER, C. L.; KROCHTA, J. M. Edible coating and films based on proteins, in: **Edible coatings to improve food quality**, Krotcha J. M., Baldwin E. A. & Nisperos-Carriedo M.O., Technomic Publishing Company, Ch 9, p. 201-277, 1994.

GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; HANNA, M. A.; FRONING, G.W.; Mechanical and barrier properties of eggs albumen films. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 3, p. 585-589, 1996.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Edible wheat films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal Food Science**. v. 57, n. 1, p.190-199, 1992.

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

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

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

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

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

GOUVEIA, L. E. R.; MORAES, A R. F.; SOARES, N. F. F.; JOESSE, M A T K PEREIRA; R. M.; GONÇALVES, M. P. J. C.; MINIM, V. P. R. Desenvolvimento e avaliação de filmes ativos aromatizado na incorporação de sabor de ricota. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora-MG, v. 61, n. 351, p. 138-141, 2006.

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

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

HALL, G. M. **Methods of testing protein functionality**. London. Blackie Academic. & Professional, p.11-53, 1996.

HAN, J. H. Antimicrobial food packaging. **Food Technology**, v. 54, n. 3, p. 56-65, 2000.

HAN, J. H; FLOROS, J. D. Casting antimicrobial packaging films and measure their physical properties and antibacterial activity. **Journal of Plastic Film & Sheeting**, v. 13, p. 287-298, 1997.

HANDA, A; GENNADIOS, A; HANNA, M.A.; WELLER, C L; KURODA, N. Physical and molecular properties of egg-white lipids films. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 5, p. 860-864, 1999.

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; VILLALOBOS, R.; CHIRALT, A. Effect of thermal treatments on functional properties of edible films made from wheat gluten fractions. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 647-654, 2004.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 4ªEd. Chapman & Hall. New York, p. 701, 1992.

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

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

KASARDA, D. D.; NIMMO, C. C; KOHLER, G. O Principal chemical components of wheat and flour. In **Wheat Chemistry and Technology**, Pomeranz, Y. American Association of Cereal Chemists Inc., p.227, 1971.

KAYSERILIOGLU, B. S.; BAKIR, U.; YILMAZ, L.; AKKAS, N. Drying temperature and relative humidity effects on wheat gluten films properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 964-968,2003

KAYSERILIOGLU, B. S.; STEVELS, W. M.; MULDER, W. J.; AKKAS, N. Mechanical and biochemical characterization of wheat gluten films as a function of pH and co-solvent. **Starch/Stärke**,. v. 53, p.381-386, 2001.

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

KIM, M; LEE, S. J. Characteristics of crosslinked potato and starch-filled linear low-density polyethylene films. **Carbohydrate Polymer**, v. 50, p. 331-3337, 2002

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

KRISTO, E.; KOUTSOUMANIS, K. P.; BILIADEIRS, C. G. Thermal, mechanical and water barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 373-386, 2008.

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

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

LABUZA, T. P.; HYMAN, C. R. Moisture migration and control in multi-domain foods. **Trends Food Science Technology**, v. 9, p. 47-55, 1998.

LAROTONDA, F. D. S.; MATSUI, K. N.; SOLDI, V.; LAURINDO, J. B. Biodegradable films made from raw and acetylated cassava starch, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 3, Curitiba, 2004.

LEINER DAVIS GELATIN. Características, estruturas e aplicações de gelatina e interações com hidrocolóides polissacarídeos. **Technical Bulletin**, nov. 1994.

LIM, L. T.; MINEY, Y.; TUNG, A. Transglutaminase cross-linked egg white proteins films: tensile properties and oxygen permeability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n.10, p. 4022-4029, 1998.

LIMJAROEN, P.; RYSER, E., LOCKHART, H.; HARTE, B. Development of a food packaging coating material with antimicrobial properties. **Journal of Plastic Film & Sheeting**, v. 19, p. 95-109, 2003.

LOURDIN, D.; DELLA-VALLE, G.; COLONNA, P. Influence of amylose content on starch films and foams. **Carbohydrate Polymer**, v. 27, p. 261-270, 1995.

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

MALI, S.; GROSSMANN, M.V.E.; GARCIA, M.A.; MARTINO, M.N.; ZARITZKY, N.E. Microstructural characterization of yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, 379-386, 2002.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, 129-135, 2004.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V .E.; GARCIA, M. A.; MARTINO, M.N.; ZARITZKY, N. E. Effects of controlled on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch source. **Journal Food Engineering**, v 75, n. 4, p. 453-460, 2006.

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

MICARD, V.; BELAMRI, R.; MOREL, M.-H.; GUILBERT, S. Properties of chemically and physically treated wheat gluten films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48n.4, p.2948-2953, 2000.

MING, X; WEBER, G. H; AYRES, J. W.; SANDINE, W. E. Bacteriocins applied to food packaging material to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 2, p.413-415, 1997.

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

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

OZDEMIR, M.; FLOROS, J. D. Analysis and modeling of potassium sorbate diffusion through edible whey protein films. **Journal of Food Engineering**, v. 47, p. 149-155, 2001.

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

PARK, H. J.; WELLER, C. L.; VERGANO, P. J. TESTIN, R. F. Permeability and mechanical properties of cellulose-based edible films. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 6, p. 1361-1364, 1993.

PAZ, H. M.; GUILLARD, V.; REYNES, M.; GONTARD, N. Ethylene permeability of wheat gluten film as a function of temperature and relative humidity. **Journal Membrane Science**, v. 256, p. 108-115, 2005.

PEREIRA, R. M.; SOARES, N. F. F.; FONTES, E. R. A F.; ANDRADE, N. J. de RAMOS, N. M.; FRAGA, K. de F. Avaliação e desenvolvimento de filme antimicrobiano laminado na conservação de queijo tipo gorgonzola. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 60, n. 345, p. 292-294, 2005.

PEREIRA, R. M.; BOTREL, D. A.; FRAGA, K. de F.; SOARES, N. F. F.; FONTES, E. A. F. . Avaliação da qualidade de queijo tipo Gorgonzola envolvido com filme antimicrobiano laminado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 61, n. 351, p. 144-147, 2006.

PERESSINI, D.; BRAVIN, B.; LAPASIN, R.; RIZZOTTI, C.; SENSIDORI, A Starch-methylcellulose based edible films: rheological properties of film-forming dispersions. **Journal of Food Engineering**, v.59, p. 25-32, 2003.

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

PETERSSON, M; STANDING, M. Water vapour permeability and mechanical properties of mixed starch-monoglyceride films and effect of film forming conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 123-132, 2005.

PIRES, A. C. S.; GONÇALVES, M. P. J C; PINTO, C. L O; SOARES, N. F. F. Qualidade microbiológica do queijo tipo cottage para desenvolvimento de embalagem ativa. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, JUIZ DE FORA-MG, V. 61, N. 351, P. 130-132, 2006.

PITT, J. I. **Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species**. Sydney: Common weath Scientific and Industrial research organization, p. 187, 1988.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food spoilage**. London: Blackie Academic & Professional, p. 593, 1999.

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

POPPE, J. Gelatin, In: **Thickening and Gelling Agents for Food**, New York. Ed. Alan Imeson, Blackie Academic & Professional, Ch. 7, p 144-168, 1987.

PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K. ; SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporation garlic oil, potassium sorbate and nisin. **Lebensmittel-Wissenschaft-und-Technologie**, v. 38, p. 859-865, 2005.

QUINTAVALLA, S. VICINI, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. **Meat Science**, v. 62, p. 373-380, 2002.

RHIM, J. W. Physical and mechanical properties of water resistant sodium films. **Lebensmittel-Wissenschaft-und-Technologie**, v. 37, p. 323-330, 2004.

ROMERO-BATISTA, C. A; BELLO-PÉREZ, L A; GARCIA, M A; MARTINO, M. N.; SOLORZA-FERIA, J; ZARITZKY, N. E. Physicochemical and microstructural characterization of films prepared by thermal and cold gelatinization from non-conventinal sources of starches. **Carbohydrate Polymer**, v. 60, p. 235-244, 2005.

ROY, S; WELLER, C.L.; GENNADIOS, A; ZEECE, M. G.; TESTIN, R.F. Physical and molecular properties of wheat gluten cast from heated film-forming solutions. **Journal of Food Science**, v 64, n1, p. 57-60, 1999.

SAKANAKA, L. S. **Confecção de filmes biodegradáveis por extrusão de blendas de amido termoplástico e polibutileno succinato-co-adipato (PBSA)**. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Centro de Ciências Agrárias, Londrina, 2007.

SAMSON, R. A. HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. ; FILTRENBORG, O. **Introduction to Food-borne Fungi**. 5 edition, Ed. Baarn, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, p. 322, 1996.

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.

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

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

SILVEIRA, M. F. A **Filmes antimicrobianos com ácido sórbico na conservação de massa de pastel**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa, 2005.

SILVEIRA, M. F. A; SOARES, N. F.; GERALDINE, R. M.; ANDRADE, N. J.; GONÇALVES, M. P. J. Antimicrobial efficiency and sorbic acid migration from active films into pastry dough. **Packaging Technology and Science**, v. 20, n. 4, p. 287-292, 2007.

SIQUEIRA, S. **Embalagem comestível: uma opção ecologicamente correta**. Disponível: <[http: www.ipen.br/scs/orbita/2001_7_08/filmes.htm](http://www.ipen.br/scs/orbita/2001_7_08/filmes.htm)>. Acesso em: 27/09/2004.

SIRAGUSA, G. R.; DICKINSON, J. S. Inhibition of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella thyphimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef muscle tissue lactic or acetic acid contained in calcium alginate gels. **Journal of Food Safety**, v.13, n. 2, p. 147-158, 1993.

SOARES, N. F. F; RUTISHAUSER, D. M.; MELO, N.; CRUZ, R. S.; ANDRADE N. J. Inhibition of microbial growth in bread through active packaging. **Packaging Technology and Science**, v. 15, p. 129-132, 2002.

SOBRAL, P. J. A. Propriedades funcionais de gelatina em função da espessura. **Ciência e Engenharia**, Uberlândia, v.8; n.1; p.60-67, 1999.

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. Transição vítrea em gelatina de couro bovino. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 36, n. 1, jan-jun, p. 35-42, 2002.

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

SOTHORNVIT, R; PITAK, N. Oxygen permeability and mechanical properties of banana films. **Food Research International**, v. 40, p. 365-370, 2007.

SUN, S.; SONG, Y.; ZHENG, Q. Morphologies and properties of thermo-molded biodegradable plastics based on glycerol-plasticized wheat gluten. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1005-1013, 2007.

TALJA, R. A.; HELÉN, H.; ROSS, Y. H.; JOUPPILA, K. Effect of various polyols and polyol contents on physical and mechanical properties of potato starch-based films. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 288-295, 2007.

TALJA, R. A.; HELÉN, H.; ROSS, Y. H.; JOUPPILA, K. Effect of type and content of binary polyol mixtures on physical and mechanical properties of starch-based edible films. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 269-276, 2008.

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

TANADA-PALMU, P. S.; GROSSO, C. R. F. Development and characterization of edible films based on gluten from semi-hard and soft Brazilian wheat flours (development of films based on glúten from wheat flours). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 23, n. 2, 2003.

TANADA-PALMU, P. S.; GROSSO, C. R. F. Edible wheat gluten films: development, mechanical and barrier properties and application to strawberries (*Fragaria ananassa*). **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA)**, v. 20, n. 2, p. 291-308, 2002.

TANADA-PALMU. P. S.; FAHKOURI, F. M.; GROSSO, C. R. F. Filmes biodegradáveis. **BioTecnologia Ciência & Desenvolvimento**, ano V, n. 26, maio/junho, p. 12-17, 2002.

TANIWAKI, M. H; SILVA, N. da. **Fungos em alimentos- Ocorrência e detecção** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas- SP, 2001.

TAPIA-BLÁCIDO, D; SOBRAL, P.J.; MENEGALLI, F. C. Development and characterization of biofilms based on Amaranth flour (*Amaranthus caudatus*). **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 215-223, 2005.

TORRES, J. A. Edible films and coatings from proteins. In: HETTIARACHCHY, N. S. e ZIEGLER, G. R. (eds). **Protein Functionality in Food Systems**, New York: Marcel Dekker, Inc., p. 467-507, 1994.

VANIN, F. M.; SOBRAL, P. J. A; MENEGALLI, F.C.; CARVALHO, R.A.; HABITANTE, A. M. Q. B. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 5, p. 899-907, 2005.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHIERE, F.; VAN BEEST, M.; KRUIJF, N.; DEBEVERE, J. Development in the active packaging of Foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 77-86, 1999.

VICENTINI, N. M. **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso pós-colheita**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual de São Paulo, 2003.

VILPOUX, O; AVEROUS, L. Plástico a base de amido. Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas. In: CEREDA, M. P. **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas**, São Paulo: Fundação Cargill, (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v.3), 2001

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

WURZBURG, O B. Modified starches: properties and uses: **CRC Press Inc.**, Boca Raton, p. 277, 1986

XIONG, Y. L. Myofibrillar protein from different muscle fiber types: implications of biochemical and functional properties in meat processing. **CRC Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 34, n.3, p. 293-320, maio, 1994.

XU, Y X; KIM, K M; HANNA, M A; NAG, D. Chitosan-starch film: preparation and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 21, n. 2, p. 185-192, 2005

YE, M.; NEETOO, H.; CHEN, H. Control of *Listeria monocytogenes* on ham steak by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. **Food Microbiology**, v. 25, p. 260-268, 2008.

YOSHIDA, C. M. P. **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.

ZACTITI, E. M.; KIECKBUSCH, T. G. Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 462-467, 2006.