



ANDRÉA HELENA FERREIRA BRAGA

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
FILMES COACERVADOS À BASE DE
GELATINA/QUITOSANA, GELATINA/PECTINA E
GELATINA/GOMA ARÁBICA.**

Campinas –2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

Andréa Helena Ferreira Braga

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES
COACERVADOS À BASE DE GELATINA/QUITOSANA,
GELATINA/PECTINA E GELATINA/GOMA ARÁBICA.**

Orientador: Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Alimentos e Nutrição, na área de concentração de Consumo e Qualidade de Alimentos.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA ANDRÉA HELENA FERREIRA E ORIENTADA
PELO PROF. DR. CALOS RAIMUNDO FERREIRA GROSSO**

Assinatura do Orientador

Campinas

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Márcia Regina Garbelini Sevilano - CRB 8/3647

B73e Braga, Andréa Helena Ferreira, 1980-
Elaboração e caracterização de filmes coacervados à base de gelatina/quitosana, gelatina/pectina e gelatina/goma arábica / Andréa Helena Ferreira Braga. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Carlos Raimundo Ferreira Grosso.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Filmes biodegradáveis. 2. Coacervação complexa. 3. Gelatina. 4. Plastificante. 5. Potencial zeta. I. Grosso, Carlos Raimundo Ferreira, 1953-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Preparation and characterization of coacervates films on based gelatin/chitosan, gelatin/pectin and gelatin/gum arabic.

Palavras-chave em inglês:

Biodegradable films

Complex coacervation

Gelatin

Plasticizer

Zeta potential

Área de concentração: Consumo e Qualidade de Alimentos

Titulação: Doutora em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Carlos Raimundo Ferreira Grosso [Orientador]

Cristiana Maria Pedroso Yoshida

Florência Cecília Menegalli

Larissa Canhadas Bertan

Patrícia Sayuri Tanada Palmu

Data de defesa: 10-09-2013

Programa de Pós-Graduação: Alimentos e Nutrição

Banca Examinadora

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Orientador

Profa. Dra. Cristiana Maria Pedroso Yoshida

Membro Titular

Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Florência Cecília Menegalli

Membro Titular

FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Larissa Canhadas Bertan

Membro Titular

Universidade Federal da Fronteira Sul

Dra. Patrícia Sayuri Tanada Palmu

Membro Titular

Roasted Potato

Profa. Dra. Fadayde Matta Fakhouri

Membro Suplente

FEQ/UNICAMP

Profa. Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho

Membro Suplente

FZEA/USP

Profa. Dra. Tema Teixeira Franco

Membro Suplente

FEQ/UNICAMP

“Por isso não desanimamos; pelo contrário, mesmo que o nosso homem exterior se corrompa, contudo, o nosso homem interior se renova de dia em dia.

Porque a nossa leve e momentânea tribulação produz para nós peso de glória, acima de toda comparação, não atentando nós nas coisas que se vêem, mas nas que se não vêem; porque as que se vêem são temporais, e as que se não vêem são eternas.”

(2 Coríntios 4:16-18)

Dedico esta tese a Deus, pois muitas vezes achei que não tinha mais forças para terminar este trabalho e Senhor Jesus me ajudou dando força e me animando para concluir mais esta etapa em minha. Obrigada Senhor, A Ti toda Honra e toda Glória!

Agradecimentos

Todo especial ao meu orientador Carlos Raimundo Ferreira Grosso pela orientação, pela presença constante em todas as etapas do desenvolvimento da tese e pela motivação que muitas vezes me colocaram no caminho certo para a conclusão deste trabalho. Agradeço de coração pelo carinho, amizade e paciência e por entender muitas vezes minha situação.

Aos membros da banca de defesa, Cristiana Maria Pedroso Yoshida, Florência Cecília Menegalli, Larissa Canhadas Bertan, Patrícia Sayuri Tanada Palmu, Farayde Matta Fakhouri, Rosemary Aparecida de Carvalho e Telma Texeira Franco pela importante contribuição na redação deste trabalho, pelo tempo disponibilizado pela atenção.

À todos do Laboratório de Controle de Qualidade: Fernando, Noemi, Alda, Grasi, Flávia e Juliana pela força e pela amizade em todos os momentos. A Yara pela amizade, companherismo e pelo carinho que foi maracante por criar um clima bem familiar dentro do laboratório. A Gláucia e a Carol pela grande amizade e por tonar meus dias em Campinas muito especiais, agradeço pelas conversas, pelos almoços e pelo companherismo que foram solidificando uma amizade que creio que será por toda vida.

À Profa. Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho que me orientou muitas vezes na elaboração deste trabalho, agradeço pelo carinho, dedicação e pela amizade.

Ao técnico Francisco Carrara (CHICO) do Laboratório Instrumental do DEPAN pelo carinho, amizade e pela disposição em ajudar na parte prática da tese.

A todos os funcionários do DEPAN: Suzana, Eliana, Karla e Val pelo carinho. Em especial a Cidinha e a Fátima agradeço pela amizade sincera, pelas conversas e pelos almoços inesquecíveis.

Aos amigos do DEPAN: Mariana, Isabele, Alessandra, Iza e Paula pela amizade e pelos momentos de descontração.

A todos da secretaria de pós-graduação, em especial ao Marcos e ao Cosme por estarem sempre prontos para ajudar.

Aos amigos preciosos que Deus colocou em meu caminho que fizeram do meu percurso até aqui muito mais agradável e alegre, Joice, Ana Sílvia e Patrícia Trevisan.

Agradeço a Deus por ter colocado pessoas formidáveis que fizeram toda diferença na minha vida: Amanda, Bruna, Carol Ribeiro, Reinaldo, Leandro, Lucas, Kadu, Josi, Lívia, Luciana, Paola, Priscila, Thaty, Letícia, Dani, Bete e toda equipe do Projeto Sal da Terra. Em especial agradeço pela vida da Érica que foi muito mais que uma amiga que se assemelha a uma irmã, por ter me apoiado e me auxiliado até mesmo financeiramente quando precisei, obrigada por tudo amiga!

A Emmanuelle agradeço pelo cuidado, pelo amor, pelo companherismo, pela doçura, pelo apoio, por enxugar muitas vezes minhas lágrimas durante todo o meu processo de cura interior e exterior... você foi e sempre será uma irmã, uma destas pessoas que sempre carrego no pensamento.

Agradeço à minha nova família (Karla, Lucas, Lourdes e ao Braga) pelo apoio e carinho. Em especial a minha sogra pelas conversas e conselhos e o meu sogro por ter ajudado na tradução do resumo para o inglês.

Agradeço meus irmãos (Patrícia e Emerson) por fazerem parte da base que sustenta minha vida. Aos meus pais Nelson e Marilene agradeço pelo amor incondicional, pelo incentivo, pelo apoio em todos os momentos.

Agradeço ao meu esposo George por todo amor, companherismo, por tornar minha vida mais alegre e mais iluminada todos os dias. Obrigada por ser essa pessoa que sempre me motiva e abre os olhos para ver sempre que existem coisas maiores e melhores para minha vida, ou melhor, para nossas vidas.

A CNPQ pela concessão da bolsa de doutorado e da taxa de bancada, sem a qual não teria como realizar todo este estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xix
LISTA DE TABELAS	xxiii
ABSTRACT	xxvii
RESUMO GERAL	xxxii
1 introdução	3
1.1 Objetivos	5
1.1.1 Objetivos específicos.....	6
1.2 Estrutura da tese.....	6
1.3 Referências Bibliográficas.....	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Filmes Biodegradáveis	13
2.2 Biopolímeros Formadores de Filme	14
2.2.1 Proteínas	15
2.2.2 Polissacarídeos	21
2.2.3 Plastificante	29
2.2.4 Agente ajustador de pH e Solvente	33
2.3 Interação Proteína-Polissacarídeo	35
2.4 Filmes Complexos de Proteínas-Polissacarídeos	38
2.5 Características e Propriedades Funcionais dos filmes proteína- polissacarídeo.....	39
2.6 Referências Bibliográficas.....	42
3 FILMES BIODEGRADÁVEIS DE GELATINA E QUITOSANA ELABORADOS PELO MÉTODO DE COACERVAÇÃO COMPLEXA.	63
3.1 Introdução	65
3.2 Material e Métodos.....	68
3.2.1 Material.....	68
3.2.2 Preparação dos filmes	68
3.2.3 Potencial zeta	70
3.2.4 Aspecto Visual e Espessura	71

3.2.5	Propriedades Mecânicas	72
3.2.6	Permeabilidade ao vapor de água	72
3.2.7	Solubilidade em água	73
3.2.8	Opacidade	73
3.2.9	Difração de Raio-X	74
3.2.10	Espectroscopia de infravermelho.....	74
3.2.11	Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	74
3.2.12	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	75
3.2.13	Análise Estatística	75
3.3	Resultados e Discussão.....	75
3.3.1	Potencial Zeta.....	75
3.3.2	Aspecto Visual e Espessura	80
3.3.3	Efeito da proporção estequiométrica do filme coacervado	80
3.3.4	Efeito do método de coacervação nas propriedades funcionais dos filmes de GEL/QUI.....	88
3.4	Concentração do material polimérico	94
3.5	Efeito da adição do plastificante no filme coacervado.....	95
3.5.5	Aspecto Visual e Espessura	96
3.5.6	Propriedades Mecânicas	96
3.5.7	Opacidade	99
3.5.8	Permeabilidade ao vapor de água	102
3.5.9	Solubilidade em água	103
3.5.10	Difração de raio-X.....	105
3.5.11	FTIR.....	107
3.5.12	DSC.....	108
3.6	Conclusões	110
3.7	Referencias Bibliográficas.....	112
4	ESTUDO DA FORMAÇÃO DE FILMES COACERVADOS DE GELATINA E PECTINA.....	127
	Resumo.....	127
4.1	Introdução	128
4.2	Material e Métodos.....	130

4.2.1	Material.....	130
4.2.2	Preparação dos filmes.....	131
4.2.3	pH _{zeta}	132
4.2.4	Aspecto Visual e Opacidade.....	133
4.2.5	Propriedades Mecânicas.....	133
4.2.6	Permeabilidade ao vapor de água.....	134
4.2.7	Solubilidade em água.....	134
4.2.8	Difração de Raio-X.....	135
4.2.9	Espectroscopia de Infravermelho.....	135
4.2.10	Análise Estatística.....	135
4.3	Resultados e Discussão.....	136
4.3.1	Potencial Zeta.....	136
4.3.2	Aspecto Visual das soluções filmogênicas em pH de coacervação.....	139
4.3.3	Caracterização do filme coacervado.....	140
4.3.4	Efeito da adição do plastificante no filme coacervado.....	144
4.4	Conclusões.....	155
4.5	Referências Bibliográficas.....	156
5	FILMES COACERVADOS DE GELATINA E GOMA ARÁBICA.....	167
5.1	Introdução.....	168
5.2	Material e Métodos.....	171
5.2.1	Material.....	171
5.2.2	Preparação dos filmes.....	172
5.2.3	Potencial zeta.....	173
5.2.4	Aspecto Visual e Espessura.....	174
5.2.5	Opacidade.....	174
5.2.6	Propriedades Mecânicas.....	175
5.2.7	Permeabilidade ao vapor de água.....	175
5.2.8	Solubilidade em água.....	176
5.2.9	Difração de Raio-X.....	176
5.2.10	Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).....	177
5.2.11	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	177

5.2.12	Análise Estatística	177
5.3	Resultados e Discussão.....	178
5.3.1	Potencial Zeta.....	178
5.3.2	Efeito da proporção estequiométrica	180
5.3.3	Efeito do método de coacervação nas propriedades funcionais dos filmes de GEL/GAR	192
5.3.4	Concentração do material polimérico	198
5.3.5	Efeito da adição do plastificante no filme coacervado	201
5.4	Conclusão	213
5.5	Referencias Bibliográficas.....	215
6	Conclusão Geral	229
ANEXO - Efeito do tipo do agente ajustador de pH nos filmes coacervados de GEL/QUI.....		237
Material e Métodos.....		237
Material		237
Métodos		237
Produção dos filmes.....		238
<i>Resultados e Discussões</i>		238
Conclusão		243

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1. Estrutura química da cadeia de gelatina (Fonte: GUPTA & BOHIDAR, 2007).....	20
Figura 2. Estruturas moleculares da quitina e da quitosana (Fonte: GUPTA & BOHIDAR, 2007).	23
Figura 3. Estruturas moleculares da pectina com baixo teor de metoxilação (A) e com alto teor de metoxilação (B) (Fonte: FERNANDEZ, 2001).....	26
Figura 4. Estrutura química do glicerol.	32
Figura 5. Formação da triacetina a partir da acetilação do glicerol com ácido acético (Fonte: MOTA, SILVA & GONÇALVES, 2009).....	33
Figura 6. Tipos de interações entre proteínas e polissacarídeos. (Fonte: YE, 2008).....	36

Capítulo 3

Figura 7. Curva do potencial zeta da solução filmogênica do par polimérico GEL/QUI em função da variação do pH (titulação com NH_4OH) em diferentes proporções estequiométricas.	79
Figura 8. Caracterização microestrutural por difração de raio-X dos filmes controles de gelatina e quitosana e dos filmes coacervados de GEL/QUI (nas proporções 10:1 e 1:2).	86
Figura 9. Espectrometria de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) dos filme controle (gelatina e quitosana), filme coacervados de GEL/QUI nas proporções 10:1 e 1:2.	88
Figura 10. Efeito do método de coacervação nas propriedades funcionais nos filmes de GEL/QUI: tensão na ruptura – TR (a) e alongação – ELO (b).....	90
Figura 11. Efeito do método de coacervação nas propriedades funcionais nos filmes de GEL/QUI: permeabilidade ao vapor de água - PVA (a) e solubilidade em água – SOL (b).....	92

Figura 12. Caracterização microestrutural por difração de raio-X e morfológica por Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) do filme coacervado (A) e do filme composto (B) de GEL/QUI (10:1). 93

Figura 13. Caracterização microestrutural por difração de raio-X dos filmes coacervados de GEL/QUI (10:1), sendo que em: (1) 0% de plastificante, (2) 20% de triacetina e (3) 25% de glicerol. 106

Figura 14. Espectrometria de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) do filme coacervado de GEL/QUI, sendo que em: (1) 0% de plastificante, (2) 25% de glicerol e (3) 20% triacetina. 108

Capítulo 4

Figura 15. Curva do potencial zeta da solução filmogênica do par polimérico GEL/PEC em função da variação do pH (titulação com HCl) em diferentes proporções estequiométricas. 138

Figura 16. Imagens das soluções filmogênicas de GEL/PEC elaborados pelo método de coacervação (pH_{zeta}), em diferentes proporções estequiométricas. 140

Figura 17. Espectrometria de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) do filme coacervado de GEL/PEC e dos filmes simples de GEL e PEC. 144

Figura 18. Caracterização microestrutural por difração de raio-X dos filmes coacervados de GEL/PEC, sendo que em: (1) 10% de glicerol, (2) 10% de triacetina e (3) sem plastificante. 153

Figura 19. Espectrometria de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) do filme coacervado de GEL/PEC sem plastificante (0%) e contendo 10% de triacetina (TRI) e 10% de glicerol (GLI). 154

Capítulo 5

Figura 20. Curva do potencial zeta da solução filmogênica do par polimérico GEL/GAR em função da variação do pH (titulação com HCl) em diferentes proporções estequiométricas. 180

Figura 21. Caracterização microestrutural por difração de raio-X dos filmes coacervados em diferentes proporções estequiométricas de GEL/GAR: (1) 1:1, (2) 10:1, (3) 20:1 e (4) 1:0 – controle gelatina.	188
Figura 22. Espectrometria de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) dos filmes simples de gelatina (a), filme coacervados de GEL/GAR nas proporções 1:1 (b) e 10:1 (c).....	192
Figura 23. Efeito do método de coacervação nas propriedades funcionais nos filmes de GEL/GAR: tensão na ruptura – TR (a), alongação – ELO (b), solubilidade em água – SOL (c) e permeabilidade ao vapor de água – PVA (d). 195	195
Figura 24. Caracterização microestrutural por difração de raio-X do filme de GEL/GAR (10:1) coacervados (a) e do filme composto de GEL/GAR (10:1) (b). 197	197
Figura 25. Efeito do tipo de plastificante (glicerol ou triacetina) na opacidade dos filmes coacervados testados em várias concentrações.....	202
Figura 26. Caracterização microestrutural por difração de raio-X dos filmes de GEL/GAR coacervados (a) adicionados de 10% de glicerol (b) e 10% de triacetina (c).....	210
Figura 27. Espectrometria de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) dos filmes coacervados de GEL/GAR (a) adicionados de 10% de glicerol (b) e 10% de triacetina (c).....	211

ANEXO

Figura 28. Efeito do tipo de agente ajustador de pH (NaOH/NH ₄ OH) no ζ-potencial zeta das soluções filmogênicas de GEL/QUI em diferentes valores de pH (5,0; 5,5; 6,0 e 6,5).	239
Figura 29. Microscopia ótica dos filmes coacervados de GEL/QUI nas seguintes concentrações: (A) 4:1 de GEL/QUI; (B) 2:1 de GEL/QUI; (C) 1:1 de GEL/QUI e (D) 1:2 de GEL/QUI, elaborados com NaOH.	241

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1. Composição de aminoácidos das gelatinas tipo A e tipo B..... 19

Capítulo 3

Tabela 2. Composição dos filmes de GEL/QUI. 70

Tabela 3. Efeito da proporção estequiométrica entre os biopolímeros (gelatina - GEL e quitosana - QUI) nas propriedades mecânicas (TR - tensão na ruptura) e na (ELO - alongação) dos filmes coacervados (pH_{zeta})..... 82

Tabela 4. Efeito da proporção estequiométrica nas propriedades funcionais (PVA, SOL e UMI) dos filmes coacervados de GEL/QUI (pH_{zeta})..... 84

Tabela 5. Efeito da concentração de material polimérico total (C_{pol}) dos filmes coacervados de GEL/QUI (10:1) em suas propriedades funcionais (TR, ELO, PVA, SOL e UMI). 95

Tabela 6. Efeito da concentração de plastificante (C_p) na propriedade mecânica (tensão na ruptura – TR e alongação – ELO) e na opacidade (Op) do filme coacervado de GEL/QUI elaborados com triacetina (TRI) e glicerol (GLI), como agente plastificante..... 101

Tabela 7. Efeito da concentração de plastificante (C_p) nas propriedades funcionais: permeabilidade ao vapor de água (PVA) e solubilidade em água (SOL) do filme coacervado de GEL/QUI elaborados com triacetina (TRI) e glicerol (GLI), como agente plastificante..... 105

Tabela 8. Efeito da concentração de plastificante (C_p) e do tipo de plastificante (glicerol ou triacetina) sobre a temperatura de transição vítrea (T_g) e a entalpia de fusão (ΔH) do filme coacervado de GEL/QUI. 110

Capítulo 4

Tabela 9. Composição dos filmes de GEL/PEC. 132

Tabela 10. Propriedades funcionais dos filmes coacervados de GEL/PEC (20:1) e dos filmes de GEL e de PEC. 142

Tabela 11. Efeito da concentração de plastificante (C_p) nas propriedades mecânicas (tensão na ruptura – TR e alongação – ELO) do filme coacervado de GEL/PEC elaborados com triacetina (TRI) e glicerol (GLI), como agente plastificante. 146

Tabela 12. Efeito da concentração de plastificante (C_p) nas propriedades funcionais: permeabilidade ao vapor de água (PVA) e solubilidade em água (SOL) dos filmes coacervados de GEL/PEC elaborados com triacetina (TRI) e glicerol (GLI), como agente plastificante..... 149

Capítulo 5

Tabela 13. Composição dos filmes de GEL/GAR. 173

Tabela 14. Efeito da proporção estequiométrica entre os biopolímeros (gelatina - GEL e goma arábica - GAR) nas propriedades funcionais dos filmes coacervados (pH_{zeta})..... 186

Tabela 15. Efeito da proporção estequiométrica sobre a temperatura de transição vítrea (T_g) e a entalpia de fusão (ΔH) do filme coacervado de GEL/GAR. 190

Tabela 16. Efeito do método de coacervação sobre a temperatura de transição vítrea (T_g) e a entalpia de fusão (ΔH) do filme de GEL/GAR. 198

Tabela 17. Efeito da concentração de polímero total (C_{pol}) dos filmes coacervados de GEL/GAR (10:1) propriedades funcionais (TR, ELO, PVA, SOL e UMI). 200

Tabela 18. Efeito da concentração de plastificante - C_p (Triacetina/Glicerol) nas propriedades funcionais (TR, ELO, PVA, SOL e UMI) dos filmes coacervados de GEL/GAR (10:1) elaborados com 6% de material polimérico..... 204

Tabela 19. Efeito da concentração de plastificante (C_p) nas propriedades funcionais: permeabilidade ao vapor de água (PVA) e solubilidade em água (SOL) do filme coacervado de GEL/GAR elaborados com triacetina (TRI) e glicerol (GLI), como agente plastificante..... 208

Tabela 20. Efeito da concentração de plastificante (Cp) e do tipo de plastificante (glicerol ou triacetina) sobre a temperatura de transição vítrea (Tg) e a entalpia de fusão (ΔH) do filme coacervado de GEL/GAR. 213

ANEXO

Tabela 21. Efeito do agente ajustador de pH (NaOH/NH₄OH) nas propriedades funcionais (TR, ELO, PVA e SOL) dos filmes coacervados de GEL/QUI em diferentes proporções estequiométricas. 240

Tabela 22. pH inicial (condição sem ajuste de pH) e o pH_{coacervação} (condição de coacervação, com ajuste de pH) da solução filmogênica de GEL/QUI, em diferentes proporções estequiométricas..... 242

ABSTRACT

The efficient combination of proteins and polysaccharides produces biodegradable films with improved functional properties; the associative interaction between the groupings present in the polymer chain of biopolymers generates a more cohesive and resistant polymer network. This association generally occurs through electrostatic interactions between the biopolymers which is controlled by the conditions of pH, ionic strength and stoichiometric ratio of polymers, among other parameters. The aim of this study was to use the coacervation method in developing films based on gelatin-chitosan (GEL/QUI), on gelatin-pectin (GEL/PEC) and on gelatin-gum arabic (GEL/GAR), in order to promote greater intermolecular interactions between biopolymers, forming mechanically stronger films and less susceptible to the action of water. The development of this work can be divided into: 1-) Analysis of the film solution GEL/QUI or PEC or GAR (in various stoichiometric ratios): in this step a study was done to determine the pH of coacervation for each formulation using ζ -zeta potential. At pH of coacervation occurs maximum electrostatic interaction between biopolymers generating a neutral electric charge for filmogenic solution (ζ - zeta potential of zero), due to neutralization of the positive charge ($-\text{NH}_4^+$) with negative charge ($-\text{COO}^-$) of biopolymers. 2-) Development of coacervated films was held in various stoichiometric ratios in its proper pH of coacervation. 3-) Characterization of films according to the visual appearance, mechanical properties, permeability to water vapor (PVA) water solubility (SOL), humidity (UMI) and opacity (Op). Complementary analyzes of X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and differential scanning calorimetry (DSC) were performed in some films. 4-) Selection of films: it was chosen a Stoichiometric ratio which produced films with higher mechanical strength and lower PVA SOL. 5-) Concentration of polymeric material: higher concentration of polymeric material (4, 6, 8, and 10%) were tested in the selected formulation in order to reduce the drying time of the coacervated films. These films were further characterized (mechanical properties, PVA, SOL and UMI). The concentration of polymeric materials chosen for further study associated the lowest drying time without

changing the SOL and PVA films. 6-) Addition of plasticizer: In this step the type of plasticizer (triacetin or glycerol) and its concentration was evaluated (2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25 and 30g plasticizer/100g polymeric material). The coacervated films GEL/CHI were prepared at alkaline pH (pH of coacervation between 6.2-7.2) by combining a cationic polysaccharide (QUI) with GEL. Formulations with higher content of gel (10:1 and 20:1 GEL/QUI) gave the coacervated film higher tensile strength, flexibility and less PVA. The analysis of X- ray diffraction and FTIR showed the presence of attractive electrostatic interactions between the chains of gelatin and chitosan. Comparing coacervated films with composite films (without pH adjustment) it was found that the coacervation method gave the highest film tensile strength, lower PVA and lower SOL. By increasing the concentration of polymeric material from 2% to 6% a reduction by half of the drying time was found promoting a greater resistance to breakage and lower PVA. The coacervate films GEL/PEC and GEL/GAR were prepared in acidic pH (pH of coacervation equal to 4.0 and 4.5 to 5.0, respectively), this occurs due to interaction carboxyl group ($-\text{COO}^-$) of anionic polysaccharides with amino group ($-\text{NH}_4^+$) of GEL, since the protein is positively charged at pHs only below its isoelectric point - pI (pI of 4.8 to 5.2 GEL). To coacervate film GEL/PEC, only film solution containing 20:1 GEL/PEC appeared homogeneous and in condition coacervation (pH of coacervation = 4.0). The FTIR spectrum of the coacervated film GEL/PEC (20:1) showed that the carboxyl group of the PEC may have been interacted with the amino group generating new clusters of GEL amide (1630 and 1530 cm^{-1}). The incorporation of the glycerol was more efficient in the polymer matrix of GEL/PEC than triacetin. It was confirmed by visual analysis and by X -ray diffraction. Films coacervated GEL/GAR presented themselves cohesive, uniform and homogeneous. Coacervated films with high gel content were more resistant and flexible and less soluble in water than the formulations with lower content of gel (1:1 to 2:1 GEL/GAR), which was confirmed by analysis of FTIR, DSC and XRD. The coacervation method formed films more mechanical and water resistant than in the non coacervated films. (without pH adjustment). Increasing the concentration the polymeric material from 2 to 6 % reduced the drying time of the film GEL/GAR

(10:1) by half without altering their functional properties. All coacervated films GEL/QUI, PEC or GAR, in general, showed the same behavior in addition of plasticizer. The addition of glycerol was more efficient because of its better incorporation into the polymer matrix coacervated producing more flexible films, tougher, with less PVA and more transparent than coacervated films containing triacetin. The results presented here confirm the efficiency of the coacervation method to improve the compatibility, thus intensifying the electrostatic interaction between protein and polysaccharide. This highly reflects in the functional property of coacervated films, since the bigger interaction among biopolymers promotes the formation of more dense and united polymeric net, generating films with higher TR, smaller PVA, less ELO in some formulations and more resistant to the action of water (less SOL).

Key words: biodegradable films, complex coacervation, gelatin, plasticizer and zeta potential.

RESUMO GERAL

A eficiente combinação entre proteínas e polissacarídeos produz filmes biodegradáveis com melhores propriedades funcionais, a interação associativa entre os grupamento presentes na cadeia polimérica dos biopolímeros gera uma rede polimérica mais coesa e resistente. Esta associação, em geral, ocorre através das interações eletrostáticas entre os biopolímeros que é controlada pelas condições de pH, força iônica e proporção estequiométrica dos polímeros, entre outros parâmetros. O objetivo deste trabalho foi utilizar o método de coacervação na elaboração de filmes a base de gelatina-quitosana (GEL/QUI), gelatina-pectina (GEL/PEC) e de gelatina-goma arábica (GEL/GAR) com o intuito de promover maiores interações intermoleculares entre os biopolímeros, formando filmes mais resistentes mecanicamente e menos susceptíveis a ação da água. O desenvolvimento deste trabalho pode ser dividido em: 1-) Análise da solução filmogênica de GEL/QUI ou PEC ou GAR (em várias proporções estequiométricas): nesta etapa foi feito um estudo para definir o pH de coacervação para cada formulação utilizando o ζ -potencial zeta. No pH de coacervação ocorre a máxima interação eletrostática entre os biopolímeros gerando carga elétrica neutra para a solução filmogênica (ζ -potencial zeta igual a zero), devido a neutralização da carga elétrica positiva ($-\text{NH}_4^+$) com a carga elétrica negativa ($-\text{COO}^-$) dos biopolímeros. 2-) Elaboração dos filmes coacervados foi realizada em várias proporções estequiométricas no seu devido pH de coacervação. 3-) Caracterização dos filmes de acordo com o aspecto visual, propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água (PVA), solubilidade em água (SOL), umidade (UMI) e opacidade (Op). Análises complementares de difração de raio-X (DRX), espectroscopia de infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram realizadas em alguns filmes. 4-) Seleção dos filmes: foi escolhida a proporção estequiométrica que produziu filmes com maior resistência mecânica, menor PVA e SOL. 5-) Concentração do material polimérico: na formulação selecionada foram testadas maiores concentrações de material polimérico (4, 6, 8 e 10%) com o

intuito de reduzir o tempo de secagem dos filmes coacervados. Estes filmes foram novamente caracterizados (propriedades mecânicas, PVA, SOL e UMI). A concentração de material polimérica escolhida para prosseguir o estudo associou o menor tempo de secagem sem alterar a PVA e SOL dos filmes. 6-) Adição do plastificante: nesta etapa foi avaliado o tipo de plastificante (triacetina e glicerol) e a sua concentração (2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25 e 30g de plastificante/100g de material polimérico). Os filmes coacervados de GEL/QUI foram elaborados em pH alcalino (pH de coacervação entre 6,2-7,2) por combinar um polissacarídeo catiônico (QUI) com a GEL. Formulações com maior teor de GEL (10:1 e 20:1 de GEL/QUI) confere ao filme coacervado maior resistência à ruptura, flexibilidade e menor PVA. As análises de difração de raio-X e de FTIR evidenciam a presença de interações eletrostáticas atrativas entre as cadeias da gelatina e a quitosana. Ao comparar os filmes coacervados com os filmes compostos (sem ajuste de pH) verificou-se que o método de coacervação conferiu ao filme maior tensão na ruptura, menor PVA e menor SOL. Ao aumentar a concentração de material polimérico de 2% para 6% constatou-se redução pela metade do tempo de secagem, além de promover maior resistência a ruptura e menor PVA. Os filmes coacervados de GEL/PEC e GEL/GAR foram elaborados em pH ácido (pH_{coacervação} igual a 4,0 e 4,5-5,0, respectivamente), isto ocorre devido a interação do grupo carboxil (-COO⁻) dos polissacarídeos aniônicos com o grupo amina (-NH₄⁺) da GEL, já que a proteína encontra-se carregada positivamente somente em pHs abaixo do seu ponto isoelétrico - pI (pI da GEL 4,8-5,2). Para filme coacervado de GEL/PEC, somente a solução filmogênica contendo 20:1 de GEL/PEC apresentou-se homogênea e com em condição de coacervação (pH_{coacervação}=4,0). O espectro de FTIR do filme coacervado de GEL/PEC (20:1) mostrou que o grupo carboxil da PEC pode estar interagido com o grupo amina da GEL gerando novos grupamentos amida (1630 e 1530 cm⁻¹). A incorporação do glicerol foi mais eficiente na matriz polimérica da GEL/PEC do que a triacetina, isto foi comprovado pela análise visual e pela difração de raio-X. Filmes coacervados de GEL/GAR apresentaram-se coesos, uniformes e homogêneos. Filmes coacervados com alto teor de GEL mostraram-se mais resistentes e flexíveis e

menos solúveis em água do que as formulações com menor teor de GEL (1:1 e 2:1 de GEL/GAR), resultados confirmados pelas análises de FTIR, DSC e DRX. O método de coacervação formou filmes mais resistentes mecanicamente e a ação da água do que nos filmes não coacervados (sem ajuste de pH). O aumento da concentração do material polimérico de 2 para 6% reduziu o tempo de secagem do filme de GEL/GAR (10:1) pela metade sem alterar suas propriedades funcionais. Todos os filmes coacervados de GEL/QUI, PEC ou GAR, de modo geral, apresentaram o mesmo comportamento frente a a adição do plastificante. A adição do glicerol foi mais eficiente devido sua melhor incorporação na matriz polimérica produzindo filmes coacervados mais flexíveis, mais resistentes, com menor PVA e mais transparentes do que os filmes coacervados contendo triacetina. Os resultados apresentados neste trabalho confirmam a eficiência do método de coacervação em melhorar a compatibilidade, e conseqüentemente, intensificando a interação eletrostáticas entre a proteína e o polissacarídeo. Isto reflete diretamente nas propriedades funcionais dos filmes coacervados, pois a maior interação entre os biopolímeros promove a formação de uma rede polimérica mais densa e coesa, gerando filmes com maior TR, menor PVA, menor ELO e em alguns formulações mais resistentes a ação da água (menor SOL).

Palavras chaves: filmes biodegradáveis, coacervação complexa, gelatina, plastificante e potencial zeta.

Capítulo 1

Introdução e Objetivos Gerais

1 introdução

Polímeros sintéticos vêm sendo largamente aplicado na produção de embalagens, devido seu baixo custo, fácil disponibilidade, excelentes propriedades ótica, mecânica e de barreira (O_2 , CO_2 e vapor de água) e pela alta estabilidade na presença de água e gorduras (FARRIS et al. 2009). Em contrapartida, as vantagens são encobertas pelo fato dos polímeros sintéticos apresentarem alta resistência à degradação natural, sendo grandes responsáveis pelo acúmulo de resíduos no meio ambiente causando sérios problemas de poluição.

Este problema ambiental pode ser minimizado utilizando-se polímeros naturais na elaboração das embalagens biodegradáveis, já que os microrganismos e as enzimas agem facilmente na superfície destes biopolímeros gerando produtos atóxicos (por exemplo, gás carbônico, água e biomassa) ao meio ambiente (ROSA et al. 2004). Por esta razão, inúmeros trabalhos sobre filmes biodegradáveis vêm sendo desenvolvidos nas últimas décadas, na tentativa de atender a demanda do mercado consumidor em busca de produtos de qualidade, seguros e ecologicamente corretos.

A embalagem biodegradável pode ser composta por polímeros sintéticos biodegradáveis, como o polivinil álcool – PVA, policaprolactona, ou por biopolímeros oriundos de fontes renováveis, ou seja, produtos ou subprodutos da agricultura ou de agroindústrias (SOBRAL et al. 2011). A utilização dos biopolímeros provenientes de subprodutos da agroindústria permitiria minimizar impactos ambientais em dobro, já que o uso destes reduziria a quantidade de polímero sintético na composição da embalagem biodegradável, e conseqüentemente, reduzindo seu impacto ambiental. Em segundo lugar, o uso de subprodutos da indústria na extração dos biopolímeros reduziria seu descarte no meio ambiente.

As limitações funcionais dos biopolímeros não permitem a substituição integral dos polímeros sintéticos, portanto, os biopolímeros podem atuar de forma

complementar a embalagem sintética. Esta embalagem complementar pode ser aplicada diretamente na superfície do alimento (definida como cobertura biodegradável) ou como um envoltório independente ao alimento (definido como filme biodegradável) (SHIH, 1996). Filmes e coberturas biodegradáveis podem carregar aditivos importantes, como vitaminas, antioxidantes, corantes, aromatizantes, agentes antimicrobianos, gerando maior qualidade e prolongar ainda mais o tempo de estocagem dos alimentos (KOELSCH, 1994; CHEN, 1995).

Os filmes e coberturas biodegradáveis são produzidos a partir de macromoléculas naturais (por exemplo, proteínas, polissacarídeos e lipídeos) capazes de produzir matrizes contínuas e coesas (GUILBERT; CUQ & GONTARD, 1997). As proteínas e os polissacarídeos conferem ao filme excelentes propriedades de barreira ao oxigênio e óticas, propriedades mecânicas razoáveis, pobre barreira ao vapor de água e alta sensibilidade às condições climáticas (por exemplo, alta umidade relativa do ar). A combinação entre proteínas e polissacarídeos pode gerar uma gama de possibilidades de associações inter e intramoleculares proporcionando a formação de novos materiais de embalagem com melhores propriedades funcionais e ser utilizada na indústria de alimentos, por conferir estrutura e estabilidade no processamento de alimentos (YE, 2008). A interação entre proteínas e polissacarídeos em solução aquosa pode desenvolver três diferentes situações de equilíbrio: miscíveis, incompatibilidade termodinâmica (interação segregativa) e o complexo coacervado (interação associativa) (KRUIF & TUINIER, 2001). Em solução, o tipo de interação pode ser influenciado pelo pH, força iônica, conformação, densidade de carga e a proporção estequiométrica entre os biopolímeros (SCHMITT et al. 1998; WEINBRECK et al. 2003).

Em geral, as propriedades funcionais dos polímeros individuais melhoram pela complexação com outros polímeros (TOLSTOGUV, 1991; DICKINSON, 1998). A formação do complexo coacervado ocorre pela associação eletrostática entre as cargas opostas dos biopolímeros em solução (SPERBER et al., 2009). As moléculas das proteínas são naturalmente anfifílicas, resultando em uma alta

atividade superficial (PIAZZA et al., 2009). Portanto, no ponto isoelétrico (pI) a proteína encontra-se sem grupos laterais ionizáveis (carga elétrica igual a zero), mas em valores de pHs acima do pI os grupamentos carboxila estão carregados negativamente ($-\text{COO}^-$), enquanto em pHs abaixo ao pI os grupamentos amina estão carregados positivamente ($-\text{NH}_4^+$). Em pH acima do pI, as proteínas interagem eletrostaticamente com um polissacarídeo catiônico (exemplo, quitosana) e em valores de pH abaixo do pI, a proteína interage com um polissacarídeo aniônico (exemplo, pectina e goma arábica).

A elaboração do complexo coacervado é diretamente controlada pela condição do pH do sistema (JONES et al. 2010). No ponto ótima de coacervação (definido como $\text{pH}_{\text{coacervação}}$), os biopolímeros encontram-se altamente ionizáveis e com cargas opostas, a máxima interação eletrostática atinge a condição de eletroneutralidade da solução com a formação do complexo coacervado. A maior interação eletrostática associativa entre os biopolímeros gera uma matriz polimérica mais densa e coesa para os filmes coacervados, e conseqüentemente, melhores propriedades funcionais (RAYNER et al. 2000).

1.1 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi de investigar o efeito do método de coacervação nas propriedades funcionais dos filmes de gelatina-quitosana, gelatina-pectina e gelatina-goma arábica, em relação a: (I) a proporção estequiométrica dos biopolímeros, (II) concentração do material polimérico e (III) adição de plastificante.

1.1.1 Objetivos específicos

- Identificar através do potencial zeta o ponto de coacervação da solução filmogênica frente a variação do pH. O pH ótimo para a coacervação ($\text{pH}_{\text{coacervação}}$) foi identificado no valor de pH onde ocorre a eletroneutralidade do sistema (ζ -potencial zeta igual a zero);
- Determinar o valor de $\text{pH}_{\text{coacervação}}$ para cada proporção estequiométrica estudada, entre os pares gelatina-quitosana, gelatina-pectina e gelatina-goma arábica;
- Desenvolvimento da metodologia para a elaboração dos filmes coacervados de gelatina-quitosana, gelatina-pectina e gelatina-goma arábica;
- Comparar as propriedades funcionais (propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água) dos filmes coacervados ($\text{pH}_{\text{coacervação}}$) com os filmes compostos ou não coacervados (sem ajuste de pH);
- Examinar o efeito da concentração do material polimérico nas propriedades funcionais dos filmes coacervados (propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água);
- Analisar o efeito do tipo e concentração de plastificante nas propriedades funcionais dos filmes coacervados (propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água, solubilidade em água e análise microestruturais).

1.2 Estrutura da tese

Este estudo foi organizado em capítulos que estão descritos a seguir:

Capítulo 1 – “Introdução e Objetivos Gerais”: neste capítulo estão descritos a justificativa do trabalho com seus objetivos específicos e gerais.

Capítulo 2 – “Revisão Bibliográfica”: Os principais fundamentos teóricos que abrangem este trabalho estão concentrados neste capítulo, referente aos materiais biodegradáveis, filmes biodegradáveis, metodologia utilizada para elaboração dos filmes (método de coacervação), matérias-primas.

Capítulo 3 – “Filmes biodegradáveis de gelatina e quitosana elaborados pelo método de coacervação”: neste capítulo estão descritas as etapas de desenvolvimento e caracterização dos filmes a base de gelatina-quitosana pelo método de coacervação, bem como sua comparação com os filmes compostos (não-coacervados). Nos filmes coacervados de GEL/QUI ainda foram avaliados o efeito da concentração de material polimérico e o efeito da adição do plastificante nas suas propriedades funcionais.

Capítulo 4 – “Estudo da formação de filmes coacervados de gelatina e pectina”: neste capítulo são apresentadas as etapas de desenvolvimento e caracterização do filme coacervado de gelatina e pectina, bem como o efeito da adição do plastificante nas suas propriedades funcionais.

Capítulo 5 – “Filmes coacervados de gelatina e goma arábica”: neste capítulo estão apresentadas as etapas de desenvolvimento e caracterização dos filmes a base de gelatina e goma arábica através do método de coacervação, bem como sua comparação com os filmes correspondentes não coacervados (sem ajuste de pH). Nos filmes coacervados foram avaliados o efeito da concentração de material polimérico e o efeito da adição do plastificante nas suas propriedades funcionais.

Capítulo 6 – “Conclusão Geral”: neste capítulo podem ser visualizadas as conclusões gerais deste trabalho.

1.3 Referências Bibliográficas

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

KRUIF, C. G.; TUINIER, R. Polysaccharide protein interaction. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 555-563, 2001.

DICKINSON, E. Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, p. 347-354, 1998.

FARRIS, S.; SCHAICH, K. M.; LIU, L.; PIERGIOVANNI, L.; YAM, K. L. Development of polyion-complex hydrogels as an alternative approach for the production of bio-based polymers for food packaging applications: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 316-332, 2009.

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

JONES, O. G.; LESMES, U.; DUBIN, P.; McCLEMENTS, D. J. Effect of polysaccharide charge on formation and properties of biopolymer nanoparticles created by heat treatment of β -lactoglobulin-pectin complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 374-383, 2010.

KOELSCH, C. Edible water vapor barriers: properties and promise. **Trends in Food Science and Technology**, Amsterdam, v.5, n.3, p.76-81, 1994.

PIAZZA, L.; DÜRR-AUSTER, N.; GIGLI, J.; WINDHAD, E. J.; FISHER, P. Interfacial rheology of soy proteins- high methoxyl pectin films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2125-2131, 2009.

RAYNER, M.; CIOLFI, V.; MAVES, B.; STEDMAN, P.; MITTAL, G. C. Development and application of soy protein films to reduce fat intake in deep-fried foods. **Journal of Science and Food Agricultural**, v. 80, p. 777-782, 2000.

ROSA, D. S.; LOTTO, N. T.; LOPES, D. R.; GUEDES, C. G. F. The use of roughness for evaluating the biodegradation of poly- β (hydroxybutyrate-co- β -valerate). **Polymer Testing**, v. 23, p. 3-8, 2004.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, p. 689-753, 1998.

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

SOBRAL, P. J. A.; CARVALHO, R. A.; MORAES, I. C. F.; BITTANT, A. M. Q. B.; MONTERREY-QUINTERO, E. S. Phase transitions in biodegradable films based on blends of gelatin and poly (vinyl alcohol). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 372-379, 2011.

SPENBER, B. L. H. M.; SCHOLS, H. A.; STUART, M. A. C.; NORDE, W.; VORAGEN, A. G. J. Influence of overall charge and local charge density of pectin on the complex formation between pectin and β -lactoglobulin. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 765-772, 2009.

TOLSTOGUVOV, V. B. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction, **Food Hydrocolloids**, v. 4, p. 429-468, 1991.

WEINBRECK, F.; DE VRIES, R.; SCHROOYEN, P.; KRUIF, C. G. Complex coacervation of whey proteins and gum Arabic. **Biomacromolecules**, v. 4, 0. 293-303, 2003.

YE, A. Complexation between milk protein and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 406-415, 2008.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Filmes Biodegradáveis

As embalagens convencionais a base de polímeros sintéticos derivadas do petróleo apresentam alta resistência á hidrólise enzimática e microbiológica proporcionando o acúmulo destes materiais, o que acarreta em um grande impacto ambiental. A alta estabilidade química destes polímeros esta associada a alta massa molar e as propriedades hidrofóbicas que produzem embalagens não biodegradáveis. Outro problema ambiental acerca dos polímeros sintéticos esta relacionado à fonte não renovável de sua matéria-prima (JOUKIA et al. 2013; KIM, 2008).

Em geral, biopolímeros ou polímeros naturais são extraídos de fontes renováveis e facilmente degradáveis. O processo de degradação consiste basicamente na fragmentação e/ou perda da propriedade do material (por exemplo, perda da integridade, massa molecular e força mecânica) (ANDREUCETTI, 2010). Portanto, um material pode ser classificado como biodegradável quando sofre alterações profundas na sua estrutura química em virtude de atividade hidrolítica biológica (PAGGA, 1998).

As pesquisas com embalagens a base de biopolímeros naturais vêm crescendo nas últimas décadas, devido sua alta biodegradabilidade e por serem potenciais substitutos dos polímeros petroquímicos. Além destas características, as embalagens biodegradáveis ainda podem estender a vida de prateleira e aumentar a qualidade dos alimentos ao fornecer barreira a transferência de massa, melhorar a integridade mecânica e/ou carregar agentes ativos (por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, corantes, aromas, nutrientes, entre outros) (MURILLO-MARTÍNEZ et al. 2011).

Os filmes biodegradáveis e/ou coberturas de polímeros naturais podem ser produzidos como camadas finas e contínuas depositadas diretamente (coberturas) e de forma independente (filmes) sobre o alimento (SHIH, 1996). O biofilme é composto por biopolímeros classificados como agentes formadores do filme, ou seja, é o componente que está em maior quantidade na formulação do filme. Dentre os biopolímeros pode-se destacar a utilização de proteínas, polissacarídeos e lipídios. Outros constituintes podem ser adicionados à formulação, como os plastificantes (glicerol, sorbitol, triacetina, etc), solvente (água, etanol, etanol/água, entre outros), e agente ajustador de pH (ácido acético, hidróxido de amônia, etc), entre outros .

A adição destes outros componentes químicos, em baixas quantidades, aos filmes biodegradáveis e/ou comestíveis pode modificar sua propriedade funcional, organoléptica, nutricional e mecânica. Os plastificantes que são capazes de melhorar as propriedades mecânicas do filme (RODRÍGUEZ et al. 2006).

2.2 Biopolímeros Formadores de Filme

O biopolímero formador do filme é o constituinte em maior quantidade e é responsável por formar uma matriz coesa e uniforme. Entre os biopolímeros destacam-se as proteínas, polissacarídeos e lipídios que podem ser utilizados individualmente ou combinados dependendo da propriedade funcional desejada pelo filme.

O comportamento estrutural do filme depende principalmente da estrutura do polímero, das ligações químicas que estão diretamente envolvidas com a coesão da matriz filmogênica e do comportamento do polímero em relação ao meio. Diversos tipos de ligações são responsáveis por manter a integridade do filme protéico incluindo ligações do tipo covalentes, pontes de hidrogênio, iônicas e hidrofóbicas (OH et al. 2004).

Vários biopolímeros podem ser usados na fabricação de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis, os filmes a base de carboidratos e seus derivados, o amido (GALDEANO et al. 2009), alginatos (YAN, KHOR & LIM, 2000), pectina (SILVA, BIERHALZ & KIECKBUSCH, 2009; YAO et al. 1996), quitosana (SZTUKA & KOLODZIEJSKA, 2008; XIAO et al. 2003), a goma arábica (NIXON & WONG, 1989), a celulose (TONGDESOONTORN et al. 2011; GENNADIOS; WELLER & TESTIN, 1993b); a base de proteínas destacam-se, o colágeno (GENNADIOS, et al. 1994), a caseína (PEREDA, ARANGUREN & MARCOVICH, 2009), a gelatina (RIVERO, GARCÍA & PINOTTI, 2009), isolado protéico de soja (KOKOSZKA, DEBEAUFORT et al. 2010), e o isolado proteico de ervilha (KOWALCZYK & BARANIAK, 2011); e a base de lipídios incluindo os monoglicerídeos, os ácidos graxos (BERTAN et al. 2005), as ceras naturais (TALENS & KROCHTA, 2005), entre outros (GUILBERT, 1986).

2.2.1 Proteínas

As proteínas em especial são derivadas de 20 monômeros diferentes (aminoácidos) que conferem uma gama maior de propriedades funcionais por formar ligações intra e intermoleculares em diferentes posições com tipos e intensidade de energias diferenciadas, quando comparada aos polissacarídeos e aos lipídios (CUQ; GONTARD & GUILBERT, 1995). Além de todas estas propriedades, a utilização das proteínas pode agregar ainda aos filmes biodegradáveis e/ou comestíveis propriedades sensoriais e nutricionais.

Todos os aminoácidos apresentam um grupamento amina ($-NH_2$) e um grupo carboxílico ($-COOH$) ligado a um átomo de carbono central, mas ainda existe outro grupo ligado ao átomo central de carbono, chamado grupo lateral e este grupo que é responsável por atribuir caráter ao aminoácido. Portanto, o grupo lateral pode ser polar (hidrofílico) ou não polar ou apolar (hidrofóbico) e ainda apresentar carga

elétrica positiva ou negativa dependendo do valor do pH do meio. Estas propriedades dos aminoácidos conferem a proteína um caráter anfótero, ou seja, a proteína pode ser catiônica ou aniônica dependendo do pH do meio.

Segundo VERBEEK & VAN DER BERG (2010), as proteínas apresentam uma estrutura macromolecular tridimensional, que abrange as formas primária, secundárias, terciárias e quaternárias na mesma molécula. Esta estrutura tridimensional que é estabilizada pelas interações hidrofóbicas, eletrostáticas, ligações covalentes, pontes de hidrogênio e ligações dissulfídicas entre os grupos laterais dos aminoácidos.

Os filmes proteicos formam uma rede contínua, homogênea, coesa e com certa organização. Esta rede macromolecular começa a ser formada através da solubilização da proteína, onde inicia-se o rompimento das ligações intermoleculares fracas (responsável por estabilizar a estrutura nativa da proteína) e com a evaporação do solvente ocorra um reordenamento e orientação das cadeias poliméricas formando uma nova rede tridimensional mantidas por novas interações (CUQ, GONTARD & GUILBERT, 1998).

Filmes proteicos apresentam propriedades mecânicas inferiores ao filme sintético e ao filme de polissacarídeo, mas são suficientes para a maioria das aplicações (GENNADIOS, 2002). Para melhorar esta propriedade mecânica faz-se uso de agente plastificante para conferir maior elasticidade ao filme (CARVALHO & GROSSO, 2004) ou incorpora-se outro polímero, como por exemplo, pode-se um polissacarídeo com o intuito de aumentar a resistência do filme proteicos (KROCHTA, 2002). Filmes proteicos apresentam ainda excelentes barreiras ao oxigênio de 0,6-3,8mol/m.s.Pa (GENNADIOS, WELLER & TESTIN, 1993a), gás carbônico, aromas e óleo ao comparar com os filmes sintéticos, e devido a sua natureza hidrofílica apresentam pobres barreiras à umidade (POL et al. 2002).

Inúmeras proteínas vegetais, como as do glúten, zeína de milho, algodão e amendoim (POCHAT-BOHATIER, SANCHEZ & GONTARD, 2006; MARQUIÉ, 2001) e também proteínas de origem animal como caseína e isolado proteicos do

soro do leite, gelatina, queratina, entre outras (MULLER-BUSCHBAUM et al. 2006; CHAMBI & GROSSO, 2006; TANABLE et al. 2002) vêm sendo amplamente pesquisadas por serem capazes de produzir matrizes contínuas e coesas favoráveis à formação dos biofilmes (GUILBERT, CUQ & GONTARD, 1997).

2.2.1.1 Gelatina

A gelatina é um hidrocolóide muito popular e amplamente utilizado pela indústria de alimentícia (confeitos, produtos cárneos, laticínios, etc), farmacêutica (cápsulas) e fotográfica (POPPE, 1997). A gelatina é produzida em larga escala á baixo custo, justificando assim o grande interesse e exploração de suas propriedades funcionais.

A gelatina é derivada do colágeno, componente estrutural de tecidos conectivos brancos presente em órgãos e tecidos (por exemplo, ossos, peles bovinas e suínas e tecidos conectivos). O colágeno abrange quase 30% das proteínas totais em vertebrados e invertebrados e, ao microscópio aparece como fibras brancas opacas, circundadas por outras proteínas e mucopolissacarídeos (POPPE, 1997). Devido às diversas fontes de matéria-prima, a gelatina é composta por grande quantidade de polipeptídios diferentes, e por isso, a massa molar da gelatina pode variar de 100 a 1000 KDa (ARVANITOYANNIS, 2002).

O pré-tratamento na obtenção da gelatina tem como finalidade eliminar gorduras, mucopolissacarídeos e outros compostos orgânicos (POPPE, 1997). A obtenção da gelatina é realizada a partir da hidrólise ácida ou básica do colágeno e a produção comercial da gelatina pode ser dividida em duas etapas. Primeiramente, o colágeno foi desnaturado a 40°C e posteriormente submetido a hidrólise (ácida ou básica) para quebra das ligações covalentes. Mediante o tipo de pré-tratamento utilizado para retirar as impurezas e iniciar o processo de

hidrolise, a gelatina pode ser classificada em dois grupos (GENNADIOS et al., 1994):

- Tipo A: quando o pré-tratamento é realizado por um ácido (onde os mais utilizados são os ácidos clorídrico, sulfuroso e fosfórico), possuindo um ponto isoelétrico entre 7,0 e 9,0.
- Tipo B: quando o pré-tratamento é realizado por uma base (óxido de cálcio), possuindo um ponto isoelétrico entre 4,6 e 5,2.

Independente do tipo de gelatina, sua composição compreende a maioria dos aminoácidos essenciais (total 18 aminoácidos), exceto a cisteína e o triptofano, como pode ser observado na Tabela 1. A glicina, prolina, a alanina e hidroxiprolina estão em maior quantidade na gelatina, compreendendo aproximadamente 65% do total de aminoácidos. A glicina é predominante no resíduo terminal N da gelatina tipo A, já a alanina é predominante na gelatina tipo B (DJAGNY, WANG & XU, 2001).

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

Aminoácido	Gelatina tipo A*	Gelatina tipo B*
Glicina	33,0	33,5
Prolina	13,2	12,4
Alanina	11,2	11,7
Hidroxirolina	9,1	9,3
Ácido glutâmico	7,3	7,2
Arginina	4,9	4,8
Ácido aspártico	4,5	4,6
Serina	3,5	3,3
Lisina	2,7	2,8
Valina	2,6	2,2
Leucina	2,4	2,4
Treonina	1,8	1,8
Fenilalanina	1,4	1,4
Isoleucina	1,0	1,1
Hidroxilisina	0,6	0,4
Histidina	0,4	0,4
Metionina	0,4	0,4
Tirosina	0,3	0,1

*Número de resíduos de aminoácidos em base de 100 resíduos totais.
 Fonte: GENNADIOS et al. (1994).

O tipo de pré-tratamento irá modificar o conteúdo de resíduos de ácido carboxílico e amidas presentes em cada gelatina afetando assim a formação de ligações de hidrogênio e interferindo na formação de triplas-hélices. A estrutura da gelatina contém sequências triplas repetidas de glicina X-Y, onde o X e Y são os aminoácidos prolina e hidroxiprolina, respectivamente (Figura 1), que conferem

uma estrutura secundária em α -hélice, mantidas principalmente por ligações intermoleculares do tipo pontes de hidrogênio (BLOUT, CARVER & GROSS, 1963). A presença da prolina e da hidroxiprolina atribui a gelatina uma conformação aberta, ou seja, formando uma estrutura tripla hélice distendida, que apresentam muitas das cadeias laterais de aminoácidos na parte externa da molécula facilitando assim a interação entre as moléculas (PB LEINER, 2013).

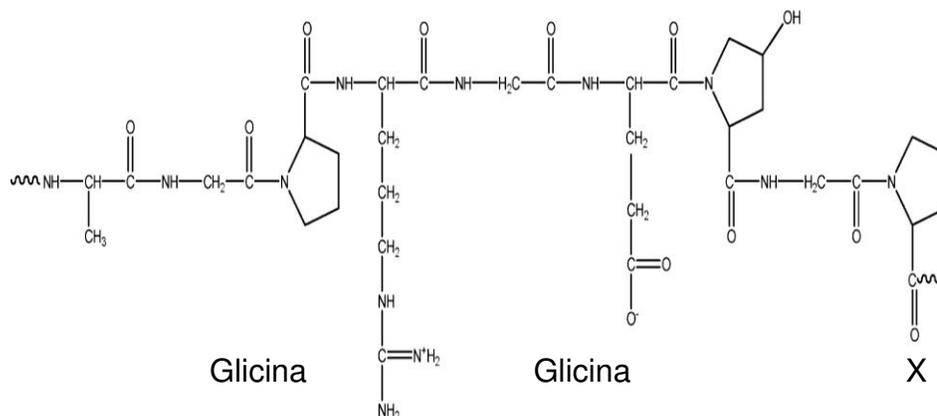


Figura 1. Estrutura química da cadeia de gelatina (Fonte: GUPTA & BOHIDAR, 2007).

Além de serem classificadas pelo seu ponto isoelétrico (pI), as gelatinas são avaliadas pela sua viscosidade, granulometria e poder de geleificação ou Bloom; podendo ser encontrada comercialmente entre 50 a 300 Bloom (PB LEINER, 2013).

A gelatina é solúvel em água quente (temperatura acima de 30°C) e pode sofrer dissolução direta ou indireta. Pelo método direto, a gelatina é adicionada em água quente (60-80°C) sob forte agitação, este método pode fazer com que a gelatina espume, devido à sua agitação (JOHNSTON-BANKS, 1990), o que se torna inconveniente na elaboração de filmes comestíveis. No método indireto, a gelatina em contato com a água fria é mantida em repouso para que as partículas hidratem até formar uma massa homogênea, sendo então levada ao aquecimento

(50-60°C) e agitação leve até a dissolução completa. Na etapa de repouso, a gelatina pode absorver até dez vezes seu peso em água (JOHNSTON-BANKS, 1990).

Outra característica importante da gelatina é a sua capacidade em formar gel termorreversível. Em nível molecular, a formação de géis envolve ligações iônicas entre grupos amina e carboxila dos aminoácidos com a ajuda de pontes de hidrogênio (KESTER & FENNEMA, 1986). A conversão do estado sol para o estado gel é reversível e pode ser repetida, o que torna vantajoso à utilização da mesma em várias aplicações comestíveis (POPPE, 1997).

A gelatina tem propriedade típica de polieletrólito anfótero, pois apresenta carga elétrica negativa ou positiva dependendo do valor do pH em relação ao seu pI (ARVANITOYANNIS, 2002). Por esta razão, a gelatina apresenta alta capacidade em formar filmes polieletrólitos ou complexos com outros biopolímeros (LI et al. 2011; LEE, 2000).

2.2.2 Polissacarídeos

Os carboidratos são substâncias constituídas por poli-hidroxi aldeídos, cetonas, alcoóis, ácidos e seus derivados e são mantidas por ligação do tipo acetal. Estas substâncias são classificadas de acordo com seu grau de polimerização, onde os açúcares são compostos por mono e dissacarídeos, oligossacarídeos (contém 3-10 monossacarídeos) e polissacarídeos (contém 10 ou mais monossacarídeos). Portanto, os polissacarídeos são carboidratos complexos e compostos por muitos monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, podendo constituir uma cadeia ramificada ou linear (FENNEMA, 1996).

A cadeia polimérica do polissacarídeo é formada por uma sequência repetida de monômeros, entre eles pode-se destacar o D-glicose, D-frutose, D-

galactose, D-manose, L-arabinose e D-xilose. Todos estes monômeros nos polissacarídeos apresentam grupos hidroxila (-OH) em sua estrutura que podem ser metilados ou acetilados na tentativa de formar derivados de polissacarídeos com melhor funcionalidade. Por exemplo, formação da metilcelulose a partir da metilação da celulose.

Os polissacarídeos são extraídos de recursos renováveis, como plantas (por exemplo, celulose), animais (por exemplo, quitosana), microrganismos, sementes, frutas (pectina), legumes, exudados de plantas (goma arábica), algas (alginato) e microalgas (VENUGOPAL, 2011).

Os polissacarídeos são utilizados na produção de alimentos como espessantes, estabilizantes agentes gelificantes e emulsificantes. Devido a estas características, vêm aumentando a utilização dos polissacarídeos no desenvolvimento de biofilmes (STEPHEN & CHURMS, 2006).

Filmes a base de polissacarídeos apresentam propriedade de barreira a gás inferior ao filme proteicos, devido sua estrutura única (repetição de vários monômeros), o que limita a variedade de grupos laterais e a formação ligações intermoleculares (ZHONG & XIA, 2008).

A utilização de polissacarídeos na elaboração de filmes a partir de géis-solúveis ou hidrogéis despertou uma nova estratégia com novos tipos de filmes aplicados para estender a vida de prateleira de uma grande variedade de alimentos (SOLIVA-FORTUNY, ROJAS-GRAÜ & MARTIN-BELLOSO, 2011). Os filmes a base de polissacarídeos são pobres barreiras a umidade, mas são eficientes barreiras a gases apresentando uma permeabilidade seletiva ao oxigênio (O₂) e gás carbônico (CO₂). Por esta razão, estes filmes são muito aplicados no revestimento de frutas, vegetais in natura ou minimamente processados (OLIVAS & BARBOSA-CÁNOVAS, 2005).

Os polissacarídeos são biopolímeros de cadeia longa e compostos por monômeros repetidos e a alta massa molar e a organização estrutural, atribuem ao polissacarídeo diversos papéis, como adesividade e alta habilidade em formar

géis. O polissacarídeo é um biopolímero que tem despertado grande interesse devido o desempenho de suas propriedades funcionais aliadas a grande variedade, disponibilidade, baixo custo e sua não toxicidade (SOLIVA-FORTUNY, ROJAS-GRAÜ & MARTIN-BELLOSO, 2011).

2.2.2.1 Quitosana

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante, depois da celulose, e é encontrada no exoesqueleto de crustáceo e de células fúngicas (ZHANG et al. 2006). Em termos estruturais, este biopolímero é constituído por monômeros de 2-acetamida-2-deoxi-N-acetil- β -D-glicose unidos por ligações β -(1-4) (GUPTA & BOHIDAR, 2007). A quitosana é obtida pela desacetilação da quitina e é constituída de monômeros de 2-amino-2-deoxi- β -D-glicopiranosose alternados com monômeros de poli-N-acetil-D-glicosamina, (BABIKER, 2002). As estruturas moleculares da quitina e quitosana podem ser observadas na Figura 2.

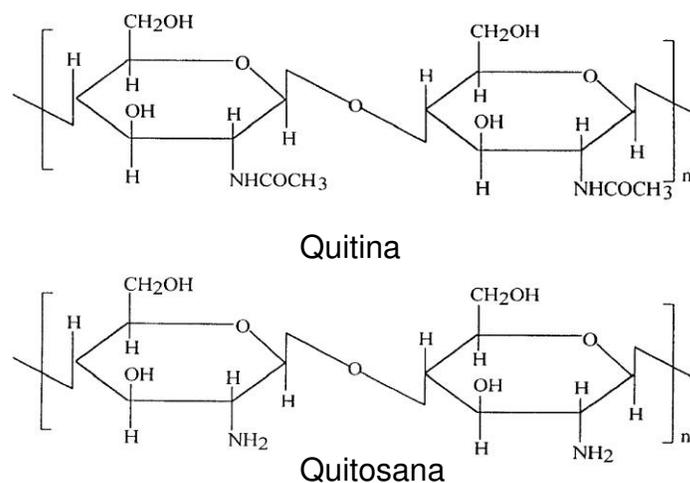


Figura 2. Estruturas moleculares da quitina e da quitosana (Fonte: GUPTA & BOHIDAR, 2007).

A falta de controle de qualidade no processamento (desacetilação e depolimerização) comercial da quitina promove a formação de quitosana com propriedades variáveis. Por esta razão, encontra-se quitosana com grau de desacetilação variando de 50-95%, massa molar de 10 a 1000 kDa e valor de pKa variando entre 5,5 e 6,5 (GUPTA & BOHIDAR, 2007). Estas propriedades interferem diretamente na natureza química desta matéria-prima.

A quitosana é um polissacarídeo catiônico, onde a densidade da carga elétrica do polímero é determinada pela quantidade de grupos secundários carregados. Portanto, em valores de pH menores que o pKa a quitosana apresenta alta densidade de carga elétrica positiva e é solúvel em soluções aquosas, mas em altos valores de pH reduz a densidade de carga e pode ocorrer até precipitação da quitosana, devido a desprotonação do grupamento amina (CLAESSON & NINHAM, 1992)

A quitosana é largamente empregada em várias aplicações indústrias na área alimentícia, farmacêutica e biotecnológica. Isto é justificado pelo fato deste polissacarídeo apresentar-se biodegradável, não tóxico, biocompatibilidade e bioadesividade (REMUNÑAN-LÓPEZ & BODMEIER, 1997), além de proceder de uma fonte economicamente viável, abundante, de simples processamento, por sua inocuidade e por ser solúvel em água em determinados pHs (MAO, SUNA & KISSEL, 2010).

Vários estudos sistemáticos têm sido realizados para avaliar o efeito do ácido (exemplo, tipo e concentração) e da quitosana (massa molar e o grau de desacetilação) nas propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água do filme de quitosana (CANER, VERGANO & WILES, 1998; PARK, MARSH & RHIM, 2002; WILES et al. 2000). Entretanto, os filmes de quitosana quando secos apresentam-se frágeis, o que pode ser amenizado pela incorporação de outros biopolímeros, como a pectina (HOAGLAND & PARRIS, 1998), caseína (PEREDA, ARANGUREN & MARCOVICH, 2008), gelatina (RIVERO, GARCÍA & PINOTTI, 2009). Segundo, PEREDA, ARANGUREN & MARCOVICH, (2009) os grupos

carregados positivos da quitosana pode interagir e formar uma rede polimérica tridimensional com moléculas de caseinato contendo cargas opostas.

2.2.2.2 Pectina

A pectina é um heteropolímero encontrado na parede celular na maioria das plantas. Este polissacarídeo é extraído comercialmente das cascas da maçã e frutas cítricas provenientes dos subprodutos da indústria de sucos e apresenta grau de esterificação (DE) de 55 a 75% (LOPES DA SILVA & RAO, 2006).

A cadeia linear da pectina é formada por unidades monoméricas de ácido (1→4)- α -D-galacturônico interrompida pela presença de açúcares ramnose ((1→2)- α -L-ramnose), segundo RIDLEY, O'NEILL & MOHNEN (2001).

O grupo funcional carboxílico do ácido galacturônico pode estar parcialmente esterificado, ou seja, parte deste ácido sofreu metilesterificação. Portanto, o grau de esterificação (DE) é a porcentagem de ácidos galacturônicos que foram metilesterificados, os grupos funcionais metil ésteres da pectina ocupam um espaço similar, mas são mais hidrofóbicos e conseqüentemente têm um efeito diferente na estruturação da água. De acordo com o DE, a pectina pode ser classificada em pectina com baixo grau de esterificação (teor de esterificação menor que 50%) e em pectina com alto grau de esterificação (teor de esterificação maior que 50%). As fórmulas estruturais das duas pectinas podem ser observadas na Figura 3.

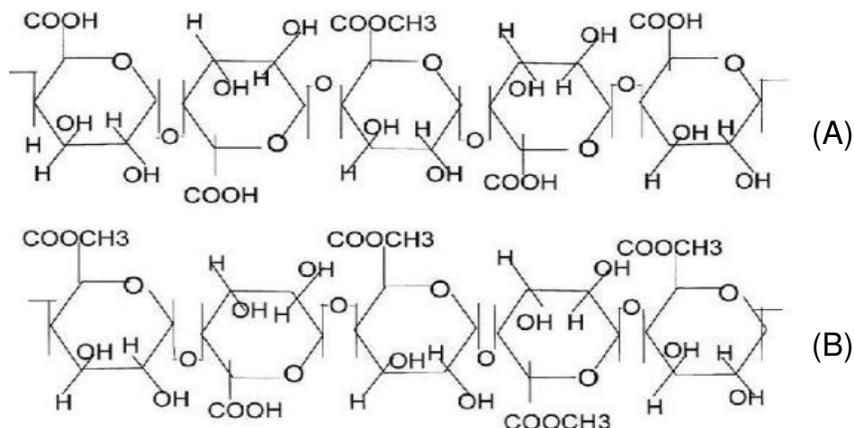


Figura 3. Estruturas moleculares da pectina com baixo teor de metoxilação (A) e com alto teor de metoxilação (B) (Fonte: FERNANDEZ, 2001).

A pectina é um poliânion que possui pKa em torno de 2,9, em pHs próximos ao pKa ocorre perda da carga elétrica e em altos valores de pH a carga elétrica é negativa e elevada (RALET et al. 2001). A pectina é muito utilizada na elaboração de complexos polieletrólitos, onde a carga negativa deste polissacarídeo interage eletrostaticamente com a carga oposta de outro biopolímero (PIAZZA et al. 2009).

A gelificação da pectina de baixo teor de metilação (BTM) ocorre por meio da formação de ligações entre íons carboxílicos da pectina e íons bivalentes (geralmente cálcio) ou tetravalentes para alto teor, que atuam como ligantes entre as cadeias de pectina. Elas envolvem ligações quelantes intermoleculares do cátion, induzindo a formação de macromoléculas agregadas. Os géis formados são termorreversíveis, entre pH 3,0 e 4,0, a força do gel aumenta à medida que se eleva a concentração de cálcio, mas é reduzida com o aumento da temperatura e da acidez (pH<3). As pectinas BTM (baixo teor de metoxilação) também gelificam na ausência de cálcio pela formação de associações entre cadeias em baixa temperatura (~10°C) para formarem géis transparentes.

As composições e as propriedades das pectinas variam de acordo com a diversidade de matéria-prima utilizada nos processos de extração e com

metodologia utilizada (RALET et al. 2001). As características eletrostáticas e a formação de géis conferem à pectina ótimas propriedades para ser utilizada como material de parede para formação de microcápsulas. Geralmente, as pectinas não possuem estruturas exatas, pois a molécula não adota uma conformação reta em solução, mas ocorre de forma estendida e flexível. Possui boa solubilidade, no entanto necessita ser dispersa em água aquecida com temperatura acima de 60°C.

A pectina com baixo teor de metoxilação amidada apresenta 50% dos seus grupos carboxílicos livres ou não esterificados, e desta porcentagem 15-18% dos grupos carboxil estão na forma de amida (MATIA-MERITO, LAU & DICKINSON, 2004). A pectina amidada caracteriza-se por uma estrutura com distribuição ordenada em blocos do grupo amida e uma distribuição aleatória dos grupos carboxila (RACAPÉ et al., 1989). Este processo de amidação promove alterações positivas na gelatinização produzindo géis mais fortes, elásticos e transparentes em relação ao gel de pectina não-amidada (KIM, SOSULSKI & LEE, 1978; LOOTENS et al., 2003). O grupo amida da pectina reforça a estrutura do gel via ligações hidrogênicas, esta estrutura conseqüentemente promove alterações positivas nas propriedades funcionais dos filmes.

A pectina é responsável pela firmeza e pela estrutura dos tecidos atuando na parede celular de forma semelhante ao colágeno, em tecidos animais (ASPINALL et al., 1970). Por esta razão, a pectina tem um papel importante na estabilização e na capacidade formadora do filme, devido sua alta resistência mecânica. Em pH maiores que seu pKa, a pectina é carregada negativamente, a distribuição e a densidade de carga elétrica na cadeia polimérica determinará a funcionalidade do filme. A capacidade formadora de biofilme da pectina foi relatada em alguns estudos como de GIANCONE et al. (2008), KAMBUROVA et al. (2008), TRIPATHI, MEHROTRA & DUTTA (2010), FARRIS et al. (2011), HOAGLAND & PARRIS (1996), entre outros.

2.2.2.3 Goma Arábica

A goma arábica ou goma acácia é uma goma exudada pela árvore da espécie *Acacia Senegal*, e é um hidrocolóide solúvel em água e muito utilizada como agente espessante, emulsificante e estabilizante em sistemas alimentícios (THEVENET, 1988). Estas características associadas com sua alta massa molar (em torno de 380KDa) torna a goma arábica um material muito utilizado na indústria de confeitaria, bebidas, laticínios, biscoitos e cereais (BARAY, 2009). Muitas pesquisas vêm utilizando largamente a goma arábica como material de parede na elaboração de microcápsulas coacervadas para aromas alimentícios (MINEMOTO et al. 2002).

A composição química da goma arábica pode variar de acordo com a espécie da árvore, idade da árvore, condição do meio ambiente (umidade relativa do ar, temperatura, entre outros), método de extração e purificação (WILLIAMS & PHILLIPS, 2001). Em geral, a goma é composta por uma mistura de três distintos componentes, a arabinogalactana é o maior componente na goma arábica, cerca de 80-90% do total de massa na goma, o complexo arabinogalactana-proteína que representa 10-20% da massa da goma e em menor quantidade (2-4% da massa da goma) a fração de glicopeptídeo (LIZ et al. 2006). A arabinogalactana compreende uma mistura de compostos (D-galactose, L-arabinose, L-arabinose, L-ramnose, D-glicose e ácido D-glicurônico) e ainda pode apresentar um pouco ou nenhuma quantidade de material proteico (BARAY, 2009). Este complexo apresenta resíduos de ácido glucurônico (grupo carboxila $-\text{COO}^-$), que são responsáveis pela carga elétrica negativa da goma arábica em pH neutro ou ácido (LIZ et al., 2006). Em pHs extremamente ácidos ($\text{pH} < 2,2$) a dissociação do grupo carboxílico é reduzida, ocorrendo neutralização das cargas da goma (YE; FLANAGAN; SINGH, 2006). A porção proteica do complexo arabinogalactana-proteína e da fração de glicopeptídeo tem como seus maiores constituintes os

aminoácidos hidroxiprolina e a serina. Algumas gomas ainda apresentam em sua estrutura sais minerais de cálcio, magnésio e potássio (BARAY, 2009).

A diversidade química na composição da goma arábica associada com a alta densidade de carga elétrica negativa (seis vezes maior do que qualquer outro polissacarídeo) e com a baixa viscosidade pode explicar a ampla utilização desta goma em procedimentos de microencapsulação (SCHMITT et al. 2000), formação de filme ou estabilizantes de emulsões (MOSCHAKIS, MURRAY & BILIADERIS, 2010; NIXON & WONG, 1989).

2.2.3 Plastificante

Um plastificante é componente essencial na elaboração dos filmes biodegradáveis e/ou comestíveis. São substâncias não voláteis (ou seja, alto ponto de ebulição - PE) e miscíveis e quando adicionadas em outro material provocam mudanças nas propriedades físicas, químicas e/ou mecânicas (HOGAN, 1995).

Os plastificantes podem apresentar caráter hidrofílico, como os polióis (glicerol, sorbitol, derivados de glicerina, entre outros), os monossacarídeos (principalmente a frutose) e os dissacarídeos e hidrofóbico, como os lipídios e seus derivados (ácidos graxos, monoglicerídeos, derivados de éster, entre outros). O caráter hidrofílico dos plastificantes facilita sua incorporação na rede polimérica dos filmes proteínas-polissacarídeos, devido à compatibilidade da natureza do biopolímero com a do plastificante (HOGAN, 1995).

Em termos estruturais, o agente plastificante atua reduzindo as ligações de hidrogênio internas entre o polímero-polímero, enquanto aumenta os espaços intermoleculares, ou seja, os grupos polares (-OH) presentes na cadeia do plastificante estariam formando ligações de hidrogênio com a cadeia polimérica, substituindo as interações polímero-polímero por polímero-plastificante nos filmes

(GARCÍA, MARTINO & ZARITZKY, 2000; GENNADIOS et al. 1993; MAFTOONAZAD, RAMASWAMY & MARCOTTE, 2007). Acredita-se que os plastificantes reduzem as forças intermoleculares ao longo da cadeia polimérica, transmitindo flexibilidade ao filme, enquanto diminui as propriedades de barreira (McHUGH & KROCHATA, 1994).

Plastificantes com menor massa molar inserem-se com maior facilidade na rede polimérica do filme, conferindo maior eficiência de plastificação. Este efeito pode estar relacionado à disponibilidade de átomos de oxigênio na formação das pontes de hidrogênio, ao comparar diferentes tipos de plastificantes (SOTHORNVIT & KROCHTA, 2001).

A escolha do plastificante a ser adicionado aos filmes comestíveis deve ser feita de acordo com a compatibilidade deste com o polímero e o solvente utilizado. Esse plastificante deve ser miscível às macromoléculas para que não haja a separação durante a secagem do filme (GUILBERT, 1986) e, se possível solúvel no solvente utilizado (MAHMOUND & SAVELO, 1992).

Consequentemente, além de influenciar as características mecânicas e térmicas como tensão na ruptura e transição vítrea (BODMEIER & PAERATAKUL, 1997) respectivamente, podem provocar mudanças nas propriedades de adesão, e nas suas propriedades de barreira ao vapor de água e a gases (LIN, CHEN & RUN-CHU, 2000).

Existem vários plastificantes sendo utilizados na elaboração de filmes e coberturas comestíveis, entre eles o sorbitol (CARVALHO & GROSSO, 2004; SOBRAL, 1999) e o glicerol (GONTARD et al., 1994) e a triacetina (LIN, CHEN & RUN-CHU, 2000). A larga aplicação destes plastificantes nos filmes biodegradáveis está associado à sua estabilidade e a sua comestibilidade (TONGDEESOONTORN et al. 2011). Os efeitos do tipo de plastificante, bem como a escolha de sua concentração, são processos complexos, pois o mesmo interfere diretamente nas características do filme. A habilidade destes plastificantes em mudar as propriedades físicas e de permeabilidade à água do

filme dependerá da sua estrutura química (massa molecular, configuração e o número total de grupos hidroxil funcional) e da sua compatibilidade com o polímero (CHAMBI & GROSSO, 2006).

Outros compostos (por exemplo, ácidos graxos, ceras e surfactantes) também podem atuar como plastificantes em filmes a base de proteínas ou polissacarídeos, onde sua incorporação pode promover a redução da tensão na ruptura e elevar a flexibilidade. Como pode ser verificado nos trabalhos de SHELLHAMMER & KROCHTA (1997) em filmes de proteínas do soro de RODRIGUEZ et al. (2006) em filmes de amido de batata de ANDREUCETTI et al. (2011) em filmes de gelatina.

2.2.3.1 Glicerol

O glicerol é um dos plastificantes mais utilizados na elaboração de filmes biodegradáveis (McHUGH & KROCHTA, 1994; HOQUE, BENJAKUL & PRODPRAN, 2011; ZIANI et al. 2008). Esta larga aplicação do glicerol nos filmes deve-se a algumas características como: segurança, vantagens econômicas e pela habilidade deste plastificante em melhorar a flexibilidade dos filmes pela redução das interações interpoliméricas, além de ser não tóxico e não irritável (HUANG et al. 2007).

Na Figura 4 pode-se observar a fórmula estrutural da molécula de glicerol. A baixa massa molar (92 g/mol) deste plastificante facilita sua incorporação na matriz polimérica, o que justifica seu alto efeito plastificante. Por exemplo, a adição do glicerol diminui a fragilidade do filme de gelatina, por reduzir as forças intermoleculares entre as cadeias poliméricas conferindo maior flexibilidade (MENDIETA-TABOADA et al. 2005).

As propriedades e características funcionais do glicerol explicam a ampla utilização deste plastificante na elaboração de filmes biodegradáveis (PEREDA,

ARANGUREN & MARCOVICH, 2008; TONGDEESOONTORN et al. 2011; GALDEANO et al. 2009).

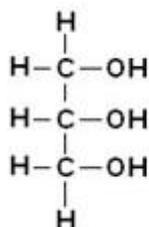


Figura 4. Estrutura química do glicerol.

2.2.3.2 Triacetina

A triacetina é reconhecida como um ingrediente alimentar seguro para o ser humano, segundo a Food and Drug Administration - FDA (FIUME, 2003) e quando adicionada a solução filmogênica melhora as propriedades de barreira ao vapor de água, além de oferecer extensibilidade, adesividade e resistência a ruptura nos filmes (JIANG et al. 2010). Estas propriedades em conjunto com a característica não tóxica da triacetina permitem sua utilização como agente plastificante na elaboração de filmes biodegradáveis e/ou comestíveis. Este plastificante é da família dos ésteres, nome químico triacetato de gliceril ($\text{C}_3\text{H}_5(\text{OCOCH}_3)_3$, massa molar de 218g/mol). A triacetina apresenta ponto de fusão de 3,2°C, ponto de ebulição de 140°C, densidade de 1,115g/cm³, é transparente, incolor, solúvel na maioria dos solventes orgânicos e possui boa estabilidade na presença de luz (EMERY OLEO CHEMICALS, 2013).

De acordo com MOTA, SILVA & GONÇALVEZ (2009), a síntese da triacetina ocorre através da esterificação do glicerol com ácido acético (cuja molécula é HOOCCH_3 foi simplificada na reação como HOAc). Esta reação ocorre em três

passos de esterificação, no primeiro passo tem-se a formação do monoacetina, depois a diacetina e por fim a triacetina, e em cada passo tem-se a produção de uma molécula de água, como subproduto, como pode ser observado na Figura 5.

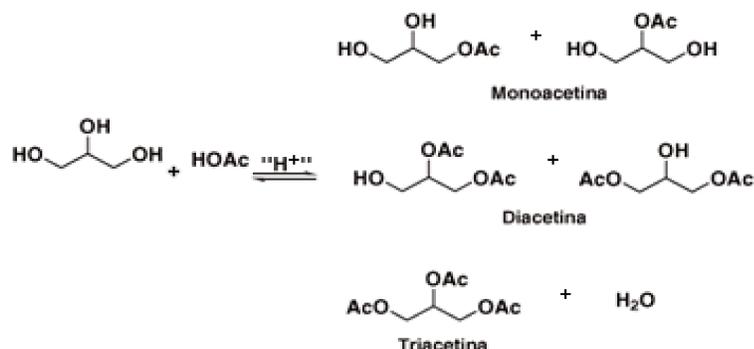


Figura 5. Formação da triacetina a partir da acetilação do glicerol com ácido acético (Fonte: MOTA, SILVA & GONÇALVEZ, 2009).

A triacetina exuda com mais facilidade do que a molécula de glicerol, em decorrência da sua maior massa molar e do seu caráter hidrofóbico, o que explica o menor poder plastificante da triacetina. Na mistura a base de hidroximetilcelulose evidenciou-se a pobre eficiência plastificante da triacetina frente ao glicerol e ao propileno glicol (HARDY, COOK & MELIA, 2006). Entretanto, alta eficiência plastificante da triacetina foi observada nos filmes de gelatina de pele de bagre (JIANG et al. 2010) e nos filmes de gelatina bovina (BERTAN et al. 2005).

2.2.4 Agente ajustador de pH e Solvente

Os solventes mais utilizados na elaboração de filmes comestíveis são: água, etanol ou a combinação de ambos (KESTER & FENNEMA, 1986). Um aspecto determinante na elaboração de filmes é a solubilidade de proteínas e a

capacidade das mesmas de interagir com o solvente utilizado, uma vez que a solubilidade total da proteína e/ou polissacarídeo é necessária para o processo de formação destes filmes (ARVANITTOYANNIS, 2002).

A dispersão da molécula de proteína em água é possível devido ao grande número de resíduos de aminoácidos polares e apolares, que interagem com o solvente. Essas interações podem ser melhoradas em função da constante dielétrica do solvente, uma vez que essa constante é inversamente proporcional à força da atração intermolecular. Solventes com alta constante dielétrica favorecem a solubilidade de proteínas, diminuindo a força de atração entre as moléculas (SGARBIERI, 1996).

Para alguns polissacarídeos e proteínas podem tornar-se necessário ajuste do pH da solução para se formar um solução homogênea, ou seja, para que uma maior solubilidade do biopolímero seja atingida. O pH da solução, a força iônica e o tipo de solvente empregados na elaboração das soluções filmogênicas são parâmetros que podem ser modificados para alterar as propriedades mecânicas e a porosidade dos filmes (ARVANITTOYANNIS, NAKAYAMA & AIBA, 1998).

O pH da solução filmogênica é controlado, visando uma maior solubilização, portando o agente ajustador de pH, influencia a solubilidade da proteína. O ponto isoelétrico (pI) da proteína – quando uma molécula apresenta igual número de cargas positivas e negativas – corresponde ao pH de menor solubilidade proteica. 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). Dentre os ajustadores de pH utilizados, diversos são encontrados na literatura: ácido acético glacial, hidróxido de sódio representam alguns exemplos (CARVALHO, 1997).

Vários estudos relatam o efeito do pH nas propriedades funcionais dos filmes comestíveis, como em filmes emulsionados a base de proteínas isoladas do soro e cera de abelha (PEREZ-GAGO & KROCHTA, 1999), filmes emulsionados de proteína do soro e ácido esteárico (YOSHIDA & ANTUNES, 2004), filmes

polieletrólitos de quitosana-alginato (YAN, KHOR & LEE-YONG, 2000), filme complexo de pectina-quitosana (YAO, LIU, CHENG, LU & TU, 1996), filme polieletrólito de quitosana (SILVA et al. 2008), entre outros.

2.3 Interação Proteína-Polissacarídeo

A interação entre proteínas-polissacarídeos tem despertado a atenção de muitos cientistas nas últimas décadas, devido seu grande potencial em formar novos biomateriais (BORAL & BOHIDAR, 2010). O desenvolvimento desses biomateriais são uma tentativa de remeter a organização da vida celular para a aplicação industrial, por exemplo, a parede celular de plantas (composta por proteínas e polissacarídeos) é utilizada como modelo para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis e/ou comestíveis. Outras aplicações apresentam o mesmo objetivo como a microencapsulação, separação e purificação de proteínas, e no processamento de alimentos (WANG, LEE, WANG & HUANG, 2007).

Os filmes biodegradáveis podem ser produzidos utilizando apenas um biopolímero (denominado como filme simples) ou contendo mais de um biopolímero (denominado como filme composto). A combinação entre dois biopolímeros diferentes poderia associar as propriedades desejáveis dos diferentes materiais, resultando em filme composto com melhor funcionalidade do que um filme simples. Entretanto, a grande dificuldade desta combinação é prever o comportamento dos biopolímeros, principalmente o tipo de interação entre os componentes (TOLSTOGUZOV, 2002).

A proteína e os polissacarídeos podem interagir de forma atrativa (por exemplo, atrações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e de van der Waals) ou de forma repulsiva. As interações atrativas entre os biopolímeros formam complexos entre proteínas-polissacarídeos, como pode ser visualizadas na Figura 6. A formação do complexo ocorre através da

interação eletrostática atrativa entre os biopolímeros com cargas elétricas opostas, estas interações atrativas são responsáveis por formar complexos solúveis ou insolúveis (com separação de fase). A formação de duas fases líquidas, uma concentrada contendo macromoléculas de cargas opostas e outra diluída em ambos é denominada de coacervação complexa (BUNGENBERG DE JONG & KRUYT, 1929). Entretanto, na Figura 6 pode-se observar que as interações repulsivas entre proteínas-polissacarídeos podem conduzir a co-solubilidade e a incompatibilidade termodinâmica (separação de fase), onde se encontra uma fase rica em proteína e outra rica em polissacarídeo (TOLSTOGUZOV, 2002).

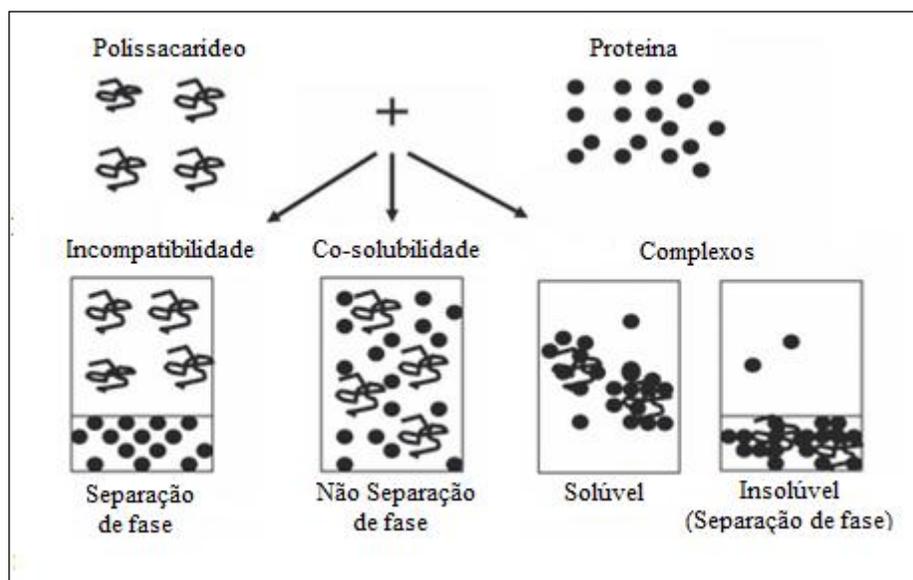


Figura 6. Tipos de interações entre proteínas e polissacarídeos. (Fonte: YE, 2008).

A distribuição de cargas nos biopolímeros tem papel decisivo na estabilidade dos sistemas, os coloides permanecem dispersos e em suspensão em sistemas com cargas iguais, porém uma forte densidade de cargas opostas induz a precipitação ou a gelificação dos coloides. A solubilidade dos complexos

também esta intimamente ligada à carga residual do sistema, onde o excesso carga de uma das macromoléculas pode interagir com o solvente tornando o complexo solúvel (XIA & DUIN, 1994; TOLSTOGUZOV, 1997). Dentro dos complexos insolúveis e eletricamente neutros tem-se a coacervação complexa, sendo uma das técnicas físico-químicas utilizadas na elaboração de microencapsulas de ingredientes/princípios ativos aplicadas na área alimentícia, farmacêutica e na agropecuária.

A formação do complexo (solúvel ou coacervado) é influenciado pela variação no pH, força iônica, razão entre os biopolímeros, concentração total dos biopolímeros em solução e a condição de preparo (velocidade de agitação, temperatura, entre outros). Estes parâmetros afetam o número de carga elétrica nos biopolímeros, e conseqüentemente, a intensidade das interações eletrostáticas presente no complexo (YE, FLANAGAN & SINGH, 2006).

O pH desempenha um importante papel na formação do complexo proteína-polissacarídeo, por influenciar diretamente o grau de ionização do grupos laterais carregados dos biopolímeros (por exemplo, grupo amina e carboxila) (SCHMITT et al. 1998). Portanto, em pH maior do que o ponto isoelétrico (pI) da proteína, a proteína apresenta carga elétrica negativa (ionização do grupo carboxila - COO^-) que pode ser neutralizada pela carga oposta dos polissacarídeos podem ser catiônicos (exemplo, quitosana). Entretanto, em pH menor que o pI, a carga elétrica da proteína mostra-se positiva (ionização do grupo amina - NH_3^+), sendo neutralizada pela presença de polissacarídeos aniônicos (exemplo, goma arábica, pectina, entre outros). A neutralização das cargas opostas entre os biopolímeros resulta na máxima interação eletrostática de atração e na formação do complexo proteína-polissacarídeo (SCHMITT et al. 1998).

A adição de alta concentração de sal na solução de proteína-polissacarídeo aumenta a força iônica da mesma, o sal libera microíons em solução que competem com as cargas dos biopolímeros reduzindo a interação eletrostática (WEINBRECK et al. 2003; YE, FLANAGAN & SINGH, 2006).

A razão proteína:polissacarídeos na mistura pode influenciar o balanço de carga elétrica no complexo afetando o comportamento do complexo (YE, 2008). Portanto, o excesso de um dos polímeros leva a uma quantidade de cargas excedentes no sistema prejudicando a formação do complexo.

A alta concentração de biopolímeros favorece a liberação de muitos contraíons em solução, que reprime a complexação e aumenta a solubilidade do complexo (WEINBRECK et al. 2003). A competição dos biopolímeros pelo solvente pode promover a separação de fase do sistema, devido a incompatibilidade termodinâmica (TOLSTOGUZOV, 1997).

As condições físicas de preparo como temperatura, tipo e tempo de agitação e pressão podem afetar significativamente a formação e estabilidade do complexo proteína-polissacarídeo (TURGEON et al. 2003).

2.4 Filmes Complexos de Proteínas-Polissacarídeos

O filme de proteína-polissacarídeo devido à natureza hidrofílica de seus constituintes apresenta barreira efetiva contra o oxigênio (O₂), gás carbônico (CO₂), aromas e lipídios. No entanto, outras propriedades (baixa barreira ao vapor de água, alta solubilidade e em alguns casos pobre propriedade mecânica) são inferiores ao comparar com os filmes sintéticos (KROCHTA & MULDER-JOHNSTON, 1997).

Estas propriedades indesejáveis podem limitar a aplicação do filme de proteína-polissacarídeo, além disso, a migração de umidade pode influenciar a qualidade e a vida de prateleira dos alimentos envolvidos por este tipo de filme (SZTUKA & KOLODZIEJSKA, 2008). A funcionalidade e a estabilidade do filme a base de proteína-polissacarídeo pode ser melhorada com a modificação da rede polimérica, por tratamento físico (HERNÁNDEZ-MUÑOZ, VILLALOBOS & CHIRALT, 2004), químico (USTONOL & MERT, 2004) ou enzimático (CARVALHO

& GROSSO, 2004). Entre as modificações químicas pode-se destacar a formação de filmes complexos ou polieletrólitos de proteínas-polissacarídeos, onde alterações no pH do meio pode intensificar a ionização dos grupos laterais da proteínas e do polissacarídeos favorecendo a interação eletrostática atrativa entre os biopolímeros com cargas opostas.

Filmes polieletrólitos e complexos são formados quando biopolímeros de cargas positivas (policátions) ou negativas (poliânions) interagem eletrostaticamente, e geralmente, estes complexos apresentam-se solúveis em água. As cargas dos polieletrólitos devem ser suficientemente grandes para ocorrer interações eletrostáticas significantes, se a quantidade de cargas for muito excessiva pode causar precipitação (YE, 2008).

YIN, YAO, CHENG & MA (1999) elaboram filmes complexos de quitosana e gelatina e avaliaram o efeito da proporção estequiométrica dos biopolímero nas propriedades mecânicas e no inchamento. Estes autores alegaram que a formação do complexo polieletrólito entre a quitosana e a gelatina reduziu o inchamento e melhorou as propriedades mecânicas dos filmes.

Filmes polieletrólitos de quitosana e alginato mostraram-se transparentes, flexíveis e resistentes a dissolução em água, ácido e base (YAN, KHOR & LIM, 2000).

2.5 Características e Propriedades Funcionais dos filmes proteína-polissacarídeo

Tensão na ruptura (TR) e alongação (ELO) são propriedades mecânicas apresentadas pelos biofilmes, onde a tensão na ruptura é a máxima tensão suportada pelo filme até o momento de sua ruptura e a alongação mede a habilidade do filme em deformar antes que ocorra à ruptura. As propriedades mecânicas dos filmes ou coberturas dependem da natureza do material filmogênico utilizado e da coesão estrutural, o grau de coesão esta intimamente

ligada à presença de interações intra e intermoleculares na matriz polimérica do filme.

XU et al. (2005) avaliaram o efeito da proporção estequiométrica entre a quitosana e amido na propriedade mecânica dos filmes compostos. Estes autores relataram que o máximo valor de TR ocorreu na proporção estequiométrica 1:1, o que poderia ser indicativo da máxima interação entre os biopolímeros. Para os valores de ELO, os filmes compostos de quitosana-amido apresentaram comportamento similar.

Filmes compostos de amido de ervilha-goma xantana apresentaram um aumento da TR, ao elevar a concentração de amido na mistura (MATTA et al. 2011). Neste mesmo trabalho foi realizado um estudo para avaliar o efeito da adição do glicerol nas propriedades mecânicas dos filmes, e os autores verificaram que o aumento na concentração do glicerol aumentou a flexibilidade dos filmes e reduziu a resistência, como já era esperado pela ação do plastificante.

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) desempenha um importante papel nas reações de deterioração dos alimentos, por esta razão, a PVA é um dos parâmetros extensivamente estudados em filmes (RAO et al. 2010).

Nos filmes compostos de quitosana-amido, a PVA reduziu significativamente com a adição do amido (XU, KIM, HANNA & NAG, 2005). Estes resultados evidenciaram a forte interação entre o amido e a quitosana nos filme, sendo estas interações confirmada pelo espectro de FTIR e de difração de raio-X.

PEREDA, ARANGUREN & MARCOVICH (2009) relataram que a combinação entre a quitosana-caseinato de sódio produziu filmes com propriedades de barreira ao vapor de água com valor intermediário ao valor de PVA dos filmes de quitosana e caseinato na forma pura. Estes autores ainda observaram o efeito da incorporação do agente plastificante (glicerol) nos filmes de quitosana-caseinato e mostraram que a inclusão do glicerol promoveu maior

mobilidade na rede polimérica, facilitando o transporte de vapor de água através do filme.

A solubilidade em água (SOL) é uma importante propriedade dos filmes para definir o tipo de aplicação para esta embalagem, por exemplo, filmes solúveis não podem ser usados para embalar produtos com alta atividade de água (KROCHTA, 2002).

Em filmes compostos de amido de ervilha-goma xantana, a incorporação de amido e glicerol aumentou a SOL, isto já era esperado devido a alta hidrofiliabilidade destes componentes (MATTA et al. 2011).

O aspecto visual dos filmes deve apresentar opacidade (Op) e coloração atrativas, e não deve sofrer alteração de cor com o tempo de armazenamento, para não prejudicar a aceitação do produto acondicionado.

O efeito da adição de goma arábica no aspecto visual e na opacidade dos filmes compostos de quitosana-goma arábica foram estudados anteriormente (RAO, KANATT & SHARMA, 2010). A adição de goma arábica conferiu maior transparência, sendo a redução na Op proporcional ao aumento na concentração da goma.

As análises de térmicas (calorimetria diferencial de varredura – DSC), espectrométricas (espectroscopia com transformada de Fourier – FTIR) e de difração de raio-X (DRX) são técnicas utilizadas para verificar se adição de um composto (plastificante, biopolímero, agente ajustador de pH, entre outros) provocaram alguma alteração estrutural. Vários trabalhos dispuseram destas técnicas para explicar possíveis interações entre compostos. Entre eles, podem-se destacar os trabalhos de TONGDEESOONTORN et al. (2011), PINOTTI et al. (2007) e CHENG et. al. (2003). Os primeiros autores citados utilizaram as técnicas de FTIR e DSC para explicar as interações entre o amido de mandioca-carboximetilcelulose. Já CHENG et. al. (2003) usaram todas as técnicas (DSC, FTIR e DRX) para avaliar se ocorreu compatibilidade entre a gelatina e quitosana nos filmes compostos.

2.6 Referências Bibliográficas

ANDREUCETTI, C.; CARVALHO, R. A.; GALICIA-GARCIA, T.; MARTINEZ-BUSTOS, F.; GROSSO, C. R. F. Effects of surfactants on the functional properties of gelatin-based edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 103, n. 2, p. 129-136, 2011.

ANDREUCETTI, C. Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis a base de gelatina, plastificantes hidrofóbicos e surfactantes naturais. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2010. 241p.

ANDREUCETTI, C.; CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Gelatin-based films containing hydrophobic plasticizers and saponin from *Yucca shidigera* as the surfactant. **Food Research International**, v. 43, n. 6, p. 1710-1718, 2010.

ARVANITOYANNIS, I. S. Formation and properties of collagen and gelatin films and coatings. GENNADIOS, A. (Ed), In: **Protein-Based Films and Coatings**, CRC Press, chap11, 2002.

ARVANITOYANNIS, I. S.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S. Chitosan and gelatin edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. **Carbohydrate Polymers**. V. 37, n. 4, p. 371-382, 1998.

BABIKER, E. E. Effect of chitosan conjugation on the functional properties and bactericidal activity of gluten peptides, **Food Chemistry**, v. 79, p. 367-372, 2002.

BARAY, S. Acacia Gum. CHO, S. S.; SAMUEL, P. (Eds), Fiber Ingredients – **Food Applications and Health Benefits**, cap. 7, CRC Press, 2ªEd. 2009.

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

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

BLOUT, E. R.; CARVER, J. P.; GROSS, J. Intrinsic cotton effects in collagen and poly-L-proline. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 5, p.644-646, 1998.

BORAL, S.; BOHIDAR, H. B. Effect of ionic strength on surface-selective patch binding-induced phase separation and coacervation in similarly charged gelatin-agar molecular systems. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, p. 12027-12035, 2010.

BUNGENBERG DE JONG, H. G.; KRUYT, H. R. Coacervation (partial miscibility in colloid systems). **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen**, 32, 849-856, 1929.

CANER, C.; VERGANO, P. J.; WILES, J. L. Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer, and store. **Journal Food Science**, v. 63, p. 1049-1053, 1998.

CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Characterization of based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 717-726, 2004.

CHAMBI, H.; GROSSO, C. Edible films with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. **Food Research International**, v. 39, n. 4, p. 458-466, 2006.

CHENG, M.; DENG, J.; YANG, F.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. **Biomaterials**, v. 24, p. 2871-2880, 2003.

CLAESSON, P. M.; NINHAM, B. W. pH-dependent interactions between adsorbed chitosan layers. **Langmuir**, v. 8, n. 5, p. 1406-1412, 1992.

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

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Edible film and coating as active layers, In: **Active Food Packaging**, London, Edr. M. L. Rooney, Blackie Academic & Professional, p. 11-142, 1995.

DJAGNY, K. B.; WANG, Z.; XU, S. Y. Gelatin: A valuable protein for food and pharmaceutical industries: Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 41, n. 6, p. 481-492, 2001.

FARRIS, S.; SCHAICH, K. M.; LIU, L.; COOKE, P. H.; PIERGIOVANNI, L.; YAM, K. L. Gelatin-pectin composite films from polyion-complex hydrogels. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 61-70, 2011.

FENNEMA, O. R. (ed) **Food Chemistry**, 3edition. New York: Marcel Dekker, Inc., p. 1055-1080, 1996.

FERNANDEZ, M. L. Pectin – Composition, chemistry, physicochemical properties, food applications, and physiological effects. DREHER, M.L. & CHO, S. S. (Eds), In: **Handbook of Dietary Fiber**, CRC Press, chap 30, 2001.

FERREIRA, C. O.; NUNES, C. A.; DELGADILLO, I.; LOPES-DA-SILVA, J. A. Characterization of chitosan-whey protein films at acid pH. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 807-813, 2009.

FIUME, M. Z. Final report on the safety assessment of triacetin. **International Journal of Toxicology**, v. 22, supplement 2, p. 1-10, 2003.

GALDEANO, M. C.; MALI, S.; GROSSMANN, YAMASHITA, F.; GARCÍA, M. A. Effects of plasticizers on the properties of oat starch films. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 512-538, 2009.

GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Microstructural characterization of plasticized starch-based films and coatings. **Starch-Stärke**, v. 52, n. 4, p. 118-124, 2000.

GENNADIOS, A. Protein as raw materials for films and coatings. In: **Protein-based Films and Coatings**, GENNADIOS, A. (eds), CRC Press, Ch 1, 2002.

GENNADIOS, A.; BRANDENBURG, A. H.; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F. Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1835-1839, 1993.

GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F. Temperature effect on oxygen permeability of edible protein-based films. **Journal of Food Science**, v. 58, n.1, p. 212-214, 1993a.

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

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

GIANCONE, T.; TORRIERI, E.; PIERRO, P. D.; MARINIELLO, L.; MORESI, M.; PORTA, R.; MASI, P. Role of constituents on the network formation of hydrocolloid edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 89, p. 195-203, 2008.

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

GUILBERT, S.; CUQ, B.; GONTARD, N. Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials. **Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk**, v. 14, n. 6-7, p. 741-751, 1997.

GUPTA, A. N.; BOHIDAR, H. B. Surface patch binding induced intermolecular complexation and phase separation in aqueous solutions of similarly charged gelatin-chitosan molecules. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, p. 10137-10145, 2007.

HERNANDEZ-MUNOZ, P.; VILLALOBOS, R.; CHIRALT, A. Effect of thermal treatments on functional properties of edible films made from wheat gluten fractions. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 4, p. 647-654, 2004.

HOAGLAND, P.; PARRIS, N. Chitosan/pectin laminated films, **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1915-1919, 1998.

HOGAN, J. E. Film-coating materials and their properties. COLE, G. (Eds), **Pharmaceutical Coating Technology**, CRC Press, chap 2, p.6-50, 1995.

JIANG, M.; LIU, S.; DU, X.; WANG, Y. Physical properties and internal microstructures of films made from catfish skin gelatin and triacetin mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 105-110, 2010.

JOHNSTON-BANKS, F. A. Gelatin. In: **Food gels**, Harris, P. (Ed.), London: Elsevier Applied Science Pub, p. 233–289, 1990.

JOUKIA, M.; KHAZAEIB, N.; GHASEMLOUC, M.; HADINEZADC, M. Effect of glycerol concentration on edible film production from cress seed carbohydrate gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, p. 39–46, 2013.

KAMBUROVA, K.; MIKOVA, V.; PETKANICHIN, I.; RADEVA, T. Effect of pectin charge density on formation of multilayer films with chitosan. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 1242-1247, 2008.

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

KIM, S. Processing and properties of gluten/zein composite. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2032–2036, 2008.

KIM, W. J.; SOSULSKI, F.; LEE, S. C. K. Chemical and gelation characteristics of ammonia-demethylated sunflower pectins. **Journal of Food Science**, v. 43, n. 5, p. 1436- 1439, 1978.

KOKOSZKA, S.; DEBEAUFORT, F.; HAMBLETON, A.; LENARD, A.; VOILLEY, A. Protein and glycerol contents affect physic-chemical properties of soy protein isolate-based edible films. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 503-510, 2010.

KOŁODZIEEISKA, I.; PIOTROWSKA, B.; BULGE, M.; TYLINGO, R. Effect of transglutaminase and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide on the solubility of fish gelatin-chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, n. 4, p. 404-409, 2006.

KOWALCZYK, D.; BARANIAK, B. Effect of plasticizers, pH and heating of film-forming solution on the properties of pea protein isolate films. **Journal of Food Engineering**, v. 105, p. 295-305, 2011.

KROCHTA, J. A. Protein as raw materials for films and coatings: Definitions, current status, and opportunities. GENNADIOS, A. (Ed), In: **Protein-based films and coatings**, CRC Press, chap. 1, 2002.

KROCHTA, J.A.; DeMULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, v. 51, n. 2, p. 61-74, 1997.

EMERY OLEO CHEMICALS. Triacetina.

http://www.cibraquim.net.br/NT_sis.php?chave=abrepdf&arquivo=390_189084_Triacetina_Kosher.pdf, acesso em 26/07/2013.

LEE, S. H. Preparation and evaluation of crosslinked polyelectrolyte complex membranes. **Polymer Journal**, v. 32, n. 9, p. 716-721, 2000.

LI, Y. F.; JIA, H. P.; CHENG, Q. L.; PAN, F. S.; JIANG, Z. Y. Sodium alginate-gelatin polyelectrolyte complex membranes with both high water vapor permeance and high permeance selectivity. **Journal of Membrane Science**, v. 375, n. 1-2, p. 304-312, 2011.

LIZ, C. C. C.; PETKOVA, V.; BENATTAR, J. J.; MICHEL, M.; LESER, M. E.; MILLER, R. X-ray reflectivity studies of liquid films stabilized by mixed β -lactoglobulin-Acacia gum systems. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 282-283, p. 109-117, 2006.

LOOTENS, D.; CAPEL, F.; DURSND, D.; NICOLAI, T.; BOULENGUER, P.; LANGENDORFF. Influence of pH, Ca concentration, temperature and amidation on the gelation of methoxyl pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 237-244, 2003.

MAFTOONAZAD, N.; RAMASWAMY, H. S.; MARCOTTE, M. Evaluation of factors affecting barrier, mechanical and optical properties of pectin-based films using response surface methodology. **Journal of Food Process Engineering**, v. 30, n. 5, p. 539-563, 2007.

MAHMOUND, R., SAVELLO, P. A. Mechanical properties and water vapor transferability through whey protein films. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 942-946, 1992.

MAO, S.; SUNA, W.; KISSEL, T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 62, p. 12–27, 2010.

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

MATIA-MERINO, L.; LAU, K.; DICKINSON, E. Effects of low-methoxyl amidated pectin and ionic calcium on rheology and microstructure of acid-induced sodium caseinate gels. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 2, p. 271-281, 2004.

MATTA, M. D.; SARMENTO, S. B. S.; OLIVEIRA, L. M.; ZOCCHI, S. S. Mechanical properties of pea starch films associated with xanthan gum and glycerol. **Starch-Starke**, v. 63, n. 5, p. 274-282, 2011.

MATTA, M. D.; SARMENTO, S. B. S. Propriedades de barreira e solubilidade de filmes de amido de ervilha associado com goma xantana e glicerol. **Polímeros**, v. 21, n. 1, p. 67-72, 2011.

MCCLEMENTS, D. J. Food emulsions: **Principles, practices, and technique** (2nd ed.). Boca Raton, FL: CRC Press.

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

MENDIETA-TABOADA, O.; SOBRAL, P. J. A.; CARVALHO, R. A.; HABITANTE, A.M. B. Q. Thermomechanical properties of biodegradable films based on blends of gelatin and poly(vinyl alcohol). **Food Hydrocolloids**, v. 22, 1485-1492, 2008.

MINEMOTO, Y.; FANG, X.; HAKAMATA, K.; WATANABE, Y.; ADACHI, S.; KOMETANI, T.; MATSUNO, R. Oxidation of linoleic acid encapsulated with soluble soybean polysaccharide by spray-drying. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n. 9, p. 1829-1834, 2002.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A. GONÇALVES, V. L. C. Glycerochemistry: new products and processes from glicerol of biodiesel production. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.638-648, 2009.

MURILLO-MARTÍNEZ, M. M.; PEDROZA-ISLAS, R.; LOBATO-CALLEROS, C.; MARTÍNEZ-FEREZ, A.; VERNON-CARTER, E. J. Designing $W_1/O/W_2$ double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapor properties. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 577-585, 2011.

MULLER, B. P.; GEBHARDT, R. MAURER, E.; BAUER, E.; GEHRKE, R.; DOSTER, W. Thin casein films as prepared by spin-coating: influence of film thickness and of pH. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 6, p. 1773-1780, 2006.

NIXON, J. R.; WONG, K. T. Evaluation of permeation through polymeric membranes as a model for the release of drugs from gelatin-acacia walled microcapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 50, p. 205-212, 1989.

OH, J. H.; WANG, B.; FIELD, P. D.; AGLAN, H. A. Characteristics of edible films made from dairy protein and zein hydrolysate cross-linked with transglutaminase. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 287-294, 2004.

OLIVAS, G.I.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Edible coatings for fresh-cut fruits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 45, p. 657–670, 2005.

PAGGA, U. Biodegradability and compostability of polymeric materials in the context of the European packaging Regulation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 371-376, 1998.

PARK, S. Y.; MARSH, K. S.; RHIM, J. W. Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. **Journal Food Science**, v. 67, p. 194-197, 2002.

PB LEINER (PB Gelatins). Sobre gelatina. Disponível em: http://www.pbgelatins.com/pt/sobre_gelatinas/, acesso em 26/07/2013.

PEREDA, M.; ARANGUREN, M. I.; MARCOVICH, N. E. Characterization of chitosan/caseinate films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 107, n. 2, p. 1080-1090, 2008.

PEREDA, M.; ARANGUREN, M. I.; MARCOVICH, N. E. Water vapor absorption and permeability of films based on chitosan and sodium caseinate. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 111, n. 6, p. 2777-2784, 2009.

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

PIAZZA, L.; DÜRR-AUSTER, N.; GIGLI, J.; WINDHAB, E. J.; FISCHER, P. Interfacial rheology of soy proteins – high methoxyl pectin films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2125-2131, 2009.

PINOTTI, A. GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Study on microstructure and physical properties of composite films based on chitosan and methylcellulose. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 66-72, 2007.

POCHAT-BOHATIER, C.; SANCHEZ, J.; GONTARD, N. Influence of relative humidity on carbon dioxide sorption in wheat gluten films. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 4, p. 983-991, 2006.

POL, H.; DAWSON, P.; ACTON, J.; OGALE, A. Soy Protein Isolate/Corn-Zein Laminated Films: Transport and Mechanical Properties. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 1, p. 212-217, 2002.

POPPE, J. Gelatin, In: **Thickening and gelling agents for food**, New York, Ed. Alan Imenson, Blackie Academic & Professional, Cap. 7, p.144-168, 1997.

RACAPE, E.; THIBAUT, J. F.; REITSMA, J. C. E.; PILNIK, W. Properties of amidated pectins. 2. Poly-electrolyte behavior and calcium-binding of amidated pectins and amidated pectic acids. **Biopolymers**, v. 28, n. 8, p. 1435-1448, 1989.

RALET, M. C.; DRONNET, V.; BUCHHOLT, H. C.; THIBAUT, J. F. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterization, polyelectrolyte behavior and calcium binding properties. **Carbohydrate Research**, v. 336, n. 2, p. 117-125, 2001.

RAO, M. S.; KANATT, S. R.; CHAWLA, S. P.; SHARMA, A. Chitosan and guar gum composite films: Preparation, physical, mechanical and antimicrobial properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 1243-1247, 2010.

REMUNÁN-LOPEZ, C.; BODMEIR, R. Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films. **Journal of Controlled Release**, v. 44, n. 2-3, p. 215-225, 1997.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. A. Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, n. 6, p. 929-967, 2001.

RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 531-539, 2009.

RODRÍGUEZ, M.; OSÉS, J.; ZIANI, K.; MATÉ, J. I. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. **Food Research International**, v. 39, p. 840-846, 2006.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON.S.; HARDY, J. structure and technofunctional properties of protein –polysaccharide complexes: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, p. 689-753, 1998.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Livraria Varela,1996.

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

SILVA, C. L.; PEREIRA, J. C.; RAMALHO, A.; PAIS, A. A. C. C.; SOUSA, J. J. S. Films based on chitosan polyelectrolyte complexes for skin drug delivery: **Development and characterization**, v. 320, n. 1-2, p. 268-279, 2008.

SILVA, M. A.; BIERHALZ, A. C. K.; KIECKBUSCH, T. G. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca²⁺ ions: Effect of the plasticizer concentration. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 4, p. 736-742, 2009.

SOLIVA-FORTUNY, R.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Polysaccharide coating. BAI, J. (Ed), In: **Edible Coatings and Films to Improve Food Quality**, CRC Press, p. 103-136, 2011.

STEPHEN, A. M.; CHURMS, S. C. Introduction. STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (Eds), In: **Food Polysaccharides and their Applications**, Boca Raton, p. 1-24, 2006.

SZTUKA, K.; KOŁODZIEJSKA, I. Effect of transglutaminase and EDC on biodegradation of fish gelatin and gelatin-chitosan films. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 1127-1133.

TALENS, P.; KROCHTA, J. M. plasticizing effects of beeswax and carnauba wax on tensile and water vapor permeability properties of whey protein films. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 3, 2005.

TANABE, T.; OKITSU, N.; TACHIBANA, A.; YAMAUCHI, K. Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film. **Biomaterials**, v. 23, n. 3, p. 817-825, 2002.

THEVENET, F. Acacia gums- stabilizers for flavor encapsulation. **ACS Symposium Series**, v. 370, p. 37-44, 1988.

TOLSTOGUZOV, V. B. Protein-polysaccharide interactions. DAMODARAN, S. & PARAF, A. (Eds), **Food Proteins and their Applications**, Marcel Dekker, p. 171-199, 1997.

TOLSTOGUZOV, V.B. Thermodynamic aspects of biopolymer functionality in biological systems, food, and beverages. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 89-174, 2002.

TONGDEESOONTORN, W.; MAUER, L.; WONGRUONG, S.; SRIBURI, P.; RACHTANAPUN, P. effect of carboxymethyl cellulose concentration on physical properties of biodegradable cassava starch-based films. **Chemistry Central Journal**, v. 5, n. 6, p. 1-8, 2011.

TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, P. K. Preparation and physicochemical evaluation of chitosan/poly(vinyl alcohol)/pectin ternary films for food-packaging applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 711-716, 2010.

TURGEON, S. L.; BEAULIEU, M.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 8, n. 4-5, p. 401-414, 2003.

USTUNOL, Z.; MERT, B. Water solubility, mechanical, barrier, and thermal properties of cross-linked whey protein isolate-based films. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 3, p. E129-E133, 2004.

VENUGOPAL, V. Polysaccharides: their characteristics and marine sources. In: **Marine Polysaccharides Food Applications**, CRC Press, chap 1, 2011.

VERBEEK, C. J. R.; VAN DER BERG, L. E. Extrusion processing and properties of protein-based thermoplastics. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 295, p. 10-21, 2010.

WANG, X. Y.; LEE, J. Y.; WANG, Y. W.; HUANG, Q. R. Composition and rheological properties of beta-lactoglobulin/pectin coacervate: Effects of salts concentration and initial protein/polysaccharide ratio. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 3, p. 992-997, 2007.

WEINBRECK, F.; DE VRIES, R.; SCHROOYEN, P.; KRUIF, C. G. Complex coacervation of whey proteins and gum Arabic. **Biomacromolecules**, v. 4, 0. 293-303, 2003.

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

WILLIAMS, P. A.; PHILIPS, G. O. Gum Arabic – Production, Safety and Physiological Effects, Physicochemical Characterization, Functional Properties,

and Food Applications. CHO, S. S.; DREHER, M. L. (Eds), **Handbook of Dietary Food**, cap.34, CRC Press, 2ªEd. 2001.

XIA, J. L.; DUBIN, P.L. Chromatographic evaluation of the binding of lysozyme to poly(dimethyldiallylammonium chloride). **Journal of Chromatography A**, v. 667, n. 1-2, p. 311-315, 1994.

XIAO, C.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; ZHANG, L. Study of blend films from chitosan and hydroxypropyl guar gum. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 90, p. 1991-1995, 2003.

XU, Y. X.; KIM, K. M.; HANNA, M. A.; NAG, D. Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 21, n. 2, p. 185-192, 2005.

YAN, X.; KHOR, E.; LIM, L-Y. PEC films prepared from chitosan-alginate coacervates. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, n. 7, p. 941-946, 2000.

YAO, K. D.; LIU, J.; CHENG, G. X.; LU, X. D.; TU, H. L.; SILVA, J. A. L. Swelling behavior of pectin/chitosan complex films. **Journal of Applied Polymers Science**, v. 60, p. 279-283, 1996.

YE, A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 406-415, 2008.

YE, A.; FLANAGAN, J.; SINGH, H. Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseinate and gum Arabic. **Research, Science and Technology Biopolymers**, v. 82, p. 121-133, 2006.

YIN, Y. J.; YAO, K. D.; CHENG, G. X.; MA, J. B. Properties of polyelectrolyte complex films of chitosan and gelatin. **Polymer International**, v. 48, n. 6, p. 429-432, 1999.

YOSHIDA, C. M. P.; ANTUNES, A. J. Characterization of whey protein emulsion films. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 2, p. 247-252, 2004.

ZHANG, Y., XUE, CH., LI, Z., ZHANG, Y., FU, X. Preparation of half-deacetylated chitosan by forced penetration and its properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 229–234, 2006.

ZHONG, Q-P.; XIA, W-S.; Physicochemical properties of edible and preservative films from chitosan/cassava starch/gelatin blend plasticized with glycerol. **Food Technology Biotechnology**, v. 46, n. 3, p. 262-269, 2008.

Capítulo 3

Filmes biodegradáveis de
Gelatina/Quitosana elaborados pelo
método de coacervação.

3 FILMES BIODEGRADÁVEIS DE GELATINA E QUITOSSANA ELABORADOS PELO MÉTODO DE COACERVAÇÃO COMPLEXA.

Resumo

Filmes a base de gelatina suína tipo B e quitossana foram preparados utilizando o método de coacervação complexa. O ponto de máxima interação eletrostática ocorre onde cargas elétricas do grupo amina de quitossana ($-\text{NH}^+$, carregada positivamente) neutralizam-se com as do grupo carboxil da gelatina ($-\text{COO}^-$, carregado negativamente). Esta neutralização ocorre em um valor de pH definido como pH_{zeta} ou pH de coacervação, nesta condição de pH a carga elétrica é neutra (medido pelo ζ -potencial zeta igual a zero). Portanto, a análise do potencial zeta das soluções filmogênicas de GEL/QUI (1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 6:1, 8:1, 10:1 e 20:1) foi utilizada para definir a condição de pH de coacervação dos filmes. Todos os filmes foram caracterizados fisicamente pelas propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água, solubilidade em água, umidade e opacidade e por difração de raio-X (DRX) e espectroscopia de infravermelho (FTIR). Análises complementares de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram realizadas em alguns filmes. Para a formulação com maior tensão na ruptura e menor permeabilidade foram testadas novas concentrações de material polimérico (4, 6, 8 e 10%), com o intuito de reduzir o tempo de secagem de 24h para os filmes contendo 2% de material polimérico. Ao contrabalançar o tempo de secagem com as propriedades funcionais desejáveis (alta tensão na ruptura, baixa permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água) selecionou-se a concentração de material polimérico para realizar a adição do agente plastificante (glicerol e triacetina), nas concentrações 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25 e 30g de plastificante/100g de material

polimérico. A análise de potencial zeta foi eficaz para definir o pH ótimo (6,2 - 7,2) para elaboração dos filmes coacervados de gelatina e quitossana. Formulações contendo maior teor de gelatina (proporção 10:1 e 20:1 de GEL/QUI) produziram filmes coacervados com maior resistência à ruptura e flexibilidade, além de apresentar melhor barreira ao vapor de água. A difração de raio-X constatou maior cristalinidade nos filmes de GEL/QUI nas proporções estequiométricas 10:1 e 20:1 e maiores interações eletrostáticas atrativas entre as cadeias da gelatina e a quitossana, comprovada pelo FTIR. O método de coacervação produziu filmes com alta tensão na ruptura ($84,25 \pm 2,60$ MPa, na proporção 10:1), alta barreira ao vapor de água ($0,11 \pm 0,01$ g.mm/m².h.kPa, na proporção 10:1) e baixa alongação ($3,66 \pm 0,64\%$, na proporção 10:1) na maioria das formulações testadas, em relação aos filmes compostos (sem ajuste de pH). Nas formulações 1:2, 1:1, 2:1 e 4:1 de GEL/QUI a solubilidade em água foi menor do que nos filmes compostos. Filme coacervado elaborado com 6% de material polimérico reduziu pela metade o tempo de secagem. Portanto, a adição do plastificante (triacetina e glicerol) foi realizada na formulação com melhores propriedades funcionais (alta tensão na ruptura e baixa permeabilidade ao vapor de água), fixando-se a formulação contendo 6% de GEL/QUI na proporção 10:1. A triacetina apresentou menor incorporação na matriz filmogênica do que glicerol, apresentando um limite de saturação de 20g de plastificante/100g de material polimérico. As análises de DRX, FTIR e DSC comprovaram a boa incorporação da triacetina e do glicerol (20g de plastificante/100g) na matriz filmogênica. O glicerol executou seu papel, como agente plastificante, com maior eficiência do que a triacetina no filme coacervado de GEL/QUI, em concentrações acima de 20g de glicerol/100g de material polimérico. Em todas as concentrações estudadas o glicerol não alterou os valores de opacidade e de permeabilidade ao vapor de água dos filmes coacervados, sendo que em algumas formulações agiu reduzindo a PVA. Tanto a adição do glicerol quanto a da triacetina conferiram menor resistência mecânica e maior solubilidade em água aos filmes resultantes.

Palavras-Chave: biodegradable films, coacervation, gelatin-chitosan complexes, plasticization.

3.1 Introdução

O número de estudos sobre filmes biodegradáveis/comestíveis elaborados a partir de proteínas, polissacarídeos ou lipídios individualmente ou combinados tem apresentado aumento nas últimas décadas. Esta estratégia visa em especial contornar ou diminuir os problemas apresentados pelo acúmulo de embalagens sintéticas convencionais no meio ambiente, devido ao elevado período de degradação, gerando graves problemas de poluição ambiental.

Inicialmente acreditava-se na possibilidade de substituição integral das embalagens sintéticas por embalagens produzidas com material biológico, porém algumas limitações funcionais apresentadas pelos materiais biodegradáveis (alta fragilidade e higroscopicidade do material) e problemas quanto aos processos de produção (a elaboração dos filmes via casting limita a produção desta embalagem em larga escala, devido ao alto custo e a descontinuidade do processo) direcionaram as pesquisas para uma perspectiva mais modesta. Os polímeros naturais podem substituir parcialmente e / ou associar-se com os polímeros sintéticos resultando em filmes funcionalmente adequados com características de biodegradação enzimática razoáveis. Um segundo propósito também importante, considera a possibilidade de utilização dos polímeros naturais muitas vezes caracterizados como subprodutos da indústria alimentícia, como fontes de matéria-prima melhorando seu aproveitamento.

Funcionalmente os macrocomponentes de alimentos apresentam vantagens e desvantagens na produção de matrizes homogêneas e contínuas. Dentre os macrocomponentes, os filmes lipídicos mostram-se bons evitando o transporte do vapor de água através da película lipídica, porém suas

características mecânicas são extremamente pobres (frágeis e quebradiços). Por outro lado, filmes elaborados a partir de proteínas ou polissacarídeos apresentam boa barreira ao oxigênio, e quando adicionados de plastificante apresentam propriedades mecânicas razoáveis, porém são pobres como barreira ao vapor de água, apresentando problemas em relação à adsorção de água em umidades relativas altas.

A interação entre proteínas e polissacarídeos tem atraído interesse devido seu grande potencial em formar novos biomateriais, sendo alguns desses aplicados na regeneração de tecidos, revestimento de medicamentos, microencapsulação, imobilização de enzima e filmes biodegradáveis. As proteínas e polissacarídeos podem interagir da seguinte forma: (A) miscíveis e coexistem em um sistema transparente; (B) separação de fase devido à incompatibilidade e a repulsão entre os biopolímeros e (C) complexos polieletrólitos ou complexos coacervados (KRUIF & TUINIER, 2001, YE, 2008).

A formação do complexo coacervado ocorre pela interação eletrostática entre cargas opostas de dois biopolímeros (DE JONG & KRUYT, 1929). Essa interação é dirigida pela proximidade das cargas elétricas opostas, portanto quanto menor a distância entre as cargas, maior será a intensidade das interações eletrostáticas atrativas. As forças eletrostáticas atrativas e repulsivas das cadeias poliméricas são diretamente influenciadas pelo pH. Na maioria dos casos de interação entre proteína-polissacarídeo, o ponto máximo de interações eletrostáticas, conhecido como pH de coacervação, ocorre na faixa de pH entre o valor do pK do grupo aniônico (grupos carboxila) do polissacarídeo e o pI (ponto isoelétrico) da proteína (YE, 2008). Nesta faixa de pH, encontra-se um valor de pH (definido como pH_{zeta}) onde as cargas elétricas positivas e negativas apresentam a mesma intensidade e se neutralizam através das interações eletrostáticas. Muitos autores tem utilizado a medida de mobilidade eletroforética (potencial zeta) para determinar a intensidade de carga elétrica das soluções poliméricas em função do pH (GUPTA & BOHIDAR, 2007; GUZEY & McCLEMENTS, 2006; MOUNSEY, O'KENNEDY; FENELON & BRODKORB, 2008; HONG, McCLEMENTS, 2007). A

partir desta medida pode-se determinar o valor do $\text{pH}_{\text{coacervação}}$ no ponto onde ζ -potencial zeta é igual a zero.

Complexos coacervados solúveis e insolúveis de proteínas-polissacarídeos podem ser utilizados para produzir microcapsulas, embalagens comestíveis, ingredientes alimentícios e outros materiais (WEINBRECK, MINOR & KRUIF, 2004; YE, 2008). Na literatura pode-se verificar resultados promissores das propriedades funcionais dos filmes de proteína-polissacarídeo elaborados pelo método de coacervação (PEREDA, ARANGUREN & MARCOVICH, 2008).

O alto peso molecular da quitosana é uma característica favorável na elaboração de filmes, favorecendo as ligações hidrogeniônicas intra e intermoleculares, formando filmes resistentes, elásticos, flexíveis, de difícil rompimento, boas propriedades de barreira ao oxigênio e baixa barreira ao vapor de água, além de sua característica antimicrobiana (MUZZARELLI; PETER, 1997; BUTLER et al. 1996). Parâmetros como fonte de quitina, propriedades do material (massa molar, grau de deacetilação, etc), solvente e metodologia de preparação do filme podem afetar na qualidade do material formado. Por exemplo, quanto maior o grau de deacetilação da quitosana, maior será sua densidade de carga elétrica positiva.

A cadeia polimérica de gelatina por ser composta de mistura de aminoácidos ácidos e básicos, apresentando uma característica anfótera ou polieletrólítica (presença de carga elétrica positiva e/ou negativa). O sinal da carga elétrica das proteínas está diretamente relacionada ao valor do pH do meio. O ponto isoelétrico (pI) é o valor de pH onde a carga elétrica líquida da proteína encontra-se nula, em níveis de pH abaixo do pI, a proteína apresenta carga elétrica positiva e em níveis acima do pI, cargas negativas. Por exemplo, as moléculas gelatina tipo B (pI=4,8-5,2) em pH=6,0, já exibem cargas negativas e a cadeia molecular fica frouxa e pouco flexível, devido a alta concentração de regiões hidrofóbicas ao longo da cadeia polimérica (HARRINGTON & MORRIS, 2009, MOHANTY et al., 2007).

O caráter catiônico da quitossana possibilita a estabilização da estrutura do filme, através da interação eletrostática entre o grupo amina (NH_3^+) e grupo carboxila (COO^-) da GEL possibilitando a formação de filmes coacervados (PEREDA, ARANGUREN & MARCOVICH, 2008). A gelatina (caráter aniônico, íons carboxila - COO^-) e quitossana (caráter catiônico, íons amônio - NH_3^+) na condição de eletroneutralidade das cargas (pH_{zeta}) da solução filmogênica podem formar filmes coacervados através de interações eletrostática atrativa, reduzindo repulsão eletrostática inter e intramolecular entre as cadeias poliméricas.

O objetivo deste trabalho foi de investigar o efeito do método de coacervação nas propriedades funcionais dos filmes, em relação a: (I) a proporção estequiométrica entre gelatina (GEL) e quitossana (QUI); (II) concentração do material polimérico e (III) adição de plastificante.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material

Gelatina tipo B (suína, 40 mesh, marca Leiner Davis Gelatin Brasil, Cotia - São Paulo), quitossana com grau de desacetilação de 80% (<50mesh, marca Polymar, Fortaleza, Brasil). Como plastificantes foram utilizados a triacetina (cedida pela Rhodia, Brasil) e o glicerol (Merck - São Paulo, Brasil). Hidróxido de amônia (Merck – São Paulo, Brasil) foi utilizado como agente ajustador de pH.

3.2.2 Preparação dos filmes

As soluções poliméricas foram preparadas individualmente: Quitosana - QUI foi preparada dispersando-se 2 g de quitosana em 100 mL de ácido acético (1%), esta solução foi mantida sob agitação magnética em temperatura constante (60 ± 5 °C), durante 2 horas. Posteriormente, a solução foi centrifugada por 10 min a 4000 rpm a temperatura ambiente (25 ± 2 °C), sendo o sobrenadante (contendo 1,75% de quitosana) separado e utilizado na elaboração dos filmes. Gelatina tipo B – GEL (2%) foi solubilizada de acordo com a metodologia descrita por CARVALHO & GROSSO (2004), onde 2 g de gelatina tipo B foram hidratadas em 100 mL de água deionizada por 30 min, em temperatura ambiente, dissolvidas por agitação mecânica (60°C) durante 15 min. Após a solubilização dos biopolímeros, as soluções de GEL e de QUI foram misturadas mantendo a concentração final polimérica de 2 g de biopolímero 100 g^{-1} de solução filmogênica, variando-se a proporção estequiométrica entre a GEL e a QUI (Tabela 2). Após esta etapa, realizou-se o ajuste de pH com NH_4OH com auxílio de um pHmetro (DIGMED) até atingir o pH_{zeta} (valor de pH definido pelo método do ζ - Potencial Zeta, ver item 3.3.1).

Foi realizado um teste preliminar para avaliar o efeito do agente ajustador de pH (hidróxido de sódio – NaOH e o hidróxido de amônia – NH_4OH) nas propriedades funcionais e no aspecto visual dos filmes coacervados de GEL/QUI, como pode ser verificado no ANEXO.

As condições otimizadas para filmes de GEL/QUI foram definidas de acordo com suas propriedades mecânicas, de permeabilidade ao vapor de água e de solubilidade em água, descritas no item 3.3.3.

Em relação à proporção estequiométrica de GEL/QUI, definiu-se o melhor filme na condição de coacervação (pH_{zeta}), neste foi realizado um estudo de concentração de material polimérico (4, 6, 8 e 10 g de biopolímero 100 g^{-1} de solução filmogênica). Estes filmes foram elaborados seguindo o mesmo protocolo de elaboração descrito anteriormente e posteriormente foram caracterizados e selecionados.

A adição do agente plastificante (2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25 e 30 g plastificante 100 g⁻¹ de material polimérico) foi realizada para a melhor concentração de material polimérico, ou seja, filmes que apresentaram melhores propriedades funcionais com menor tempo de secagem. A formulação contendo o plastificante (triacetina ou glicerol) foi submetida à agitação magnética a 50 ± 5°C por 10 min e posteriormente foi feito o ajuste de pH (pH_{zeta}).

As alíquotas de 20-25 mL foram retiradas diretamente da solução filmogênica e dispersadas em placas de plaxglass (Pleion) de 15cm de diâmetro e mantidas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e 31 ± 5 % de umidade relativa (URE) por 24 h para secagem e armazenadas. Os filmes secos foram removidos e condicionados em dessecadores a 25 ± 2 °C e 52 ± 5 %URE, durante 7 dias e posteriormente caracterizados.

Tabela 2. Composição dos filmes de GEL/QUI.

GEL/QUI	Gelatina (%)	Quitosana (%)
1:0	100	0
20:1	95	5
10:1	91	9
8:1	89	11
6:1	86	14
4:1	80	20
2:1	66	34
1:1	50	50
1:2	34	66
0:1	0	100

3.2.3 Potencial zeta

O pH_{zeta} é definido como ponto ótimo onde ocorre o máximo de interações eletrostáticas entre grupo carboxila livre da GEL (COO^-) e grupo amina da QUI (NH_4^+) provocando a eletroneutralidade (ζ -potencial zeta igual a zero) da solução filmogênica (SURH, DECKER & MCCLEMENTS, 2006). O potencial zeta (ζ -potencial zeta) foi determinado experimentalmente tendo como referência o trabalho de MOUNSEY, KENNEDY, FENELON, BRODKORB (2008). As soluções filmogênicas foram preparadas com 0,4 g de polímero/100mL de solução, este sistema foi colocado em um Becker em banho para controle da temperatura (50 ± 5 °C) e submetido à agitação magnética por 10min. O pH da solução filmogênica foi ajustado no intervalo de 5,5 a 7,5, utilizando-se solução de hidróxido de amônia - NH_4OH (1N) e o ζ -potencial zeta determinado utilizando-se um equipamento Malvern Zetamaster (Malvern Instruments Ltda).

O valor do pH_{zeta} foi obtida através da curva do potencial zeta em função do pH e determinado no ponto onde o valor ζ -potencial zeta é igual a zero.

3.2.4 Aspecto Visual e Espessura

Inicialmente, os filmes foram caracterizados pelas análises visuais e táteis, visando-se utilizar apenas os filmes homogêneos (ausência de partículas insolúveis e coloração uniforme), contínuos (sem a presença de rupturas ou zonas quebradiças) e resistentes ao manuseio (facilidade de desprendimento dos filmes da placa suporte). Os filmes que não apresentaram tais características foram descartados. A espessura do filme foi determinada pela média aritmética de 10 medidas aleatórias sobre a área do filme, utilizando-se um micrômetro digital Modelo MDC-25M, Mitutoyo, MFG (Tóquio, Japão) com 0,001 mm de resolução.

3.2.5 Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas (tensão na ruptura TR e alongação na ruptura ELO) foram determinadas utilizando-se um texturômetro TA-XT2 (Stable Micro System, Surrey, UK) de acordo com o método ATM D D882-95 (ASTM, 1995a). A separação inicial foi fixada em 50mm e a velocidade do teste foi de 1mm/s. A TR e a E foram obtidas diretamente da curva de tração versus tempo.

3.2.6 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA, $\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$) foi determinada pelo método E-96-95 da ASTM (ASTM, 1995b) a $25\pm 5^\circ\text{C}$. As amostras dos filmes foram cortadas na forma de discos e fixadas no interior das células de permeação feitas de acrílico, contendo cloreto de cálcio anidro (0% URE). As células de permeação foram acondicionadas em dessecadores contendo solução salina saturada de cloreto de sódio em temperatura e umidade relativa ($75 \pm 3\%$ URE). O vapor de água transferido através do filme foi determinado pelo ganho de massa no sistema, referente a cinco medidas durante um período de 48 horas. Os dados foram registrados em um gráfico de ganho de peso versus tempo. A PVA foi calculada através da equação:

$$PVA = gx / tAP_o(RH_1 - RH_2)$$

Onde g/t é o coeficiente angular da equação da reta de ganho de massa versus tempo (g/t), x é a espessura média do filme (mm), A é a área de permeação (m^2), P_o é a pressão parcial de vapor d'água a 25°C (kPa) e $(RH_1 - RH_2)$ é o gradiente de umidade relativa do meio contendo cloreto de cálcio anidro (0%

UR) e solução salina saturada de cloreto de sódio (NaCl, umidade relativa = 75%). As análises foram realizadas em triplicata para cada filme.

3.2.7 Solubilidade em água

A solubilidade em água dos filmes foi feita de acordo com & GUILBERT (1994). Amostras na forma de disco (2cm de diâmetro) foram pesadas, para determinar a massa inicial (m_i) e imersas em um béquer contendo 50 mL de água deionizada, mantidos sob lenta agitação lenta (Shaker Marconi, São Paulo, Brasil) por um período de 24h, a temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$). Após este período, as amostras remanescentes foram retiradas da solução e secas em estufa com circulação de ar (105°C por 24 h) para determinação da massa final seca (m_f). A solubilidade em água (SOL) foi calculada conforme a equação:

$$SOL(\%) = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) 100$$

3.2.8 Opacidade

Opacidade (Op) dos filmes foi determinada utilizando-se colorímetro Hunterlab (Colorquest II, Reston, VA, USA) pelo método da ASTM D523 (ASTM, 1999). As determinações foram feitas em triplicata após a calibração do colorímetro com padrão branco e padrão preto, quando a $Op = (OpB/Opp) \times 100$, sendo Op porcentagem de opacidade do filme, Opb opacidade do filme com o fundo branco e Opp opacidade do filme com o fundo preto.

3.2.9 Difração de Raio-X

O difratograma dos filmes foi obtido utilizando-se um difratômetro de raio-X (Rigaku D, Max, Tokyo, Japan) com radiação de $\text{CuK}\alpha$ (1,542 Å) na voltagem de 30kV e 30mA (ANDREUCETTI, CARVALHO & GROSSO, 2010). As amostras foram submetidas a uma velocidade de varredura de 2°min^{-1} entre $2\theta = 5-35^\circ$.

3.2.10 Espectroscopia de infravermelho

O espectro de infravermelho com transformada de Fourier foi realizado de acordo com a metodologia descrita por VICENTINI, DUPUY, LEITZELMAN, CEREDA & SOBRAL (2005), utilizando-se um espectrômetro IR Prestige-2 Shimadzu (Kioto, Japão). Para cada filme, efetuou-se 10 varreduras em um intervalo espectral de $400-4000\text{cm}^{-1}$ e resolução de 4cm^{-1} .

3.2.11 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As temperaturas de transição vítrea foram determinadas por análise calorimétrica de varredura utilizando-se um DSC 882e (TA Instruments, Mettler Toledo, Ohio, EUA). As amostras ($5\text{mg}\pm 0,0001\text{g}$) foram pesadas em uma microbalança (Boeco CE 03 0111, Alemanha) e condicionadas em cápsulas herméticas de alumínio em dessecadores contendo sílica gel por 7 dias ($25\pm 2^\circ\text{C}$). O equipamento foi calibrado com indium. As amostras condicionadas foram aquecidas a $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, entre 30 e 250°C em ambiente inerte ($100\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de N_2) e como referência foi utilizada uma cápsula vazia. A temperatura de transição

vítrea (T_g) e a entalpia de fusão (ΔH) foram calculados utilizando o *software* Universal Analysis V3.9A (Ta Instruments Thermal Analysis, Ohio, EUA).

3.2.12 Microscopia Eletrônica de Varredura

As análises morfológicas dos filmes foram realizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), onde as amostras foram condicionadas em dessecador contendo sílica gel ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) por um período de 7 dias e depois foram fraturadas com nitrogênio líquido. As amostras foram cobertas com ouro através do sputter coater POLARON SC7620 (Ringemer, Inglaterra), 3-5 mA por 180 s, após este procedimento foram realizadas observações morfológicas da secção transversal dos filmes, utilizando o microscópio LEO 440i (Cambridge, Inglaterra), a 5 kV.

3.2.13 Análise Estatística

O programa SAS foi utilizado para calcular as análises de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para avaliar diferenças entre as médias no intervalo de 95% de confiança.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Potencial Zeta

O filme coacervado é formado por interações eletrostáticas entre as cargas elétricas opostas dos biopolímeros. A intensidade desta interação é governada pela densidade e natureza da carga elétrica do sistema polimérico. Segundo DUCEL, RICHARD, SAULNIER, POPINEAU & BOURY (2004) a carga elétrica do biopolímero é fortemente influenciada pela condição de pH do meio. Por esta razão, realizou-se um estudo para definir a condição de pH otimizada (pH_{zeta}) para elaboração dos filmes coacervados através da medida do potencial eletrocinético (ζ -potencial zeta) da solução filmogênica. Nesta condição de pH ocorre o máximo de interação eletrostática atrativa entre os grupos carregados da GEL e QUI, neutralizando as cargas elétricas dos polímeros (ζ -potencial zeta igual a zero), segundo AKEN (2006). Na Figura 7 pode-se observar a curva do ζ -potencial zeta em função do pH (variando de 5 a 7,5) das soluções filmogênicas de GEL, QUI e de GEL/QUI, em várias proporções estequiométricas.

Os valores do ζ -potencial da solução de quitosana (QUI controle) apresentam carga elétrica positiva na faixa de pH 5,0 - 7,5, isto ocorre pela presença de grupos aminas ($-\text{NH}_4^+$) protonados em pH ácido ou próximos ao seu pK_a (6,5), este mesmo comportamento foi verificado por HONG & McCLEMENTS (2007) e TERBOJEVICH & MUZZARELLI (2000). Ao titular a solução de QUI com álcali observa-se uma progressiva perda de carga positiva da QUI, quando o pH foi elevado de 5,0 (ζ -potencial = 54,6 mV) para 7,5 (ζ -potencial = 9,0 mV). Segundo HONG & McCLEMENTS (2007) isto ocorre devido a desprotonação do grupo amino em pH próximo ao valor do pK_a da QUI (em torno de 6,3).

O comportamento da curva do ζ -potencial zeta da solução de gelatina (GEL controle) em pH 5,0 apresenta-se nulo, devido a proximidade do valor de pH ao ponto isoelétrico (4,8 – 5,2) da GEL (POPPE, 1997). Ao elevar o pH de 5,0 para 7,5 evidencia-se um progressivo aumento na intensidade da carga negativa de 0,83 para -28mV. A alcalinização do meio promove a protonação dos íons carboxílicos ($-\text{COO}^-$) da GEL que interagem com os cátions da QUI formando complexos coacervados (MAO et al. 2003).

Todas as formulações de GEL/QUI testadas na faixa de pH de 5,0 a 6,2 apresentaram carga positiva. Este comportamento pode ser atribuído ao fato da quitosana apresentar alta densidade de carga positiva em relação a carga negativa da gelatina. Por exemplo, a solução controle de QUI em pH 5,5 apresenta +50 Mv (solução de quitosana inicial dissolvida com ácido acético), enquanto o potencial da GEL foi de -8 mV nas mesmas condições de pH (Figura 7). O complexo GEL/QUI foi formado entre as interações do grupo carboxílico ($-\text{COO}^-$) da GEL e pelo grupo amina ($-\text{NH}_3^+$) da QUI, sendo que em pH 5,0 o grupo carboxílico da GEL encontra-se desprotonado ($-\text{COO}^- + \text{H}^+ \leftrightarrow -\text{COOH}$), esta neutralidade contribui com a alta densidade de carga positiva entre o complexo.

Ao elevar o valor de pH de 5,0 para 7,5 observa-se redução no ζ -potencial da solução filmogênica de GEL/QUI, o que reflete na menor disponibilidade de carga elétrica positiva proveniente da QUI. Este comportamento pode ser explicado, primeiramente, pelo fato do aumento no número de grupos carboxílicos carregados negativamente na superfície da gelatina, o qual facilitaria a interação com os grupos positivos da QUI (HONG & McCLEMENTS, 2007). Em segundo lugar, em pHs próximos ou acima de 6,5 ocorre a desprotonação do grupo $-\text{NH}_3^+$ reduzindo a densidade de carga positiva. SILVA et al. (2008) relataram que em pHs próximos ao pK_a (6,5), o grau de ionização da molécula de quitosana reduziu drasticamente, diminuindo a repulsão eletrostática entre suas cadeias poliméricas, favorecendo a sua aproximação e a formação de agregados entre as mesmas.

O valor do pH_{zeta} varia de acordo com a composição da solução filmogênica, à medida que diminui o conteúdo de QUI na solução filmogênica de GEL/QUI o valor do pH_{zeta} tende a diminuir, como pode ser observado na formulação com 5% de QUI e 95% de GEL ou GEL/QUI (20:1) apresentando valor de pH_{zeta} de 6,2. Já na formulação contendo maior teor de QUI (GEL/QUI - 1:2), o valor de pH_{zeta} atinge 7,2 (Figura 7), este tipo de solução filmogênica necessita de maior quantidade de hidróxido de amônia para atingir a eletroneutralidade do sistema GEL/QUI (maior disponibilidade de grupo hidroxila), o que explica o alto valor de pH deste sistema.

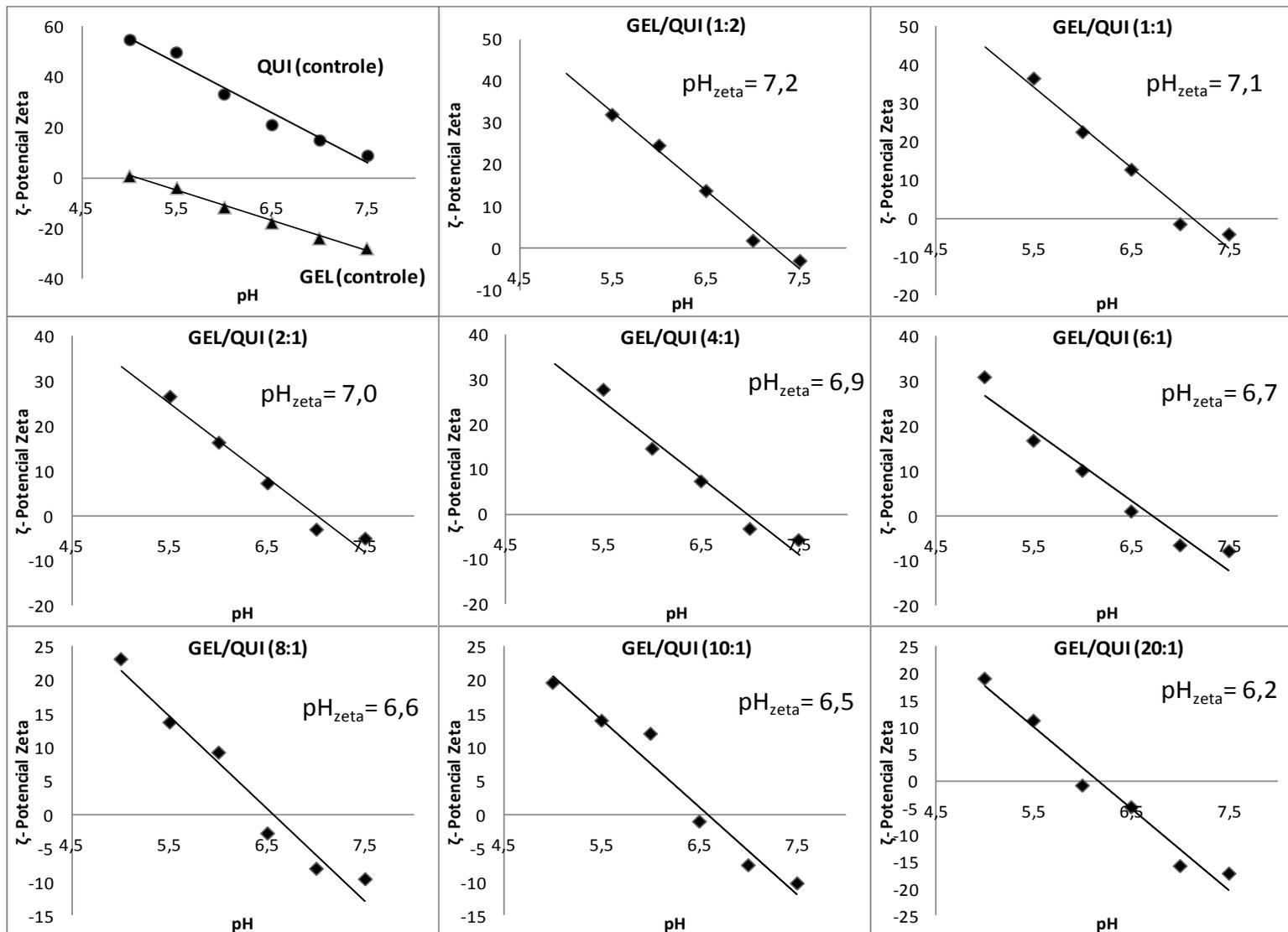


Figura 7. Curva do potencial zeta da solução filmogênica do par polimérico GEL/QUI em função da variação do pH (titulação com NH₄OH) em diferentes proporções estequiométricas.

3.3.2 Aspecto Visual e Espessura

Inicialmente, as soluções filmogênicas de GEL/QUI sem ajuste de pH (na condição de pH inicial - $pH_{inicial}$) mostraram-se translúcidas e homogêneas, já as soluções filmogênicas de GEL/QUI elaboradas em condição de pH_{zeta} apresentaram alta turbidez. Após a secagem, todos os filmes foram classificados como transparentes e homogêneos.

As formulações 1:4, 1:6, 1:8, 1:10 e 1:20 de GEL/QUI foram descartadas por apresentarem alta viscosidade da solução filmogênica impossibilitando a preparação dos filmes coacervados.

Os filmes tornaram-se mais amarelos com o aumento do teor de QUI na formulação, onde o “b(+)” parâmetro de cor passou de 1,8 (0% de QUI ou 1:0 GEL/QUI) para 4,0 (66% de QUI ou 1:2 GEL/QUI). Este mesmo comportamento foi evidenciado por PRODPRAN, BENJAKUL & ARTHARN (2007) em filmes proteicos contendo quitossana e óleo de palma. Os autores observaram um aumento de 41% no valor de b (+) ao adicionar 40% de QUI na formulação.

Todos os filmes foram facilmente removidos da placa, sendo que para os filmes contendo maior teor de QUI (1:2 e 1:1 de GEL/QUI) observou-se maior fragilidade durante o manuseio. Os valores de espessura ($0,028 \pm 0,004$ mm) não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações estudadas.

3.3.3 Efeito da proporção estequiométrica do filme coacervado

O comportamento das propriedades funcionais (tensão na ruptura - TR, alongação - ELO, permeabilidade ao vapor de água - PVA, solubilidade em água - SOL e umidade - UMI) dos filmes coacervados de GEL/QUI em função da proporção estequiométrica entre os biopolímeros, está apresentado nas Tabelas 3 e 4.

Nos filmes coacervados observa-se redução da tensão na ruptura (TR) à medida que se aumenta a concentração de QUI no sistema, formulações 1:1 e 1:2 de GEL/QUI (Tabela 3). Segundo RIVERO, GARCÍA & PINOTTI (2009) a alta massa molar da QUI possibilita a formação de filmes resistentes, devido à formação de ligação hidrogeniônicas intra e intermoleculares. Na literatura verificou-se efeito oposto, o que poderia ser justificado pela ampla diversidade de QUI existente, os fatores que implicam nesta variedade química são: fonte de quitina, grau de acetilação, tipo de solvente e a metodologia utilizada para preparar o filme (BASAVARAJU; DAMAPPA & RAI, 2006).

Ao elevar o teor de GEL na formulação observa-se um aumento significativo nos valores de TR, a maior resistência destes filmes pode ser justificada pela estrutura da GEL. Primeiramente, a GEL por possuir uma cadeia polimérica ampla (18 unidades monoméricas) possibilita a formação de vários tipos de rearranjos moleculares conferindo ao filme uma estrutura mais complexa e aberta (KEENAN, 1998). A complexidade da cadeia da GEL aumenta a possibilidade de interações com outros polímeros, enquanto sua estrutura conformacional reduz o impedimento estérico da cadeia facilitando assim sua interação com a QUI.

Em todas as formulações estudadas, os filmes coacervados apresentam menor valor de ELO, em relação ao filme de GEL (1:0 de GEL/QUI). A QUI adicionada à formulação poderia estar atuando reduzindo a flexibilidade do filme, devido à maior TR de sua cadeia. Este mesmo comportamento foi verificado por CHIO et al. (2008) em filmes de gelatina-quitossana intercrossados com genipina. Outros autores relataram que a QUI adicionada ao filme contribuiu aumentando sua flexibilidade (elevando os valores de ELO), como foi observado nos filmes de gelatina-quitossana (WANG et al. 2009), proteína do soro do leite-quitossana (FERREIRA et al. 2009), alginato-quitossana (MENG et al. 2010), entre outros.

Tabela 3. Efeito da proporção estequiométrica entre os biopolímeros (gelatina - GEL e quitossana - QUI) nas propriedades mecânicas (TR - tensão na ruptura) e na (ELO - alongação) dos filmes coacervados (pH_{zeta}).

GEL/QUI	TR (MPa)*	ELO (%)*
0:1	66,62±1,94 ^e	2,72±0,25 ^{cd}
1:2	44,44±1,54 ^f	2,28±0,10 ^{de}
1:1	48,73±1,13 ^f	1,96±0,05 ^e
2:1	71,01±2,55 ^d	2,51±0,91 ^d
4:1	80,09±1,50 ^{bc}	2,33±0,073 ^d
6:1	76,92±1,25 ^c	2,47±0,43 ^d
8:1	87,00±2,06 ^a	3,74±0,16 ^b
10:1	80,82±0,09 ^{ab}	3,66±0,64 ^b
20:1	84,25±2,60 ^{ab}	3,49±0,25 ^{bc}
1:0	86,18±1,05 ^a	5,39±0,46 ^a

* Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: Letras diferentes minúsculas na vertical representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

A Tabela 4 apresenta os resultados de permeabilidade ao vapor de água (PVA), solubilidade em água (SOL) e umidade dos filmes coacervados de GEL/QUI, em diferentes proporções estequiométricas.

Os filmes coacervados de GEL/QUI com maior teor de GEL (10:1 e 20:1 de GEL/QUI) apresentam menor valor de permeabilidade ao vapor de água (PVA). Geralmente, filme com alto teor de proteína, por seu caráter hidrofílico deveria apresentar altos valores de PVA (RIVERO, GARCÍA & PINOTTI, 2009 e FERREIRA et al. 2009). Este comportamento diferenciado entre os filmes coacervados de GEL/QUI pode ser justificado pela forte interação eletrostática entre os polímeros, onde as cargas elétricas opostas atuam como agente reticulante iônico, o qual atua modificando a matriz da polimérica do filme, formando uma rede mais compacta e reduzindo assim seus valores de PVA.

Observando os valores de SOL dos filmes coacervados de GEL/QUI pode-se constatar uma redução de 63 a 75%, ao comparar com os filmes simples de GEL e QUI. Os filmes simples de GEL e QUI foram preparados sem ajuste de pH, ou seja, apresentam o valor de pH da solução filmogênica 5,9 e 4,3, respectivamente. Nestas condições de pH, tanto a GEL como a QUI apresentam-se totalmente solúveis, como foi verificado pelos valores de solubilidade em água de ambos. Ao elaborar os filmes coacervados em pH_{zeta} ocorre a máxima ionização dos grupos poliméricos e conseqüentemente máxima interação eletrostática, o que explica a drástica redução dos valores de SOL. KIM et al. (2005) também relataram que os filmes compostos de gelatina e quitossana apresentaram maior estabilidade em água que os filmes simples de GEL. Da mesma forma, KOLOSDZIEJSKA et al. (2006) observaram insolubilidade dos filmes compostos de gelatina e quitossana (4:1) a 25°C e pH 6.

Avaliando os filmes coacervados de GEL/QUI em diferentes proporções estequiométricas, observou-se que a SOL reduz à medida que aumenta o teor de QUI na formulação. Portanto, a SOL reduz 59% ao aumentar o teor de QUI de 5% (GEL/QUI 20:1) para 66% de QUI (GEL/QUI 1:2) nos filmes coacervados, os valores de pH (pH_{zeta}) utilizado para preparar os filmes coacervados foram respectivamente 6,2 e 7,2 (Figura 1). Este comportamento pode ser justificado, pela proximidade do valor do pH_{zeta} do valor do pK_a da QUI (6,5), nesta condição a QUI apresenta-se insolúvel (TEBOJEVICH & MUZZARELLI, 2000). Comportamento similar foi relatado no trabalho de PULIERI et al. (2007) em blendas de GEL e QUI, onde o aumento na quantidade de QUI tornou o filme mais estável em meio aquoso (pH 7,4). PRODPRAN, BENJALUL & ARTHARN (2007) observaram redução de 20% na SOL ao aumentar o teor de QUI de 10 à 40% em filmes proteicos e quitossana.

Tabela 4. Efeito da proporção estequiométrica nas propriedades funcionais (PVA, SOL e UMI) dos filmes coacervados de GEL/QUI (pH_{zeta}).

GEL/QUI	PVA (g.mm/m ² .h.kPa)	SOL (%)	UMI (%)
0:1	0,18±0,02 ^{cd}	100,0±2,5 ^a	12,2±1,8 ^b
1:2	0,20±0,013 ^{bc}	15,1±3,2 ^e	12,2±0,5 ^b
1:1	0,19±0,01 ^{bc}	25,6±5,2 ^d	12,0±0,7 ^b
2:1	0,18±0,01 ^{cd}	31,4±1,1 ^{bcd}	2,7±0,5 ^c
4:1	0,26±0,03 ^a	32,3±3,3 ^{bcd}	4,1±0,5 ^c
6:1	0,29±0,01 ^a	24,8±1,5 ^d	9,5±3,7 ^b
8:1	0,22±0,00 ^b	30,4±4,2 ^{cd}	3,1±0,7 ^c
10:1	0,11±0,01 ^e	34,7±4,4 ^{bc}	19,0±2,7 ^a
20:1	0,12±0,01 ^e	36,8±1,6 ^{bc}	12,5±1,3 ^b
1:0	0,16±0,01 ^{cd}	100,0±0,0 ^a	13,2±1,7 ^b

* Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: Letras diferentes minúsculas na vertical representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

Os difratogramas de raio-X dos filmes simples GEL e QUI e dos filmes coacervados de GEL/QUI (nas proporções 1:2 e 10:1) foram apresentados na Figura 8.

O filme simples de GEL e o filme coacervado de GEL/QUI (10:1) apresentaram um pico característico em $2\theta = 7 - 8^\circ$ atribuído a cristalinidade da GEL pela presença de estruturas tripla hélice, em pequenas quantidades. Uma hipótese para este resultado similar entre o filme simples e coacervado, deve-se ao fato da GEL estar em maior quantidade (91%) na matriz polimérica do filme coacervado prevalecendo as características morfológicas desta proteína. Este pico foi também observado por YAKIMETS et al. (2007) para os filmes de gelatina. O pico em $2\theta = 20^\circ$ denota a característica amorfa dos filmes coacervados de GEL/QUI, sendo este perfil um indicativo da alta estabilidade desses filmes.

O difratograma do filme simples de quitosana apresenta caráter amorfo, devido a presença de picos largos em $2\theta = 11^\circ$ e 20° . Comportamento similar foi encontrado por XU, KIM, HANNA & NAG (2005) para o filme simples de QUI. Para outros autores, o filme de QUI apresentou caráter cristalino, com picos agudos e de alta intensidade em $2\theta = 20^\circ$ (YIN, YAO, CHENG & MA, 1999, EPURE, GRIFFON, POLLET & AVÉROUS, 2011). Esta diferença na característica morfológica do filme de QUI pode ser explicada pelos diferentes tipos de fonte de QUI, metodologia utilizada para sua extração, solvente, entres outros aspectos.

O filme coacervado de GEL/QUI (2:1) apresentou dois picos de difração intensidade em 11° e 20° , com características amorfas (picos largos e de baixa intensidade). Este efeito foi similar ao observado para o filme de quitosana (Figura 2b), portanto a natureza amorfa da quitosana prevaleceu sobre a natureza da gelatina. TRIPATHI, MEHROTRA & DUTTA (2010) observaram o mesmo comportamento para os filmes de pectina e quitosana. Na formulação contendo 10:1 de gelatina e quitosana pode-se notar a presença de dois picos em 7° e 20° , com o mesmo aspecto do filme de gelatina. Portanto, a adição da quitosana não provocou alterações no difratograma do filme, isto poderia ser um indício da boa interação entre a quitosana e a gelatina na matriz do filme coacervado. O caráter cristalino do filme coacervado de GEL/QUI (10:1) pode ser mantido pela presença de interações intermoleculares, tais como pontes de hidrogênio e também por interações iônicas entre a gelatina e quitosana.

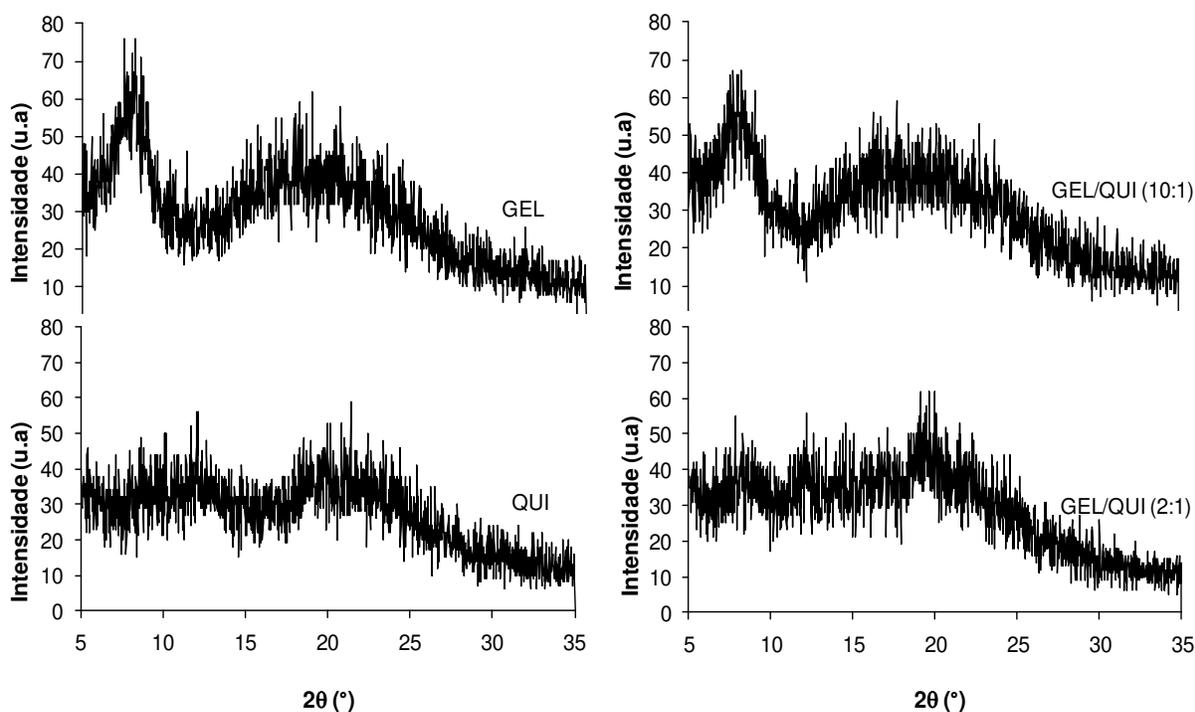


Figura 8. Caracterização microestrutural por difração de raio-X dos filmes controles de gelatina e quitossana e dos filmes coacervados de GEL/QUI (nas proporções 10:1 e 1:2).

Pela espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi obtido o espectro dos filmes simples de GEL, QUI e dos filmes coacervados de GEL/QUI (na proporção 10:1 e 1:2), como pode ser verificado na Figura 9. À análise de FTIR foi realizada na tentativa de confirmar a interação eletrostática entre grupo carboxila da proteína (carregado negativamente) e o grupo amino do polissacarídeo (carregado positivamente) na condição de coacervação (pH_{zeta}), ou seja, na condição máxima de interação.

O espectro de FTIR do filme de GEL apresenta pico de amida-A em 3275 cm^{-1} representando o estiramento NH e de amida-B em 2900 cm^{-1} do estiramento do grupo CH e $-\text{NH}_2$. Entre 1650 e 1200 cm^{-1} foram encontrados três picos característicos do grupamento amida, como: amida I em 1630 cm^{-1} referente a estiramento do C=O e das pontes de hidrogênio acoplados ao COO, amida II em

1530 cm^{-1} consistindo do dobramento do grupo N-H e do estiramento do grupo C-N e amida III em 1240 cm^{-1} , segundo YAKIMETS et al. (2005).

O espectro de FTIR do filme simples de QUI apresenta bandas de absorção características em 3271 e 2877 cm^{-1} que representa o grupo hidroxila (-OH) e o grupo alifático (-CH₃). As bandas em 1634 e 1553 cm^{-1} é um indicativo da presença do grupo amida, que permanece da reação incompleta de desacetilação (sendo que a 1634 cm^{-1} indica a presença do grupo C=O da banda da amida) (SIONKOWSKA et al. 2004; PEREDA, ARANGUREN & MARCOVICH, 2008; HAIDER, PARK & SHIN-LEE, 2008). A ausência da banda em 1680 cm^{-1} (estiramento do grupo C=O) no filme esta relacionada ao processo de amidação da QUI. As bandas presentes entre 1155 e 1025 cm^{-1} referem-se ao estiramento C-O e a deformação vibracional do OH (álcool primário e secundário) da molécula de QUI (PEREDA, ARANGUREN & MARCOVICH, 2008).

No espectro de infravermelho dos filmes coacervados de GEL/QUI (10:1 e 1:2) pode-se observar diminuição do estiramento vibracional do grupo C-O na gelatina e quitossana em 1060 cm^{-1} e 1148 cm^{-1} , ao comparar com o filme simples de QUI. Isto ocorre porque o grupo NH da quitossana interage com o grupo COOH da gelatina, reduzindo o estiramento de ambos (KIM et al. 2005). Outra explicação levantada por HAIDER, PARK & LEE (2008), que relacionaram este comportamento ao processo de amidação que ocorreu entre os íons amônia (-NH₃⁺) da QUI e os íons carboxilatos (-COO⁻) da GEL, devido a interação eletrostática entre os polímeros. O FTIR para os filmes coacervados na proporção de 10:1 (GEL/QUI) apresentou maior intensidade no pico em 1630 cm^{-1} do que no filme contendo 1:2 de GEL/QUI. Segundo YAKIMETS et al. (2005) este pico esta relacionado à banda da amida I, portanto, quanto maior a intensidade deste pico maior será a presença deste grupamento na estrutura do filme. O grupamento amida (1630 cm^{-1} , estiramento assimétrico do grupo carboxilato - COO⁻) indica que ocorreu interação eletrostática intermolecular entre o grupo amina da quitossana e o grupo carboxila da gelatina (RASHIDOVA et al. 2004), sendo assim a formação do complexo coacervado de GEL/QUI foi mais efetiva na proporção 10:1 do que na proporção 1:2. A alta intensidade do pico em 1457 cm^{-1} nos filmes

coacervados (10:1 de GEL/QUI) poderia ser outro indício da forte interação eletrostática entre gelatina e quitossana (KIM et al. 2005).

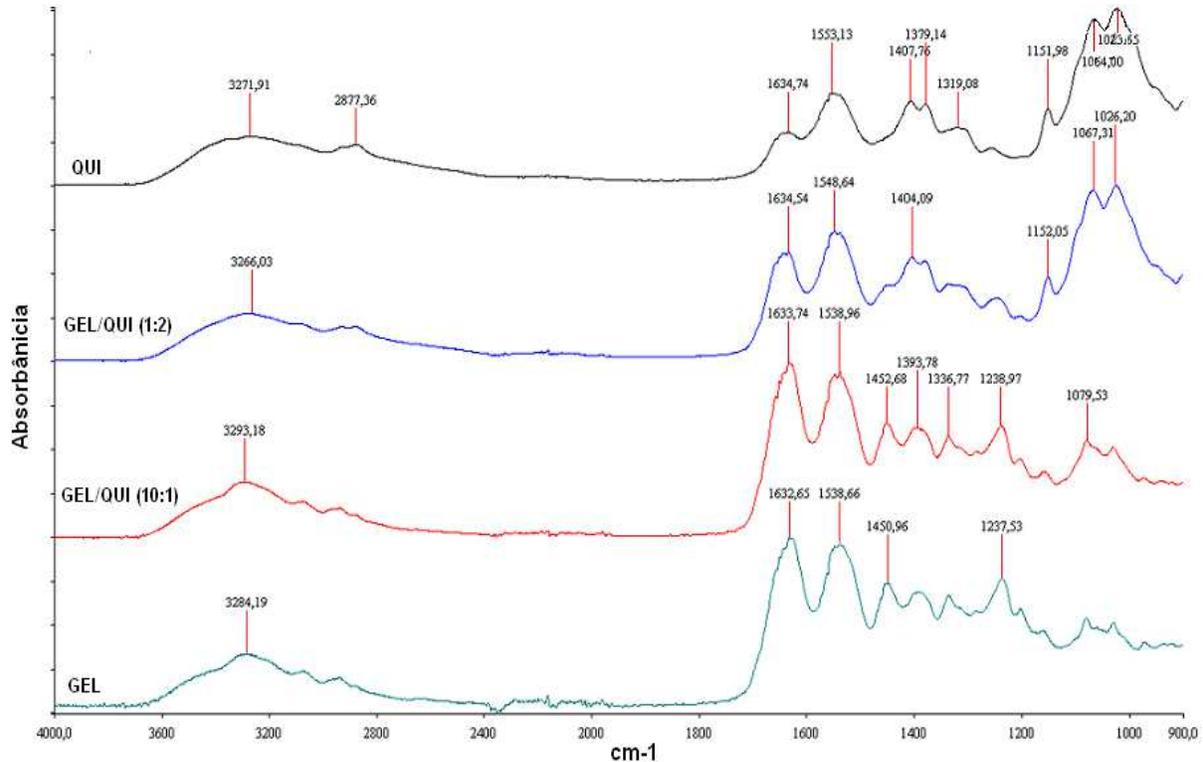


Figura 9. Espectrometria de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) dos filme controle (gelatina e quitossana), filme coacervados de GEL/QUI nas proporções 10:1 e 1:2.

3.3.4 Efeito do método de coacervação nas propriedades funcionais dos filmes de GEL/QUI

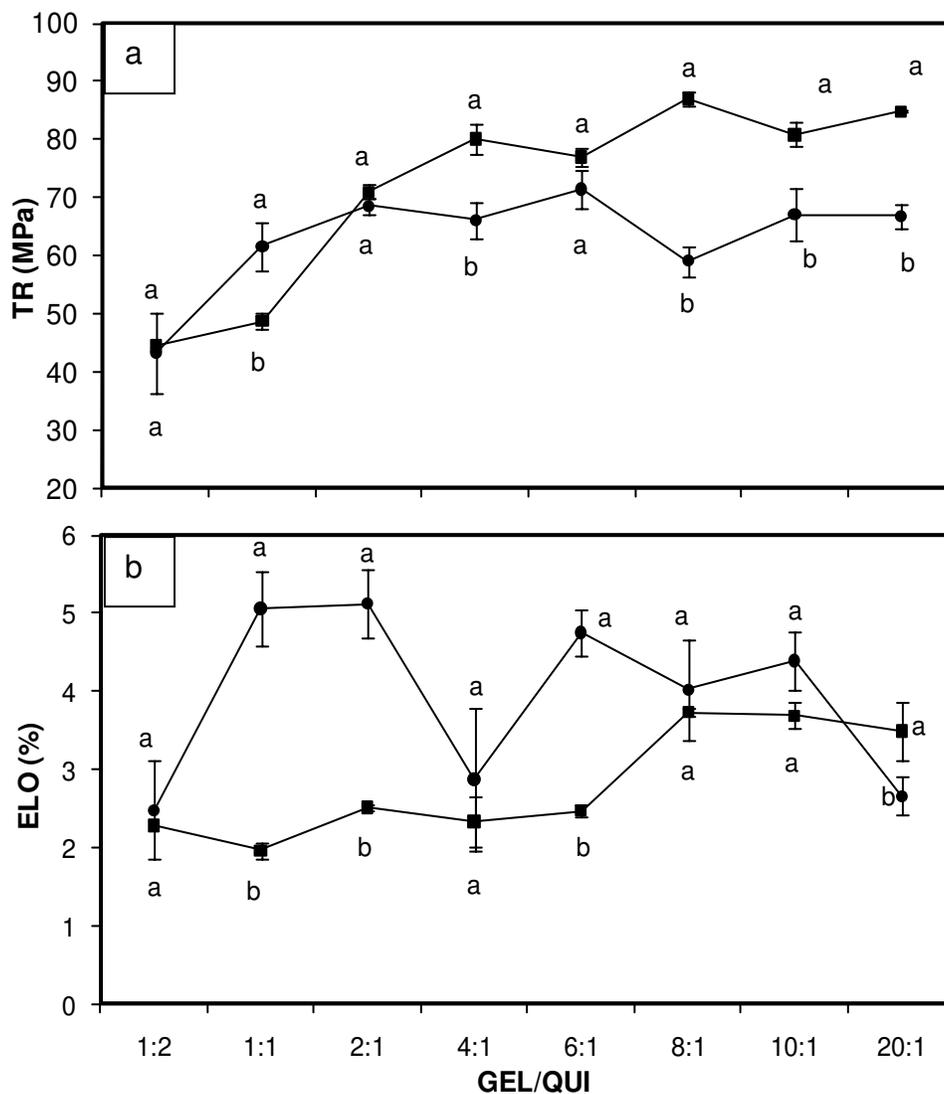
Nas Figuras 10 e 11 pode-se verificar a comparação entre as propriedades funcionais dos filmes coacervados (com ajuste de pH - pH_{zeta}) e dos filmes compostos (sem ajuste de pH - $pH_{inicial}$).

Os filmes compostos apresentam redução pronunciada da TR à medida que se aumenta o teor de QUI na matriz filmogênica atingindo valor mínimo nas

formulações 1:1 e 1:2 de GEL/QUI. Este mesmo comportamento foi evidenciado para os filmes coacervados, como foi descrito no Item 3.3.3.

Nas proporções estequiométricas contendo maior teor de GEL (4:1, 6:1, 8:1, 10:1 e 20:1 de GEL/QUI, os filmes coacervados de GEL/QUI apresentaram maior TR, em relação aos filmes compostos (sem ajuste de pH). Efeito oposto foi observado na formulação 1:1 de GEL/QUI, enquanto que para as demais formulações o ajuste de pH não alterou significativamente os valores de TR em relação aos filmes compostos, como pode ser observado na Figura 10a.

Na Figura 10b pode-se observar que na maioria das proporções estequiométricas estudadas os filmes compostos apresentaram flexibilidade entre 2,5 e 5%, assim como a maioria das formulações elaboradas pelo método de coacervação. O método de coacervação apresentou menor flexibilidade do que os filmes compostos, este fato pode ser atribuído às interações eletrostáticas que foram responsáveis por formar uma matriz mais rígida e compacta em relação aos filmes compostos. Filmes compostos e coacervados apresentaram baixa ELO ao serem comparados com os filmes sintéticos, por exemplo, o polipropileno com ELO de 50 - 75% (BRISTON, 1988). Este comportamento já era esperado para filmes de GEL/QUI, onde os biopolímeros atuam formando uma rede tridimensional com zonas intermoleculares de microcristalinidade, o que torna o filme quebradiço e pouco flexível (AUNDREUCETTI, 2010; ARVANITTOYANNIS, NAKAYAMA & AIBA, 1998).



● Filme GEL/QUI (sem ajuste de pH) ■ Filme coacervado GEL/QUI (pH_{zeta})

Figura 10. Efeito do método de coacervação nas propriedades funcionais nos filmes de GEL/QUI: tensão na ruptura – TR (a) e elongação – ELO (b).

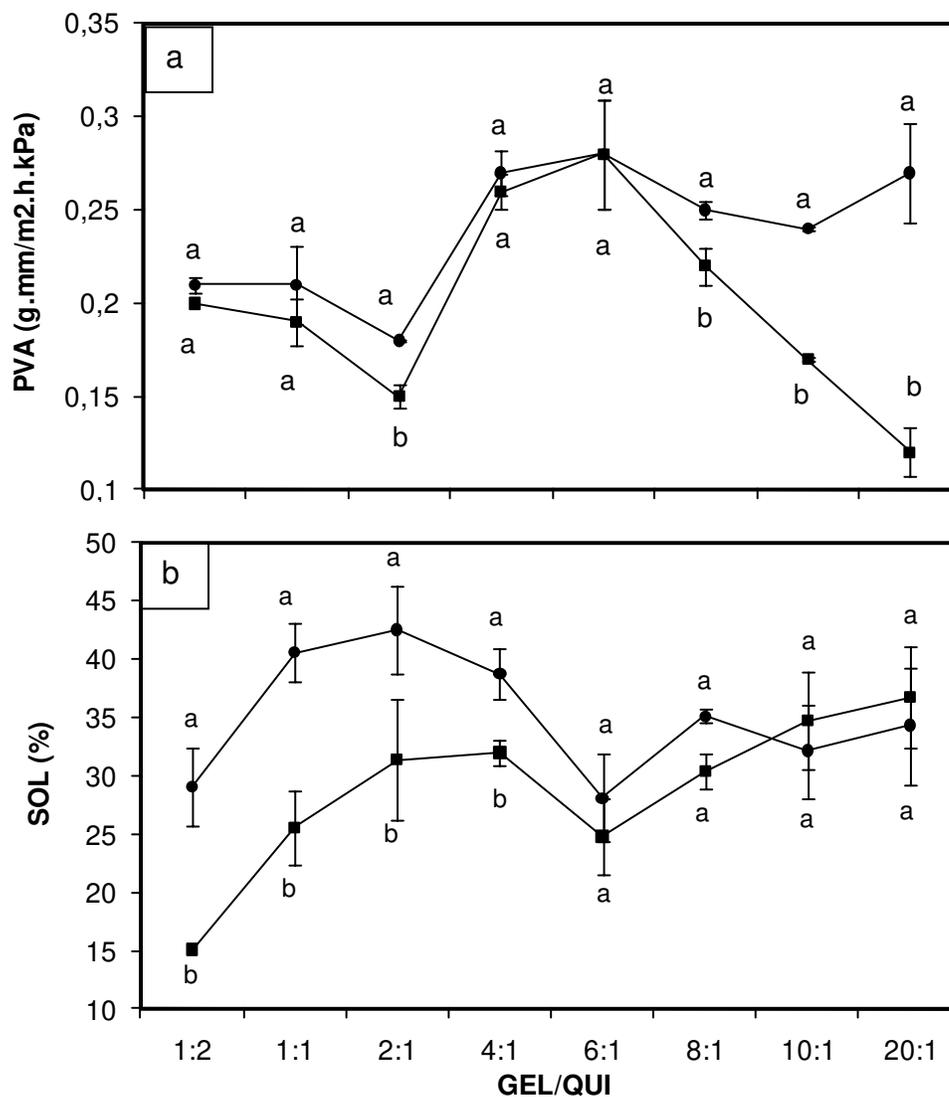
Nos resultados de PVA para os filmes compostos, observou-se redução significativa da PVA à medida que aumentou a quantidade de QUI na mistura (Figura 11a), em relação aos filmes controles. GARCIA et al. (2009) constaram que o aumento da quantidade de QUI na mistura não provocou nenhuma

alteração significativamente da PVA nos filmes compostos de quitossana/metilcelulose (1:3, 1:1 e 3:1).

Filmes elaborados em condição de eletroneutralidade das cargas (pH_{zeta}) apresentaram redução significativa na PVA, nas formulações 8:1, 10:1 e 20:1 de GEL/QUI, em relação aos filmes compostos (Figura 11a). O método de coacervação promove o aumento das interações eletrostáticas na estrutura química do filme, e conseqüentemente, reduz o volume livre dentro da matriz filmogênica, o que poderia explicar os menores valores de PVA dos filmes coacervados.

Os filmes compostos assim como os filmes coacervados apresentaram o mesmo perfil de SOL dos filmes coacervados frente à variação da proporção estequiométrica da GEL e QUI.

À medida que aumenta o teor de QUI na formulação (1:2, 1:1, 2:1 e 4:1 de GEL/QUI) os filmes coacervados mostraram-se mais resistentes a água que os filmes compostos. Exemplificando, o filme coacervado de GEL/QUI (1:2) apresentou SOL de $15,10 \pm 3,16\%$, enquanto para o filme composto a SOL foi de $29,10 \pm 2,48\%$, o método de coacervação conferiu ao filme de GEL/QUI uma redução de 48% na SOL. Uma hipótese que pode explicar os altos valores de SOL dos filmes compostos pode estar relacionada à intensidade de carga elétrica presente na solução filmogênica. Já que os filmes compostos foram elaborados em condição de pH favorável para protonação do grupo amino da quitossana (pH menor que o seu pK_a) e a baixa desprotonação dos grupos carboxílico da gelatina (pH próximo ao pI), o que torna o meio altamente carregado positivamente ($\zeta > 0$). Portanto, a alta carga positiva presente na solução filmogênica proporcionou alta repulsão eletrostática entre as cadeias, dificultando assim a interação entre os biopolímeros. Entretanto, pelo método de coacervação o pH do meio (onde a carga elétrica positiva é igual a carga elétrica negativa) favoreceu a interação eletrostática entre as cadeias poliméricas dos biopolímeros, devido a alta atração eletrostática entre as cargas positivas da quitossana com as cargas negativas da gelatina (Figura 11).



● Filme GEL/QUI (sem ajuste de pH) ■ Filme coacervado GEL/QUI (pH_{zeta})

filmes de GEL/QUI: permeabilidade ao vapor de água - PVA (a) e solubilidade em água – SOL (b).

Na Figura 12 pode-se observar a difração de raio-X e a micrografia da secção transversal (obtidos por microscopia eletrônica de varredura - MEV) dos filmes compostos e coacervados de GEL/QUI (10:1).

Os difratogramas dos dois filmes apresentaram comportamento similar com a presença de dois picos bem característicos em $2\theta = 7^\circ$ e 20° , no filme

coacervado notou-se um pequeno aumento na intensidade do pico em $2\theta = 7^\circ$, o que poderia estar relacionado com aumento da cristalinidade do material devido a maior interação dos pares poliméricos (GEL e QUI).

A micrografia dos filmes composto (sem ajuste de pH) e coacervado (pH_{zeta}) apresentaram-se sem poros, coesas, compactas, homogêneas e com boa integridade morfológica, estas características indicam boa compatibilidade entre os biopolímeros. Aspecto similar foi verificado por RIVERO, GARCÍA & PINOTTI (2009) para filmes compostos e laminados de GEL/QUI.

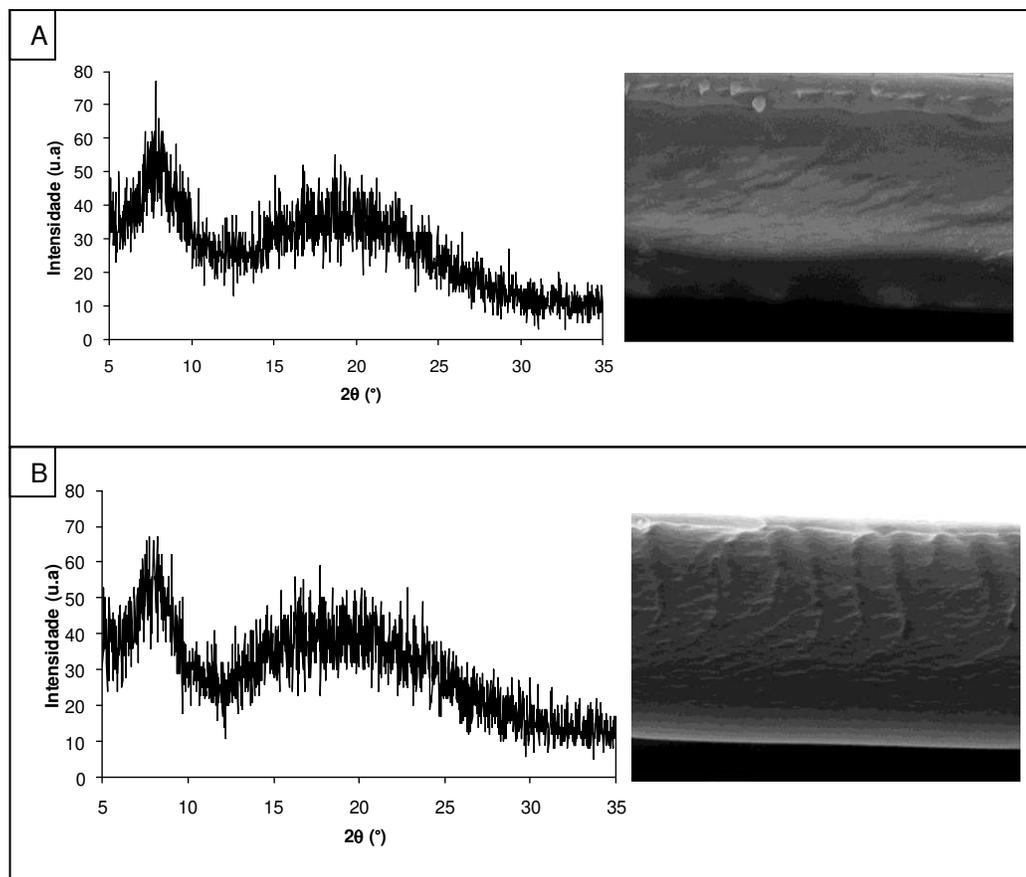


Figura 12. Caracterização microestrutural por difração de raio-X e morfológica por Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) do filme coacervado (A) e do filme composto (B) de GEL/QUI (10:1).

3.4 Concentração do material polimérico

Na Tabela 5, pode-se observar a influencia da concentração do material polimérico (Cpol) nas propriedades funcionais: tensão na ruptura (TR), alongamento (ELO), barreira ao vapor de água (PVA), solubilidade em água (SOL) e umidade (UMI) dos filmes coacervados de GEL/QUI (10:1). Esta proporção estequiométrica foi selecionada por apresentar um dos maiores valores de tensão na ruptura ($80,82 \pm 0,09$ MPa) e um dos menores valores de PVA ($0,11 \pm 0,01\%$).

A concentração do material polimérico (Cpol) foi testada com o intuito de reduzir o tempo de secagem dos filmes coacervados e com isso, otimizar a produção dos mesmos. Os filmes coacervados elaborados com 2, 4, 6, 8 e 10% apresentaram tempo de secagem de 24, 20, 12, 10 e 6h, respectivamente. Todos os filmes foram elaborados com um controle rigoroso da espessura que não diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre as formulações apresentando variações entre $0,040 \pm 0,009$ mm. Estas concentrações foram selecionadas por apresentar viscosidade suficiente para dispersão da solução filmogênica na placa. Acima de 10% de material polimérico à alta viscosidade da solução filmogênica impediu a elaboração dos filmes, devido à dificuldade de dispersão na placa.

Com o aumento da concentração polimérica, os filmes coacervados elaborados com 6, 8 e 10% tornaram-se 10% mais resistentes do que os filme contendo 2% de material polimérico, enquanto, os valores de ELO permaneceram inalterados em todas Cpol testadas.

Nas concentrações de 8 e 10%, os valores de PVA dos filmes coacervados aumentaram significativamente, em relação as demais concentrações. Isto pode ser explicado, pela saturação da rede polimérica que poderia promover desestruturação do filme, o que explicaria os altos valores de PVA.

Os filmes com 4, 6 e 8% de material polimérico mostraram-se mais resistentes a água (menor SOL), do que a concentração menor e maior, 2 e 10% , respectivamente.

Concentrações acima de 4% formaram filmes com menor valor de UMI, o alto teor de material polimérico na matriz reduz o volume livre do filme e consequentemente, a água ligada na rede polimérica.

Dentre todas as concentrações testadas, o filme elaborado com 6% de Cpol apresentou as melhores características funcionais, como: maior TR, menor PVA, SOL, UMI e sem alteração na ELO.

Tabela 5. Efeito da concentração de material polimérico total (Cpol) dos filmes coacervados de GEL/QUI (10:1) em suas propriedades funcionais (TR, ELO, PVA, SOL e UMI).

Cpol*	TR (MPa)**	ELO (%)**	PVA (g.mm/m ² .h.kPa)**	SOL (%)**	UMI (%)**
2	81,44±3,40 ^b	3,87±0,38 ^a	0,17±0,01 ^b	34,7±4,4 ^a	19,0±2,7 ^a
4	83,00±2,26 ^b	4,40±0,29 ^a	0,21±0,02 ^b	22,6±1,9 ^{bc}	9,9±1,2 ^b
6	89,44±0,28 ^a	4,21±0,47 ^a	0,22±0,01 ^b	21,1±1,0 ^c	10,3±2,7 ^b
8	93,44±1,29 ^a	4,84±0,39 ^a	0,32±0,01 ^a	27,1±3,4 ^{bc}	9,4±1,4 ^b
10	93,63±0,87 ^a	4,21±0,34 ^a	0,29±0,03 ^a	29,0±1,0 ^{ab}	9,2±2,2 ^b

* Unidade de Cpol g de polímero 100g⁻¹ solução;

** Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: Letras diferentes minúsculas na vertical representam diferença significativa (p<0,05) entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

3.5 Efeito da adição do plastificante no filme coacervado

O filme biodegradável deve apresentar tensão na ruptura (TR) suficiente para manter intacta a integridade do alimento embalado, principalmente durante seu transporte e sua manipulação. Por outro lado, a alongação dos filmes pode ser ajustada de acordo com necessidade do produto ao qual é aplicado.

Em geral, filmes a base de proteínas e de polissacarídeos são frágeis e suscetíveis a rachaduras, este mesmo comportamento pode ser esperado para os filmes compostos de proteína-polissacarídeo. Portanto, a alta concentração de material polimérico (6g de material polimérico/ 100g de solução) utilizada na elaboração dos filmes coacervados de gelatina-quitosana requer da adição do agente plastificante na tentativa de melhorar sua flexibilidade e manipulação.

3.5.5 Aspecto Visual e Espessura

Os filmes contendo glicerol apresentaram-se homogêneos, contínuos e de fácil remoção da placa de acrílico, sem exudação, áreas frágeis ou poros, estes aspectos indicaram a incorporação visual das moléculas de plastificante na matriz do filme. Todos os filmes caracterizados apresentaram superfície uniforme, com espessura em torno de $0,040 \pm 0,02$ mm, em todas as concentrações testadas.

Este mesmo aspecto foi relatado para os filmes contendo triacetina (em concentração igual ou inferior a 20%). Em concentrações acima de 20% de TRI, os filmes foram descartados por apresentarem exudação deste plastificante na superfície. A baixa incorporação da TRI na matriz filmogênica pode ser justificada pela baixa compatibilidade destes compostos, já que a GEL e a QUI apresentam natureza hidrofílica e o plastificante natureza hidrofóbica.

Foi realizado um estudo da alíquota da solução filmogênica despejada na placa para obter valores de espessura ($0,043 \pm 0,008$ mm) sem diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações estudadas.

3.5.6 Propriedades Mecânicas

Na Tabela 6 pode-se verificar o efeito da concentração e do tipo de plastificante (triacetina – TRI ou glicerol - GLI) nas propriedades mecânicas dos

filmes coacervados de GEL/QUI. Foram estudadas as seguintes concentrações 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25 e 30g de plastificante/100g de polímero.

A tensão na ruptura (TR) dos filmes coacervados apresenta-se inversamente proporcional com o aumento da concentração de plastificante (triacetina ou glicerol), atingindo valor mínimo em 20% de TRI ($51,26 \pm 3,29$ MPa) e em 25 e 30% de GLI ($30,14 \pm 1,41$ MPa e $28,51 \pm 1,69$ MPa, respectivamente).

Estudos realizados com o glicerol relataram comportamento similar nos filmes compostos de gelatina e quitossana, (RIVERO, GARCÍA & PINOTTI, 2009), de amido de ervilha e goma xantana (MATTA et al. 2011) e de gelatina e hidroxipropil amido (ARVANITOYANNIS, NAKAYAMA & AIBA, 1998). Outros trabalhos verificaram a perda da resistência dos filmes com o aumento da concentração de triacetina, como: JIANG et al. (2010) e LIN, LEE & WANG (2004).

As moléculas do plastificante inserem-se entre a cadeia polimérica, reduzindo as interações entre os polímeros formadores de filme, o que poderia conferir maior mobilidade da rede polimérica (ZHANG & HAN, 2006; MALI et al. 2005).

Apesar de o agente plastificante atuar reduzindo a resistência do filme, estes valores mostram-se compatíveis aos obtidos pelos filmes sintéticos, por exemplo, polietileno com baixa densidade (LDPE) apresenta TR de 11,7 MPa (ASTM D 4635-08) e o polietileno de alta densidade (HDPE) de 30 a 40 MPa (PENGILLY & HILL, 1990).

Na maioria das concentrações estudadas, o glicerol produziu filmes mais resistentes que a triacetina, este comportamento pode estar relacionado com massa molar destes plastificantes, já que o glicerol ($C_3H_8O_3$ – massa molar 92,08 g/mol) apresenta menor massa molecular que a triacetina ($C_9H_{14}O_6$ – massa molar 218,21g/mol). Desta forma, as moléculas de glicerol com menor tamanho inserem-se com mais facilidade entre as cadeias poliméricas que a triacetina, conferindo ao filme uma estrutura mais compacta.

Em concentração inferior a 20% de plastificante, o tipo (triacetina ou glicerol) e a concentração do plastificante não afetaram os valores de ELO dos filmes coacervados de GEL/QUI. Para os autores, JIANG et al. (2010) a adição de triacetina proporcionou aumento da flexibilidade dos filmes de gelatina de pele de peixe. Enquanto para LIN, LEE & WANG (2004), o efeito foi antagônico nos filmes de poli- ϵ -caprolactona e polietileno glicol.

Entretanto, em altas concentrações de glicerol (25% e 30%) observou-se um aumento significativo de 90% na ELO dos filmes coacervados, em relação ao filme sem plastificante. Nestas condições, o glicerol atuou como um agente plastificante, reduzindo as interações intermoleculares atrativas entre as cadeias adjacentes da GEL e da QUI, aumentando a mobilidade das cadeias, o qual confere maior flexibilidade ao filme. Valores similares foram obtidos por MCHUGH & KROCHTA (1994) em filmes de proteína do soro do leite, estes autores relataram valores de ELO de 4% e 32%, quando concentração de glicerol aumentou de 15 para 30%.

Vários trabalhos relataram que alta quantidade de glicerol foi necessária para produzir filmes mais flexíveis. Por exemplo, filmes de amido de trigo com 40% de glicerol (LEYVA et al. 2008), filmes de gelatina e hidropil amido com 25% de glicerol (ARVANITTOYANNIS, NAKAYAMA & AIBA, 1998), filme de gelatina suína e 45% de glicerol (BERGO & SOBRAL, 2007) e filmes de quitosana com 20% de glicerol (ZIANI et al. 2008).

O glicerol foi o principal responsável pela ação plastificante nos filmes coacervados, já que o conteúdo de água expresso pela umidade (UMI) não diferiu significativamente nos filmes elaborados contendo 25% (UMI $9,34 \pm 1,01\%$) e 30% (UMI $9,71 \pm 2,54\%$) de glicerol, em relação ao filme sem plastificante (UMI $10,31 \pm 2,69\%$). Portanto, não se pode atribuir a água a ação plastificante nos filmes coacervados contendo glicerol. Os filmes contendo triacetina apresentaram comportamento similar ao glicerol frente ao conteúdo de UMI, com valores em torno de 12%.

Portanto, a água contida no filme não atua de forma pronunciada como agente plastificante devido à similaridade do seu conteúdo nos filmes com e sem

plastificante. Efeito contrário foi observado por ZIANI et al. (2008), onde adição de 20% de glicerol no filme de quitossana proporcionou aumento de 31,4% na UMI, em relação ao filme sem plastificante. Estes autores relataram que o conteúdo de umidade enfatizou o efeito plastificante do glicerol.

O filme coacervado (25% de glicerol) mostrou altos valores de ELO. Comparando-se com alguns filmes sintéticos, por exemplo, o celofane apresenta ELO de 20% e o poliestireno de 2%, mas é extremamente inferior ao filme polietileno de baixa densidade com 500% de ELO, como foi observado por GHASEMLOU, KHODAIYAN & OROMIEHIE (2011).

3.5.7 Opacidade

A influência do tipo e da concentração do plastificante na opacidade dos filmes coacervados de gelatina-quitossana pode ser observada na Tabela 6.

A adição crescente de glicerol não alterou a opacidade (Op) do filme coacervado, em relação ao filme controle (0% de plastificante). Resultado similar foi observado por GENNADIOS et al. (1996) para os filmes a base de albumina do ovo e por RIVERO, GARCIA & PINOTTI (2009) para filmes compostos de gelatina e quitossana. Em contrapartida, PASCHOALICK et al. (2003) observaram que o aumento na concentração de GLI (15-65g/100g de proteína) reduz a Op dos filmes a base de proteína do músculo da tilápia.

Para a triacetina, à adição crescente deste plastificante no filme coacervado promoveu aumento significativo na Op. Por exemplo, ao se adicionar 20% de TRI observa-se um aumento de quase 50% na Op do filme. Em filmes de gelatina de pele de peixe a adição de triacetina reduziu a transmissão da luz, o que é reflexo da baixa transparência do filme de gelatina (JIANG et al. 2010). Este fenômeno pode ser explicado pela natureza hidrofóbica da TRI, que em altos níveis na matriz polimérica dos filmes apresenta o mesmo comportamento que os lipídios.

Vários tipos de embalagens são requisitados pelo mercado consumidor, materiais transparentes apresentam a vantagem de o consumidor visualizar o alimento antes de comprar do para alimentos, já embalagens opacas são necessárias para alimentos que se deterioram na presença da luz (KOWALCZYK & BARANIAK, 2011).

Tabela 6. Efeito da concentração de plastificante (Cp) na propriedade mecânica (tensão na ruptura – TR e alongação – ELO) e na opacidade (Op) do filme coacervado de GEL/QUI elaborados com triacetina (TRI) e glicerol (GLI), como agente plastificante.

Cp*	TR (MPa)**		ELO (%)**		Op (%)	
	TRI	GLI	TRI	GLI	TRI	GLI
0	93,63±0,87 ^{abA}	93,63±0,87 ^{ca}	4,21±0,47 ^{aA}	4,21±0,47 ^{ca}	12,6±0,3 ^{fA}	12,6±0,3 ^{aA}
2,5	100,35±1,31 ^{ab}	104,89±1,19 ^{abA}	3,29±0,17 ^{ab}	4,45±0,19 ^{ca}	12,9±0,3 ^{efA}	12,4±0,4 ^{aA}
5	81,90±2,72 ^{cb}	107,85±1,20 ^{aA}	3,95±0,55 ^{aA}	4,60±0,08 ^{ca}	13,8±0,6 ^{defA}	13,1±0,8 ^{aA}
7,5	90,23±2,60 ^{bB}	100,78±1,05 ^{bA}	4,47±0,19 ^{ab}	5,29±0,19 ^{ca}	16,2±1,5 ^{ca}	12,8±0,1 ^{aA}
10	66,79±1,28 ^{dB}	80,82±4,04 ^{dA}	4,33±0,71 ^{aA}	5,16±0,47 ^{ca}	14,7±0,3 ^{cdeA}	12,8±0,0 ^{ab}
15	58,86±3,95 ^{eb}	73,03±4,30 ^{eA}	4,14±0,16 ^{aA}	5,54±0,5 ^{ca}	15,1±0,4 ^{cdA}	12,9±0,1 ^{ab}
20	51,26±3,29 ^{fA}	50,83±2,61 ^{fA}	4,10±0,44 ^{aA}	4,35±0,35 ^{ca}	24,4±0,1 ^{aA}	12,6±0,2 ^{ab}
25	#	30,14±1,41 ^g	#	25,26±3,27 ^b	#	12,7±0,1 ^a
30	#	28,51±1,69 ^g	#	36,86±0,69 ^a	#	12,5±0,3 ^a

* Cp (unidade) g de plastificante/100g de material polimérico;

**Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa (p<0,05) entre os resultados na horizontal, enquanto as letras minúsculas diferentes representam diferença significativa (p<0,05) entre os resultados na vertical, todas as médias foram obtidas através do teste de TUKEY.

Filmes descartados por apresentar aspecto oleoso, devido à exudação da triacetina na superfície do filme.

3.5.8 Permeabilidade ao vapor de água

A influência do tipo e da concentração de plastificante na permeabilidade ao vapor de água (PVA) pode ser verificada na Tabela 7. Nos valores de PVA foi observada diferença significativa entre os filmes elaborados com diferentes concentrações de plastificante ($p < 0,05$). Para os filmes elaborados com triacetina observou-se elevação da PVA com o aumento da concentração deste plastificante. Esta tendência foi relatada por JIANG et al. (2010) em filmes de gelatina de pele de peixe contendo altos níveis de triacetina (100 e 150% de plastificante). Entretanto, para os filmes contendo valores crescentes de glicerol a PVA permaneceu inalterada ou significativamente menor, em relação ao filme sem plastificante. SAREMNEZHAD et al. (2011) observaram que a PVA dos filmes a base de isolado protéico de feijão não foram afetados em uma ampla faixa de concentração de glicerol testada. A independência da PVA em relação ao conteúdo de plastificante também foi relatada por CHOI & HAN (2001), em filme de isolado protéico de ervilha.

Os filmes contendo glicerol apresentaram-se menos permeáveis do que os filmes elaborados com triacetina. Como já foi discutido na TR, os filmes contendo glicerol mostram-se mais resistentes do que os filmes com triacetina, isto se deve a diferença de massa molar entre estes plastificantes. A triacetina ($C_9H_{14}O_6$ – massa molar 218,21g/mol) por apresentar maior massa molar do que o glicerol ($C_3H_8O_3$ – massa molar 92,08 g/mol) insere-se com mais dificuldade na rede polimérica, o que poderia promover desorganização na estrutura molecular, e conseqüentemente elevação do volume livre na rede, isto poderia explicar a menor resistência e maior permeabilidade ao vapor de água nos filmes contendo triacetina.

3.5.9 Solubilidade em água

A solubilidade em água (SOL) do filme coacervado de GEL/QUI com diferentes níveis de plastificante (glicerol ou triacetina) pode ser observada na Tabela 7. A adição destes plastificantes promoveram elevação da SOL se compararmos com os filmes coacervado sem plastificantes. Efeito similar foi observado por JIANG et al. (2010) em filmes de gelatina de pele de peixe que relataram que a adição de triacetina elevou a SOL de $69,5 \pm 4,8\%$ (0% de plastificante) para $83,3 \pm 2,7\%$ (150% de TRI). Outros autores como CUQ, GONTARD, CUQ & GUILBERT (1997) ao elaborar filmes a base de proteína miofibrilar observaram que a adição do plastificante (glicerol, sorbitol e sacarose) aumentou a SOL em relação ao filme sem plastificante. De acordo com estes autores, a diminuição da compactação da rede polimérica devido à presença do plastificante pode ser a principal causa da solubilização do filme.

Em geral, o aumento da concentração de plastificante (glicerol ou triacetina) não alterou de forma pronunciada os valores de SOL dos filmes coacervados. KOŁODZIEJSKA & PIOTROWSKA (2007) observaram que para a adição de glicerol, em concentrações superiores a 30%, não foi observado aumento na solubilidade dos filmes. Os valores de SOL dos filmes de gelatina de pele de peixe não diferiram significativamente ao se adicionar 50, 100 e 150% de triacetina (JIANG et al. 2010).

Assim como foi constatado para a concentração, o tipo de plastificante também não afetou os valores de SOL dos filmes coacervados, onde filmes elaborados com glicerol apresentaram valores de SOL similares aos valores da triacetina.

A adição do agente plastificante deveria aumentar a capacidade de interagir com a água, facilitando a solubilização do filme (MALI et al. 2005). Segundo KOWALCZYK & BARANIAK (2011) a solubilidade do filme é proporcional ao aumento do conteúdo de plastificante. Entretanto, os valores de SOL dos filmes coacervados mostraram-se independentes do aumento da concentração e do tipo

de plastificante. Este fato pode estar relacionado com a presença das interações eletrostáticas, que limitaria a ação e a inserção do plastificante dentro da matriz filmogênica. Portanto, o método de coacervação poderia ser o principal responsável pela parcial insolubilidade dos filmes de GEL/QUI.

Ao se observar na literatura os valores de SOL dos filmes poliméricos pode-se constatar que o filme coacervado GEL/QUI apresenta bons resultados de insolubilidade. Filme de gelatina de pele de peixe contendo 50% de triacetina apresenta 75,5% de SOL (JIANG et al. 2010), enquanto o filme de gelatina e quitossana reticulado com transglutaminase (30% de glicerol) a SOL foi de 33% (KOLODZIEJSKA & PIOTROWSKA, 2007).

Tabela 7. Efeito da concentração de plastificante (Cp) nas propriedades funcionais: permeabilidade ao vapor de água (PVA) e solubilidade em água (SOL) do filme coacervado de GEL/QUI elaborados com triacetina (TRI) e glicerol (GLI), como agente plastificante.

Cp *	PVA (g.mm/m ² .h.kPa)**		SOL (%)**	
	TRI	GLI	TRI	GLI
0	0,22±0,01 ^d	0,22±0,01 ^{bc}	21,14±0,96 ^d	21,14±0,96 ^c
2,5	0,34±0,06 ^{cA}	0,29±0,04 ^{aA}	27,38±1,63 ^{cA}	34,92±2,21 ^{abA}
5	0,27±0,01 ^{cdA}	0,21±0,004 ^{bcB}	33,52±4,40 ^{bA}	30,73±3,53 ^{bA}
7,5	0,43±0,01 ^{bA}	0,18±0,01 ^{bcB}	38,93±5,67 ^{aA}	31,63±1,50 ^{bB}
10	0,45±0,01 ^{abA}	0,23±0,01 ^{abB}	35,82±2,87 ^{bcA}	35,52±2,86 ^{abA}
15	0,47±0,01 ^{abA}	0,21±0,01 ^{bcB}	35,06±2,08 ^{bcA}	36,05±2,14 ^{abA}
20	0,49±0,03 ^{abA}	0,16±0,01 ^{cB}	37,56±3,30 ^{a,bA}	39,67±2,50 ^{aA}
25	#	0,18±0,01 ^{bc}	#	38,14±1,04 ^{ab}
30	#	0,29±0,04 ^a	#	37,84±5,16 ^{ab}

*Cp (unidade) g de plastificante/100g de polímero;

**Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados na horizontal, enquanto as letras minúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados na vertical, todas as médias foram obtidas através do teste de TUKEY.

Filmes descartados por apresentar aspecto oleoso, devido à exudação do plastificante na superfície do filme.

3.5.10 Difração de raio-X

A Figura 13 mostra o efeito da adição do agente plastificante (glicerol ou triacetina) na difração de raio-X dos filmes coacervados. Todos os filmes apresentaram dois picos característicos em $2\theta = 7^\circ$ e 20° , como já discutido no item 3.1.3 deste capítulo. A adição do plastificante aumentou a intensidade dos picos, sendo que o filme contendo glicerol a intensidade foi maior ao se comparar com o filme com triacetina. Perfil similar dos difratogramas foi relatado por

AGUIAR-MÉNDEZ et al. (2010), de acordo com os autores o aumento na intensidade dos picos foi resultado da formação das pontes de hidrogênio entre gelatina e o glicerol, sendo um forte indicativo da presença de regiões pseudo-cristalinas na matriz do filme.

Outros autores, como BERGO & SOBRAL (2007) observaram algumas tendências para formar regiões semicristalinas em filmes de amido com 30 e 45% de glicerol. Estes autores ainda relataram que os altos níveis de glicerol no filme aumentam a mobilidade macromolecular, permitindo a formação de junções microcristalinas.

Efeito oposto foi observado por MATTA et al. (2011) que observaram que as formulações com maior teor de plastificante (20% de glicerol) apresentavam menor cristalinidade. Enquanto MALI et al. (2002) não notaram influência da adição do glicerol na difração de raio-X dos filmes de amido de inhame.

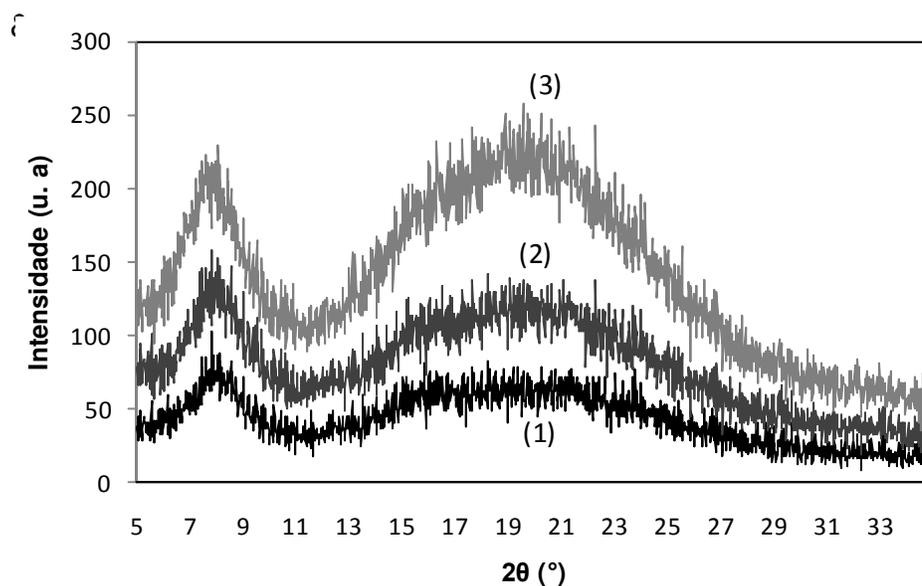


Figura 13. Caracterização microestrutural por difração de raio-X dos filmes coacervados de GEL/QUI (10:1), sendo que em: (1) 0% de plastificante, (2) 20% de triacetina e (3) 25% de glicerol.

3.5.11 FTIR

Os espectros de FTIR dos filmes coacervados de GEL/QUI contendo plastificante (glicerol ou triacetina) pode ser visualizado na Figura 14. A interação química entre dois ou mais compostos de um filme esta relacionada às mudanças nas características do pico no espectro de FTIR (ZHONG & XIA, 2008).

No espectro dos filmes coacervados a adição do plastificante (triacetina ou glicerol) provocou alterações significativas nas bandas em 1079 cm^{-1} , 1033 cm^{-1} e 922 cm^{-1} . O glicerol atuou reduzindo a intensidade do pico em 1079 cm^{-1} e elevando a intensidade dos picos em 1033 cm^{-1} e 922 cm^{-1} , em relação o filme sem plastificante. Comportamento similar foi verificado para a triacetina, exceto para banda em 922 cm^{-1} onde não foi notada alterações. De acordo com BERGO & SOBRAL (2007), pequenas alterações espectrais (formato e intensidade da banda) na região entre $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ (vibração do C-O, C-C e C-O-H) poderiam estar relacionadas com as novas interações formadas entre o plastificante e o biopolímero do filme, principalmente na banda situada em 1033 cm^{-1} . Estas alterações poderiam ser reflexos da formação de pontes de hidrogênio entre o grupo C-O do biopolímero e o plastificante, segundo MA, YU & WAN (2006).

Ao observar os resultados de DRX, pode-se relacionar o aumento da cristalinidade do filme com o aumento da interação entre o plastificante e os biopolímeros (gelatina-quitossana), como foi detectado pelo FTIR (aumento na intensidade dos picos entre $1033\text{ - }900\text{ cm}^{-1}$). VANSOEST et al. (1995) observou a relação entre a ligação vibracional do C-O-H com as mudanças no estado amorfo e semicristalino do amido de batata.

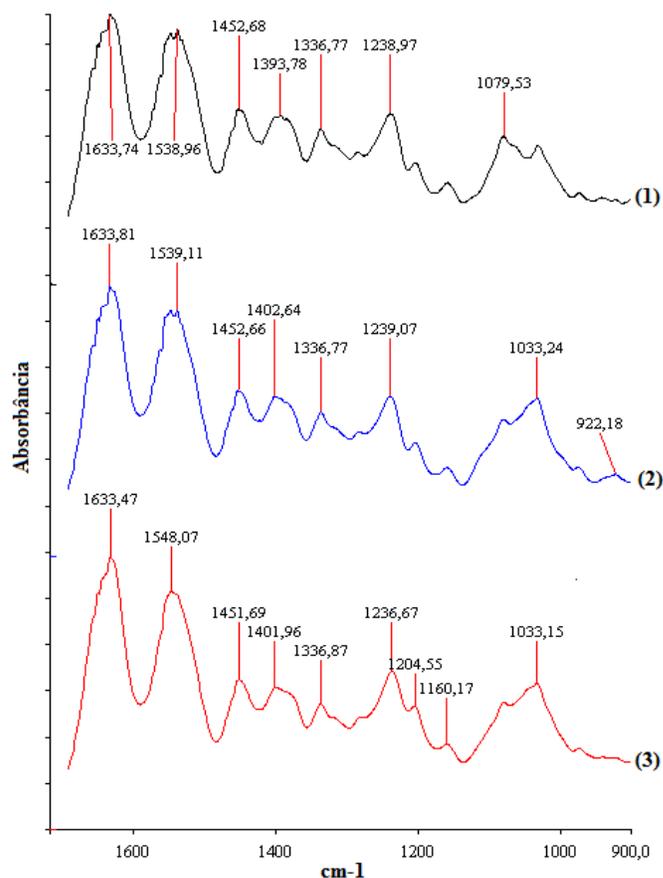


Figura 14. Espectrometria de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) do filme coacervado de GEL/QUI, sendo que em: (1) 0% de plastificante, (2) 25% de glicerol e (3) 20% triacetina.

3.5.12 DSC

Informações sobre as propriedades térmicas dos filmes coacervados de GEL/QUI contendo de plastificante (triacetina ou glicerol) podem ser observadas na Tabela 8. Pela análise calorimétrica pode-se constatar a presença de dois picos endotérmicos no filme coacervado (0% de plastificante), e conseqüentemente a presença de duas temperaturas de transição vítrea (T_g). Perfil similar foi observado para os filmes coacervados adicionados de agente

plastificante (triacetina ou glicerol), isto poderia comprovar a incorporação do agente plastificante na rede polimérica do filme. Entretanto, a variação da Tg e da entalpia de fusão (ΔH) em função da concentração e do tipo de plastificante traz informações relevantes quanto ao grau de incorporação do plastificante na matriz polimérica.

Segundo TONGDEESOONTORN et al. (2011) um indício da ocorrência de interação entre os componentes de um filme é dado pelo deslocamento da Tg. Nos filmes coacervados foi notado o aumento no valor da Tg de 98,37°C (filme sem plastificante) para 110,22°C com a adição de 25% de glicerol, o que poderia ser indicativo da interação do par polimérico (GEL/QUI) com o plastificante. Enquanto para a triacetina, o aumento da Tg só foi registrado em baixas concentrações do plastificante (2,5%). Este comportamento já era esperado devido à baixa incorporação da triacetina em altas concentrações no filme.

Efeito oposto foi observado por YAKIMETS et al. (2005), onde a adição do plastificante provoca abaixamento da Tg (temperatura de transição vítrea) do filme. Mesmo comportamento foi observado em filmes de gelatina (YANG & PAULSON, 2000), filmes de amido de inhame (MALI et al. 2005) e filmes de hidroximetilcelulose (HARDY, COOK & MELIA, 2006). Estes autores atribuíram este fato ao efeito plastificante das moléculas de glicerol, que em geral atuam aumentando o volume livre da rede polimérica e conferindo maior mobilidade da cadeia polimérica, com isso diminuindo a Tg do filme.

Em altas concentrações, o filme com glicerol (110,22°C) apresentou maior Tg do que o filme com triacetina (76,71°C), o que evidenciou maior incorporação deste material na rede polimérica do filme. Este comportamento pode ser confirmado ao se avaliar as propriedades mecânicas do filme, onde o glicerol atuou melhorando significativamente a flexibilidade do filme, enquanto para a triacetina não foi observado este comportamento.

No primeiro pico endotérmico foram observadas alterações significativas na entalpia de fusão (ΔH) ao se adicionar o plastificante. A incorporação de 2,5% e de 25% de glicerol reduziu a entalpia de fusão em 6,5% e em 66,4%,

respectivamente. Para a triacetina, essa redução foi de 32,5% (2,5% de triacetina) e de 42,9% (20% de triacetina). No segundo pico, apenas no filme contendo 20% de triacetina esta redução foi pronunciada em torno de 51,7%, em relação ao filme sem plastificante. A interação entre a gelatina-quitossana poderia ser interrompida pela incorporação das moléculas de plastificante promovendo um novo rearranjo da cadeia polimérica, aumentando a mobilidade da cadeia polimérica e a energia cinética durante o aquecimento, e com isso diminuir o valor da entalpia (ΔH) do filme (TONGDEESOONTORN et al. 2011).

Tabela 8. Efeito da concentração de plastificante (C_p) e do tipo de plastificante (glicerol ou triacetina) sobre a temperatura de transição vítrea (T_g) e a entalpia de fusão (ΔH) do filme coacervado de GEL/QUI.

Filme	T_{g1} (°C)	ΔH_1 (J/g)	T_{g2} (°C)	ΔH_2 (J/g)
GEL/QUI	98,37	333,10	217,24	9,31
GEL/QUI (2,5%GLI)	74,27	311,40	206,08	12,53
GEL/QUI (25%GLI)	110,22	111,90	171,49	10,23
GEL/QUI (2,5%TRI)	114,49	224,90	212,59	10,84
GEL/QUI (20%TRI)	76,71	190,10	198,72	19,03

3.6 Conclusões

A análise de potencial zeta foi eficaz para definir o pH ótimo para elaboração dos filmes coacervados de gelatina e quitossana. Para as formulações contendo 1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 6:1, 8:1, 10:1 e 20:1 de GEL/QUI, o pH de coacervação ou pH_{zeta} foi fixado entre 6,2 e 7,2.

Formulações contendo maior teor de gelatina (proporção 10:1 e 20:1 de GEL/QUI) produziram filmes coacervados com maior resistência à ruptura e flexibilidade, além de apresentar melhor barreira ao vapor de água. Pela análise

de DRX constatou-se que o maior teor de gelatina também proporcionou ao filme uma estrutura com maior cristalinidade, o que pode ser atribuído as interações eletrostáticas atrativas entre as cadeias da gelatina e a quitossana, comprovada pelo FTIR.

O método de coacervação aumentou a tensão na ruptura e a barreira ao vapor de água e reduziu a flexibilidade na maioria das formulações testadas, em relação aos filmes compostos (sem ajuste de pH). As formulações 1:2, 1:1, 2:1 e 4:1 de GEL/QUI apresentaram menor solubilidade em água do que os filmes compostos.

O aumento na concentração do material polimérico de 2% para 6% foi eficiente para reduzir o tempo de secagem do filme em 12h (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $31\pm 5\%$), além de elevar a resistência mecânica, a barreira ao vapor de água e a estabilidade em água dos filmes coacervados.

A formulação contendo 6% de GEL/QUI na proporção 10:1 foi por apresentar as melhores propriedades funcionais (alta tensão na ruptura e baixa permeabilidade ao vapor de água). Por este fato, esta formulação foi selecionada para realizar os testes com a adição do agente plastificante (triacetina e glicerol).

A triacetina apresentou menor incorporação na matriz filmogênica do que glicerol, apresentando um limite de saturação de 20g de plastificante/100g de material polimérico, com exudação da triacetina para quantidades acima desse valor. As análises de DRX, FTIR e DSC comprovaram a boa incorporação na matriz filmogênica de triacetina e do glicerol, na concentração de 20g de plastificante/100g de material polimérico.

O glicerol executou seu papel, como agente plastificante, com maior eficiência do que a triacetina no filme coacervado de GEL/QUI, em concentrações acima de 20g de glicerol/100g de material polimérico. Em todas as concentrações estudadas o glicerol não alterou os valores de opacidade e de permeabilidade ao vapor de água dos filmes coacervados, sendo que em algumas formulações agiu reduzindo a PVA. Tanto a adição do glicerol quanto a da triacetina conferiram menor resistência mecânica ao filme e maior solubilidade em água. Entretanto, a

triacetina não conferiu flexibilidade, aumentou a permeabilidade ao vapor de água e a opacidade dos filmes coacervados.

3.7 Referencias Bibliográficas

AGUIAR-MÉNDEZ, M. A.; MARTIN-MARTÍNEZ, E. S.; ORTEGA-ARROYO, L.; CRUZ-OREA, A. Application of differential scanning calorimetry to evaluate thermal properties and study of microstructure of biodegradable films. **International Journal Thermophysics**, v. 31, p. 595-600, 2010.

AKEN, G. A. V. Polysaccharides in Food Emulsions. In: STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O. & WILLIAMS, P. A. (Eds), **Food Polysaccharides and their Applications**, Taylor & Francis Group, LLC, p.532-536, 2006.

ANDREUCETTI, C.; CARVALHO, R. A.; GALICIA-GARCIA, T.; MARTINEZ-BUSTOS, F.; GROSSO, C. R. F. Effect of surfactants on the functional properties of gelatin-based edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 103, n. 2, p. 129-136, 2011.

ANDREUCETTI, C. Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis a base de gelatina, plastificantes hidrofóbicos e surfactantes naturais. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2010. 241p.

ARVANITOYANNIS, I. S.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, n. 4, p. 371-382, 1998.

ASTM D 4635-08. Standard specification for polyethylene films made from low density polyethylene for general use and packaging applications. Philadelphia: **American Society for Testing and Materials**, 2008.

ASTM D 882-95. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting. Philadelphia: **American Society for Testing and Materials**, 1995.

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

ASTM D 523. Standard test method for specular gloss. **American Society for Testing and Materials**, 1999.

BASAVARAJU, K. C.; DAMAPPA, T.; RAI, S. K. Preparation of chitosan and its miscibility studies with gelatin using viscosity, ultrasonic and refractive index. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 357-362, 2006.

BERGO, P.; SOBRAL, P. J. A. Effect of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 8, p. 1285-1289, 2007.

BRISTON, J. H. **Plastic Films**. 3^a edition, Wiley, New York, USA, 1988.

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. 953-956, 1996.

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

CHIO, V.; PULIERI, E.; VOZZI, G.; CIARDELLI, G.; AHLUWALIA, A.; GIUSTI, P. Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. *Journal Material Science: **Material Medical***, v. 19, p.889-898, 2008.

CHOI, W. S.; HAN, J. H. Physical and mechanical properties of pea-protein-based edible films. **Journal Food Science**, v. 66, n. 2, p. 319-322, 2001.

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

DE JONG, B. H. G., KRUYT, H. R. Coacervation (partial miscibility in colloid systems. **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen**, v.32, p.849-856, 1929.

DUCEL, V.; RICHARD, J.; SAULNIER, P.; POPINEAU, Y.; BOURY, F. Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 232, p. 239-247, 2004.

EPURE, V.; GRIFFON, M.; POLLET, E.; AVEROUS, L. Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 947-952, 2011.

FERREIRA, C. O.; NUNES, C. A.; DELGADILLO, I.; LOPES-DA-SILVA, J. A. Characterization of chitosan-whey protein films at acid pH. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 807-813, 2009.

GARCIA, M. A.; PINOTTI, A.; MARTINO, M.; ZARITZKY, N. Electrically treated composite films based on chitosan and methylcellulose blends. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 722-728, 2009.

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

GHASEMLOU, M.; HHODAIVAN, F.; OROMIEHIE, A. Physical, mechanical, barrier, and thermal properties of polyol-plasticized biodegradable edible film made from keratin. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 477-483, 2011.

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

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. In: Food packaging and preservation. **MATHOUDI, M. ed. Blackie Academic & Professional**, Glasgow, p. 159-181, 1994.

GUILBERT, S.; CUQ, B.; GONTARD, N. Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials. **Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk**, v. 14, n. 6-7, p. 741-751, 1997.

GUPTA, A. N.; BOHIDAR, H. B.; ASWAL, V. K. Surface patch binding induced intermolecular complexation and phase separation in aqueous solutions of similarly charged gelatin-chitosan molecules. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 34, p. 10137-10145, 2007.

GUSEY, D.; McCLEMENTS, D. J. Characterization of beta-lactoglobulin-chitosan interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 1, p. 124-131, 2006.

GUSEY, D.; McCLEMENTS, D. J. HAIDER, S.; PARK, S-Y.; LEE, S-H. Preparation, swelling and electro-mechano-chemical behaviors of a gelatin-chitosan blend membrane. **Soft Matter**, v. 4, p. 485-492, 2008.

HAIDER, S.; PARK, S-Y.; LEE, S-H. Preparation, swelling and electro-mechano-chemical behaviors of a gelatin-chitosan blend membrane. **Soft Matter**, v. 4, n. 3, p. 485-492, 2008.

HARDY, I. J.; COOK, W. G.; MELIA, C. D. Compression and compaction properties of plasticized high molecular weight hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as a hydrophilic matrix carrier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 311, n. 1-2, p. 26-32, 2006.

HARRINGTON, J. C.; MORRIS, E. R. Conformational ordering and gelation of gelatin in mixtures with soluble polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 327-336, 2009.

HONG, Y. H.; McCLEMENTS, D. J. Formation of hydrogel particles by thermal treatment of beta-lactoglobulin-chitosan complexes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5653-5660, 2007.

JIANG, M.; LIU, S.; XIN D.; YIFEN, W. Physical properties and internal microstructures of films made from catfish skin gelatin and triacetin mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p.105-110, 2010.

KEENAN, T. R. Gelatin. In: WISEMAM, D. M.; KOST, J.; DOMB, A.J. (Eds), **Handbook of Biodegradable Polymers**, CRC Press, 1998.

KIM, S.; NIMNI, M. E.; YANG, Z.; HAN, B. Chitosan/gelatin-based films crosslinked by proanthocyanidin. **Journal of Biomedical Materials Research Part-B Applied Biomaterials**, v. 75B, n. 2, p. 442-450, 2005.

KOŁODZIEEISKA, I.; PIOTROWSKA, B.; BULGE, M.; TYLINGO, R. Effect of transglutaminase and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide on the solubility of fish gelatin-chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, n. 4, p. 404-409, 2006.

KOŁODZIEEISKA, I.; PIOTROWSKA, B. The water vapor permeability, mechanical properties and solubility of fish gelatin-chitosan films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and plasticized with glycerol. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 295-300, 2007.

KOWALCZYK, D.; BARANIAK, B. Effects of plasticizers, pH and heating of film-forming solution on the properties of pea protein isolate films. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 2, p. 295-305, 2011.

KRUIF, C. G.; TUINIER, R. Polysaccharide protein interaction. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 555-563, 2001.

LEYVA, M. B.; CHÁVEZ, P. T.; WONG, B. R.; JATOMEA, M. P. & BOJÓRQUEZ, F. B. Physical and mechanical properties of Durum Wheat (*Triticum durum*) starch films prepared with A and B type granules. **Starch/Stärke**, 60, n. 10, p.559-567, 2008.

LIN, W. J.; LEE, H. K.; WANG, D. M. The influence of plasticizers on the release of theophylline from microporous-controlled tablets. **Journal of Controlled Release**, v. 99, n. 3, p. 451-421, 2004.

MA, X. F.; YU, J. G.; WAN, J. J. Urea and ethanolamine as a mixed plasticizer for thermoplastic starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 2, p. 267-273, 2006.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Mechanical and thermal properties of yam starch films. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 1, p. 157-164, 2005.

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, n. 4, p. 379-386, 2002.

MAO, J. S.; LIU, H. F.; YIN, Y. J.; YAO, K. D. The properties of chitosan-gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. **Biomaterials**, v. 24, n. 9, p. 1621-1629, 2003.

MATTA, M. D.; SARMENTO, S. B. S.; OLIVEIRA, L. M.; ZOCCHI, S. S. Mechanical properties of pea starch films associated with xanthan gum and glycerol. **Starch-Starke**, v. 63, n. 5, p. 274-282, 2011.

MCHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Water-vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 71, n. 3, p. 307-312, 1994.

MENG, X.; TIAN, F.; YANG, J.; HE, C. N.; XING, N.; LI, F. Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 21, n. 5, p. 1851-1759, 2010.

MOHANTY, B.; GUPTA, A.; BOHIDAR, H. B.; BANDYOPADHYAY, S. Effect of gelatin molecular charge heterogeneity on formation of intermolecular complexes and coacervation transition. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 45, n. 13, p. 1511-1520, 2007.

MONTANO-LEYVA, B.; TORRES-CHAVEZ, P.; RAMIREZ-WONG, B.; PLASCENCIA-JATOMEA, M.; BROWN-BOJORQUEZ. Physical and mechanical properties of durum wheat (*Triticum durum*) starch films prepared with A- and B- type granules. **Starch-Starke**, v. 60, n. 10, p. 559-567, 2008.

MOUNSEY, J.; O'KENNEDY, B. T.; FENELON, M. A.; BRODKORB, A. The effect of heating on β -lactoglobulin-chitosan mixtures as influenced by pH and ionic strength. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n.1, p. 65-73, 2008.

MUZZARELLI, R. A. A.; PETER, M. G. **Chitin. Handbook**. Birkhauser Verlag, Basel, 1997.

PASCHOALICK, T. M.; GARCIA, F. T.; SOBRAL, P. J. A.; HABITANTE, A. M. Q. B. Characterization of some functional properties of edible films based on muscle protein of Nile Tilapia. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 4, p. 419-427, 2003.

PENGILLY, B. W.; HILL, J. W. **Modern plastic encyclopedia**, McGraw-Hill, New York, 1990.

PEREDA, M.; ARANGUREN, M. I.; MARCOVICH, N. E. Characterization of chitosan/caseinate films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 107, n. 2, p. 1080-1090, 2008.

POPPE, J. Gelatin, In: **Thickening and gelling agents for food**, New York, Ed. Alan Imenson, Blackie Academic & Professional, Cap. 7, p.144-168, 1997.

PRODPRAN, T.; BENJAKU, S.; ARTHAN, A. Properties and microstructure of protein-based film from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle as affected by palm oil and chitosan incorporation. International **Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 5, p. 605-614, 2007.

RASHIDOVA, S. S.; MILUSHEVA, R. Y.; SEMENOVA, L. N.; MUKHAMEDJANOVA, M. Y.; VOROPAEVA, N. L.; VASILYEVA, S.; FAIZIEVA, R.; RUBAN, I. N. Characteristics of interactions in the pectin-chitosan system. **Chromatographia**, v. 59, n. 11-12, p. 779-782, 2004.

RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 531-539, 2009.

SAREMNEZHAD, S.; AZIZI, M. H.; BARZEGAR, M.; ABBASI, S.; AHMADI, E. Properties of a new edible film made off aba bean protein isolate. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 13, n. 2, p. 181-192, 2011.

SILVA, C. L.; PEREIRA, J. C.; RAMALHO, A.; PAIS, A. A. C. C.; SOUSA, J. J. S. Films based on chitosan polyelectrolyte complexes for skin drug delivery: **Development and Characterization**, v. 320, n. 1-2, p. 268-279, 2008.

SIONKOWSKA, A.; WISNIEWSKI, M.; SKOPINSKA, J.; KENNEDY, C. J.; WESS, T. J. The photochemical stability of collagen-chitosan blends. **Journal of Photochemistry and photobiology A-Chemistry**, v.162, n. 2-3, p. 545-554, 2004.

SURH, J.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by fish gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 5, p. 596-606, 2006.

TERBOJEVICH, M.; MUZZARELLI, R. A. A. Chitosan. WILLIAMS, P. A. & PHILIPS, G. O. (Eds), **Handbook of Hydrocolloids**, cap. 21, CRC Press, 2ªEd. 2000.

TONGDEESOONTORN, W.; MAUER, L. J.; WONGRUONG, S.; SRIBURI, P.; RACHATANAPUN, P. Effect of carboxymethyl cellulose concentration on physical properties of biodegradable cassava starch-based films. **Chemistry Central Journal**, v. 5, n. 6, p.1-8, 2011.

TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, P. K. Preparation and physicochemical evaluation of chitosan/poly(vinyl alcohol)/pectin ternary film for food packaging applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n.3, p. 711-716, 2010.

VANSOEST, J. J. G.; TOURNOIS, H.; DEWIT, D.; VLIEGENTHART, J. F. G. Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 279, p. 201-214, 1995.

VICENTINI, N. M.; DUPUY, N.; LEITZELMAN, M.; CEREDA, M. P.; SOBRAL, P. J. A. Prediction of cassava starch edible film properties by chemometric analysis of infrared spectra. **Spectroscopy Letters**, v. 8, n. 6, p. 749, 2005.

WANG, Y.; QIU, D.; COSGROVE, T.; DENBOW, M. L. A small-angle neutron scattering and rheology study of the composite of and gelatin. **Colloids and Surfaces B-Bionterfaces**, v. 70, n. 2, p. 254-258, 2009.

WEINBRECK, F.; MINOR, M.; KRUIF, C. G. Microencapsulation of oils using whey protein/gum Arabic coacervates. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, p. 667-679, 2004.

XIN-YUAN, S.; TIAN-WEI, T. New contact lens based on chitosan/gelatin composites. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 19, p. 467-479, 2004.

XU, Y. X.; KIM, K. M.; HANNA, M. A.; NAG, D. Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 21, n. 2, p. 185-192, 2005.

YAKIMETS, I.; WELLNER, N.; SMITH, A. C.; WILSON, R. H.; FARHAT, I.; MITCHELL, J. Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. **Polymer**, v. 46, n. 26, p. 12577-12585, 2005.

YAKIMETS, I.; PAES, S. S.; WELLNER, N.; SMITH, A. C.; WILSON, R. H.; MITCHELL, J. R. Effect of water content on the structural reorganization and elastic properties of biopolymer films: A comparative study. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 5, p. 1710-1722, 2007.

YANG, L.; PAULSON, A. T. Mechanical and water vapor barrier properties of edible gellan films. **Food Research International**, v. 33, p.563-570, 2000.

YE, A. Complexation between milk protein and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 406-415, 2008.

YIN, Y. J.; YAO, K. D.; CHENG, G. X.; MA, J. B. Properties of polyelectrolyte complex films of chitosan and gelatin. **Polymer International**, v. 48, n. 6, p. 429-432, 1999.

ZHANG, Y. C.; HAN, J. H. Mechanical and thermal characteristics of pea starch films plasticized with monosaccharides and polyols. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 2, p. E109-118, 2006.

ZIANI, K.; OSES, J.; COMA, V.; MATE, J. I. Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 2159-2165, 2008.

ZHONG, Q-P.; XIA, W-S. Physicochemical properties of edible and preservative films from chitosan/cassava/starch/gelatin blend plasticized with glycerol. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 3, p. 262-269, 2008.

Capítulo 4

Estudo da formação de filmes
coacervados de gelatina e pectina.

4 ESTUDO DA FORMAÇÃO DE FILMES COACERVADOS DE GELATINA E PECTINA.

Resumo

Filmes biodegradáveis a base de gelatina (GEL) e pectina (PEC) foram produzidos pelo método de coacervação, onde grupo carboxila da PEC carregados negativamente ($-\text{COO}^-$) interagem eletrostaticamente com a carga elétrica positiva dos grupos amina da GEL ($-\text{NH}_4^+$). O estudo do ζ -potencial zeta em função do pH foi realizado para definir o valor de pH de coacervação ou pH_{zeta} , nesta condição o ζ -potencial zeta da solução filmogênica de GEL/PEC apresenta-se nulo, diversas formulações de GEL/PEC foram testadas: 1:0; 20:1; 10:1; 8:1; 6:1; 4:1; 2:1; 1:1; 1:2 e 0:1. Após a avaliação visual, a única solução filmogênica que apresentou aspecto homogêneo e boa dispersão na placa foi a formulação 20:1 de GEL/PEC em pH_{zeta} ($\sim 4,0$). Esta formulação foi caracterizada quanto as suas propriedades funcionais (propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água (PVA), solubilidade em água (SOL) e opacidade (Op)). O filme coacervado de GEL/PEC apresentou melhor propriedade de barreira ao vapor de água (PVA) e de solubilidade em água (SOL), em relação aos filmes simples de GEL e de PEC. O espectro de FTIR do filme coacervado mostrou que o grupo carboxila da PEC pode ter interagido com o grupo amina da GEL gerando novos grupamentos amida (1630 e 1530 cm^{-1}). Em contrapartida, o método de coacervação conferiu ao filme propriedades mecânicas (tensão na ruptura - TR e alongação - ELO) inferiores em relação ao filme de PEC. Por este fato, o agente plastificante (triacetina - TRI ou glicerol - GLI) foi adicionado ao filme, nas concentrações que variam de 2,5 - 30g de plastificante/100 g de polímero. A adição de GLI em concentrações maiores que 20 g de plastificante/100 g de polímero elevou os valores de ELO e reduziu a TR, em relação ao filme coacervado controle (sem plastificante). Já a adição de TRI (concentração menor que 10%) aumentou significativamente os valores de TR e a ELO. Para os filmes contendo GLI (maioria das concentrações), os valores de PVA, SOL e Op não

alteraram significativamente em relação ao filme controle. Para os filmes com TRI, observou-se diferença significativa nos valores de SOL e Op. Ao comparar os dois plastificantes, nota-se que os filmes contendo TRI apresentaram maior TR, PVA e SOL que os filmes com glicerol, para os valores de ELO e Op não foi observado efeito em relação ao tipo de plastificante. Pela difração de raio-X observou-se um aumento na intensidade do pico dos filmes coacervados com a adição do plastificante, o que reflete no aumento da cristalinidade do material, sendo mais pronunciado para o filme com GLI do que com TRI mostrando melhor incorporação do GLI na matriz polimérica do filme. O comportamento do espectro FTIR dos filmes coacervados não se alterou com a adição do plastificante.

Palavras-Chave: biodegradable films, coacervation, gelatin-pectin complexes, plasticization.

4.1 Introdução

O complexo proteína-polissacarídeo ocorre na natureza e em vários produtos alimentícios (YE, 2008). A interação entre dois polímeros atua no controle da estrutura e da textura de alguns alimentos industrializados (SCHIMITT, 1999). Em geral, acredita-se que a mistura entre os biopolímeros pode gerar materiais com novas propriedades funcionais (MALAY, BAYRAKTAR & BATIGÜN, 2007). Entretanto, a grande dificuldade desta combinação é prever o comportamento dos biopolímeros, principalmente o tipo de interação entre os componentes (TOLSTOGUZOV, 2002).

O sistema polimérico pode ser regido pelas interações eletrostáticas repulsivas ou atrativas, na primeira ocorre incompatibilidade entre os biopolímeros, fenômeno conhecido como segregação, enquanto na segunda os biopolímeros associam entre si formando complexos coacervados. Dentro deste enfoque, o estudo foi direcionado visando à utilização de interações associativa entre os

biopolímeros, através do método de coacervação, na tentativa de melhorar as propriedades funcionais dos filmes biodegradáveis.

O complexo coacervado é formado pela interação eletrostática atrativa entre os biopolímeros com cargas elétricas opostas (aniônicos e catiônicos). Apesar da coacervação se tratar de um método simples, a problemática se mostra na otimização das condições do processo (pH, concentração de polímeros e razão entre os polímeros catiônicos e aniônicos). Segundo SARAVANAN & RAO (2010), o pH é um dos parâmetros mais importantes na coacervação, pois controla o grau de ionização dos grupos residuais das proteínas, e dos polissacarídeos incluindo grupamentos amina e carboxílico dos polissacarídeos. Devido à natureza anfótera das proteínas, a variação de pH afeta diretamente o sinal da carga elétrica, em valores de pH acima do ponto isoelétrico (pI) a proteína apresenta carga líquida negativa e em valores de pH abaixo do pI, carga positiva (DEASY, 1984), para os polissacarídeos, a densidade da carga elétrica perde sua intensidade com a proximidade do pH ao valor do pK_a do polissacarídeo. O ápice das interações eletrostáticas atrativas entre os biopolímeros ocorre quando em um determinado valor de pH (pH de coacervação) as cargas elétricas opostas encontram-se na mesma intensidade em solução e interagem entre si de tal forma que se anula o ζ -potencial zeta, promovendo a formação do complexo coacervado.

Recentemente, filmes elaborados utilizando a técnica de coacervação exibiram resultados promissores em relação as suas propriedades funcionais. Filmes complexos de pectina/quitosana apresentaram baixo grau de inchamento (YAO et al. 1996) e filme polieletrólitos de quitosana/alginate apresentaram boa resistência à dissolução em água (YAN, KHOR & LIM, 2000). Existem poucas pesquisas avaliando o sistema pectina-gelatina (JOSEPH & VENTAKATRAM, 1995; MCMULLEN, NEWTON & BECKER, 1982; SARAVANAN et al. 2002).

A pectina de baixo teor de metoxilação amidada (BTM) possui pK_a em torno de 2,9 (LOPES DA SILVA & RAO, 2006), portanto em pH acima de 2,9 o grupo carboxila esta carregado negativamente ($-COO^-$), elevando o valor numérico do potencial zeta da solução (MATIA-MERITO, LAU & DICKINSON, 2004). A pectina

com baixo teor de esterificação amidada apresenta mais que 50% dos grupos carboxílicos não esterificados e desta porcentagem, cerca de 15-18% dos grupos carboxila estão na forma de amida (MATIA-MERITO, LAU e DICKINSON, 2004). Adicionalmente, a formação de ligações de hidrogênios pode reforçar a estrutura do gel, as quais podem promover alterações positivas nas propriedades funcionais dos filmes (LOOTENS et al. 2003).

A cadeia polimérica da gelatina (GEL) que é composta de uma mistura de aminoácidos ácidos e básicos confere uma gama de possibilidades de interação eletrostática atrativa ou repulsiva com o grupamento carboxila da PEC, a eficiência desta interação é governada pelo valor do pH do meio (POPPE, 1997).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi à produção e caracterização de filmes coacervados à base de misturas de gelatina e pectina.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material

Os biopolímeros utilizados foram Gelatina tipo B (Gelatin do Brasil, Cotia, São Paulo) e pectina GENU® (TIPO I22104 AS-FS, pectina amidada com baixo teor de metoxilação, KELCO BRASIL). Como plastificantes foram utilizados a triacetina (cedida pela Rhodia, Brasil) e o glicerol (Merck - São Paulo, Brasil). Ácido clorídrico (Merck – São Paulo, Brasil) foi utilizado como agente ajustador de pH.

4.2.2 Preparação dos filmes

As soluções poliméricas foram preparadas individualmente, sendo a pectina (PEC) solubilizada pelo procedimento de PLASHCHINA et. al. (2007), onde 8 g de PEC foi dispersa gradualmente em 100 mL de água deionizada pré-aquecida a uma temperatura de 50°C e mantida sob agitação magnética até a completa solubilização do polímero. Para, a gelatina tipo B (GEL) foi adotado o procedimento de CARVALHO & GROSSO (2004), onde 8 g de gelatina tipo B foram hidratadas em 100 mL de água deionizada por 30 min, em temperatura ambiente, dissolvidas por agitação mecânica (60°C) durante 15 min. Após a solubilização dos biopolímeros, as soluções de GEL e de PEC foram misturadas mantendo a concentração final polimérica de 8 g de biopolímero 100 g⁻¹ de solução filmogênica, variando-se a proporção estequiométrica entre a GEL e a PEC (Tabela 9). A mistura foi submetida à agitação magnética a 50 ± 5°C por 10 min, adicionando-se agente plastificante (2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25 e 30 g plastificante 100 g⁻¹ de material polimérico). Após esta etapa, realizou-se o ajuste de pH com HCl com auxílio de um pHmetro (DIGMED) até atingir o pH_{zeta} (valor de pH definido pelo método do ζ- potencial zeta, ver item 2.3). As alíquotas de 20-25 mL das soluções filmogênicas foram dispersas em placas de plaxglass (Pleion) de 15cm de diâmetro e mantidas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e 31±5 % de umidade relativa (URE) por 24 h para secagem e armazenadas. Os filmes secos foram removidos e condicionados em dessecadores a 25 ± 2 °C e 52±5 %URE, durante 7 dias e posteriormente caracterizados.

Tabela 9. Composição dos filmes de GEL/PEC.

GEL/PEC	Gelatina (%)	Pectina (%)
0:1	0,0	100,0
1:6	14,2	85,8
1:2	33,4	66,6
1:1	50,0	50,0
2:1	66,6	33,4
4:1	80,0	20,0
6:1	85,8	14,2
8:1	88,8	11,2
10:1	91,0	8,0
20:1	95,2	4,8
1:0	100,0	0,0

4.2.3 pH_{zeta}

O pH_{zeta} é definido como ponto ótimo onde ocorre o máximo de interações eletrostáticas entre grupo carboxila livre da pectina (COO^-) e grupo amina da gelatina (NH_4^+) provocando a eletroneutralidade (ζ -potencial zeta igual a zero) da solução filmogênica (SURH, DECKER & MCCLEMENTS, 2006). O potencial zeta (ζ -potencial zeta) foi determinado de acordo com MOUNSEY et al. (2008). As soluções filmogênicas foram preparadas com 0,4 g de polímero/100mL de solução, este sistema foi colocado em um Becker em banho para controle da temperatura (50 ± 5 °C) e submetido à agitação magnética por 10min. O pH da solução filmogênica foi ajustado no intervalo de 1,5 a 5,5, utilizando-se solução de ácido clorídrico (0,05N) e o ζ -potencial zeta determinado utilizando-se um equipamento Malvern Zetamaster (Malvern Instruments Ltda).

O valor do pH_{zeta} foi obtida através da curva do potencial zeta em função do pH (Figura 1) e determinado no ponto onde o valor ζ -potencial zeta é igual a zero.

4.2.4 Aspecto Visual e Opacidade

Inicialmente, os filmes foram avaliados visualmente e apenas os filmes homogêneos (ausência de partículas insolúveis e coloração uniforme), contínuos (sem a presença rupturas ou zonas quebradiças) e de fácil manuseio (facilidade de desprendimento dos filmes do suporte) foram caracterizados.

Opacidade (Op) dos filmes foi determinada utilizando-se colorímetro Hunterlab (Colorquest II, Reston, VA, USA) pelo método da ASTM D523 (ASTM, 1999). As determinações foram feitas em triplicata após a calibração do colorímetro com padrão branco e padrão preto, quando a $Op = (OpB/Opp) \times 100$, sendo Op porcentagem de opacidade do filme, Opb opacidade do filme com o fundo branco e Opp opacidade do filme com o fundo preto.

4.2.5 Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas (tensão na ruptura TR e alongação na ruptura ELO) foram determinadas utilizando-se um texturômetro TA-XT2 (Stable Micro System, Surrey, UK) de acordo com o método ATM D D882-95 (ASTM, 1995a). A separação inicial foi fixada em 50mm e a velocidade do teste foi de 1mm/s. A TR e a ELO foram obtidas diretamente da curva de tração versus tempo.

4.2.6 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA, $\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$) foi determinada pelo método E-96-95 da ASTM (ASTM, 1995b) a $25\pm 5^\circ\text{C}$. As amostras dos filmes foram cortadas na forma de discos e fixadas no interior das células de permeação feitas de acrílico, contendo cloreto de cálcio anidro (0% URE). As células de permeação foram acondicionadas em dessecadores contendo solução salina saturada de cloreto de sódio em temperatura e umidade relativa ($75 \pm 3\%$ URE). O vapor de água transferido através do filme foi determinado pelo ganho de massa no sistema, referente a cinco medidas durante um período de 48 horas. Os dados foram registrados em um gráfico de ganho de peso versus tempo. A PVA foi calculada através da equação:

$$PVA = gx / tAP_o(RH_1 - RH_2)$$

Onde g/t é o coeficiente angular da equação da reta de ganho de massa versus tempo (g/t), x é a espessura média do filme (mm), A é a área de permeação (m^2), P_o é a pressão parcial de vapor d'água a 25°C (kPa) e $(RH_1 - RH_2)$ é o gradiente de umidade relativa do meio contendo cloreto de cálcio anidro (0% UR) e solução salina saturada de cloreto de sódio (NaCl, umidade relativa = 75%). As análises foram realizadas em triplicata para cada filme.

4.2.7 Solubilidade em água

A solubilidade em água dos filmes foi feita de acordo com GONTARD & GUILBERT (1994). Amostras pesadas (mi), na forma de disco (2cm de diâmetro) foram imersas em um becker contendo 50 mL de água deionizada, mantidos sob lenta agitação lenta (Shaker Marconi, São Paulo, Brasil) por um período de 24h, a temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$). Após este período, as amostras remanescentes

foram retiradas da solução e secas em estufa com circulação de ar (105°C por 24 h) para determinação da massa final seca (mf). A solubilidade em água (SOL) foi calculada conforme a equação:

$$SOL(\%) = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) 100$$

4.2.8 Difração de Raio-X

O difratograma dos filmes foi obtido utilizando-se um difratômetro de raio-X (Rigaku D, Max, Tokyo, Japan) com radiação de $\text{CuK}\alpha$ (1,542 Å) na voltagem de 30kV e 30mA (ANDREUCETTI, CARVALHO & GROSSO, 2010). As amostras foram submetidas a uma velocidade de varredura de 2°min^{-1} entre $2\theta = 5-35^\circ$.

4.2.9 Espectroscopia de Infravermelho

O espectro de infravermelho com transformada de Fourier foi realizado de acordo com a metodologia descrita por VICENTINI (2003), utilizando-se um espectômetro IR Prestige-2 Shimadzu (Kioto, Japão). Para cada filme, efetuou-se 10 varreduras em um intervalo espectral de $400-4000\text{cm}^{-1}$ e resolução de 4cm^{-1} .

4.2.10 Análise Estatística

O programa SAS foi utilizado para calcular as análises de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para avaliar diferenças entre as médias no intervalo de 95% de confiança.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Potencial Zeta

O processo de formação do complexo coacervado entre dois políons é fortemente sensível à variação do pH (DUCEL, RICHARD, SAULNIER, POPINEAU & BOURY, 2004). Com o propósito de definir a condição de pH mais apropriada para elaboração dos filmes coacervados foi realizada uma medida do potencial eletrocinético (ζ potencial zeta) da solução filmogênica (sistema GEL/PEC) em função do pH. No valor de pH onde ζ -potencial zeta apresentar valor igual a zero ocorre a máxima interações eletrostáticas atrativas entre os grupos carregados da GEL e PEC, onde as cargas positivas da GEL ($-\text{NH}_4^+$) foram neutralizadas pelas cargas negativas da PEC ($-\text{COO}^-$) (AKEN, 2006). Este método foi utilizado por muitos autores para investigar o valor de pH apropriado para elaboração das microcápsulas coacervadas, como pode ser verificado nos sistemas: gelatina-goma arábica (BORAL & BOHIDAR, 2010), globulina de ervilha-goma arábica (DUCEL et al. 2004), proteína de soja-dextrana (XU & YAO, 2009), caseína-pectina, (BÉDIÉ, TUGEON & MAKHLOUF, 2008) e proteína do soro do leite-goma arábica (WEINBRECK, MINOR & KRUIF, 2004).

Na Figura 15, pode-se observar a variação do potencial zeta em função do pH da solução filmogênica (GEL/PEC) para as diferentes formulações estudadas. Para a solução pura de GEL, verificou-se que a proximidade do pH ao ponto isoelétrico (pI da GEL = 4,8 - 5,0) a carga elétrica encontra-se neutra, devido a fraca dissociação entre os grupos carregados na superfície do biopolímero (VRIES, WEINBRECK & KRUIF, 2003). Em pHs abaixo do pI da GEL, os grupos amina ($-\text{NH}_4^+$) apresentam-se cada vez mais protonados com a acidificação da solução, isto pode ser verificado com o aumento no valor do ζ -potencial zeta, o que reflete a maior densidade da carga positiva na solução.

O principal parâmetro que determina a densidade de carga da solução pura de PEC é o valor do seu pK_a , pois em pH próximo ao valor de pK_a o ζ -potencial zeta tende a neutralidade, devido a baixa densidade de carga negativa em solução (JONES et al. 2010), o valor do pK_a pode variar de 2,9-3,2, segundo RALET et al. (2001). Enquanto em pHs acima do pK_a da PEC, a densidade de carga elétrica apresenta-se negativa (desprotonação dos grupos carboxílicos) e aumenta em magnitude quando o valor de pH afasta-se do pK_a , isto pode ser verificado pelo elevação, em módulo, do ζ -potencial zeta da solução (Figura 15).

Ao avaliar as misturas de GEL/PEC ocorre uma inversão de sinal do potencial durante a titulação ácida, inicialmente o potencial apresenta carga negativa (pH 5,0) e à medida que o meio torna-se mais ácido a carga negativa, em valor numérico, foi reduzida pela ação do íon hidrogeniônico do ácido (H^+). Prosseguindo com a acidificação, a densidade de carga para cada formulação atinge sua neutralidade (ζ -potencial= 0) em um determinado valor de pH, intitulado de pH de coacervação (pH_{zeta}). Para as formulações 4:1; 2:1; 1:1; 1:2 e 1:6 de GEL/PEC o valor de pH_{zeta} foram menores que o pK_a . Enquanto para as demais formulações, os valores de pH_{zeta} mostraram-se maiores que o pK_a da PEC e a medida que diminui a quantidade de PEC na formulação, o valor de pH_{zeta} aumenta proporcionalmente, variando de 3,6 até 4,1. Quando a titulação excede o ponto de eletroneutralidade das cargas (pH_{zeta}) observa-se a inversão do sinal do ζ -potencial (+) e sua intensidade aumenta proporcionalmente com a redução do pH, para todas formulação estudadas.

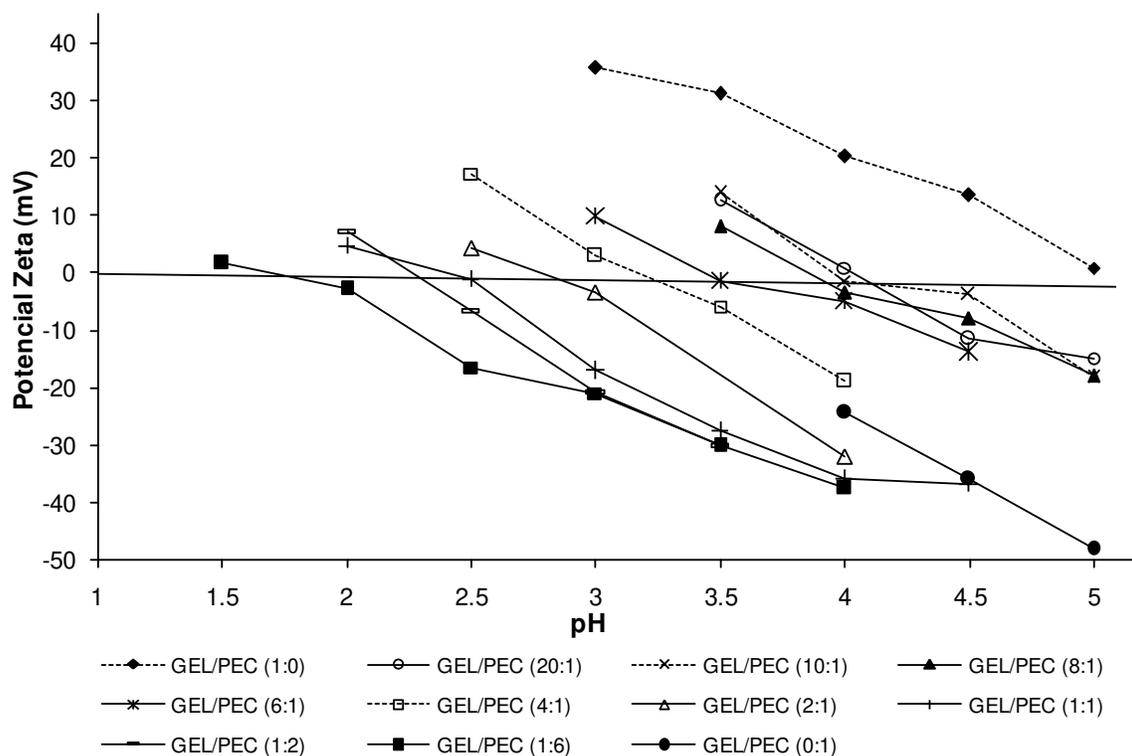


Figura 15. Curva do potencial zeta da solução filmogênica do par polimérico GEL/PEC em função da variação do pH (titulação com HCl) em diferentes proporções estequiométricas.

O comportamento da carga elétrica do sistema complexo com a adição crescente da PEC pode ser observado na Figura 15. Em pH 4,0, a adição de 4,8% de PEC (ou 20:1 de GEL/PEC) ao sistema reduziu a intensidade do potencial zeta anteriormente registrada em torno de +20mV (0% PEC ou 1:0 de GEL/PEC) para 0mV (4,8% PEC). Esta redução pode ser explicada pelo fato dos grupos carboxílicos da PEC e os grupos amina da GEL associaram-se através das interações eletrostáticas neutralizando as cargas livres presente na solução. PLASHCHINA, ZHURAVLEVA & ANTONOV (2007) observaram que a principal interação que rege o complexo GEL e PEC é do tipo eletrostática.

Os potenciais apresentaram carga com sinal negativo e com intensidade crescente à medida que aumenta a concentração de PEC no complexo (acima de

4,8% de PEC). Isto pode ser explicado, pelo aumento na quantidade de íons carboxílicos disponíveis, devido à maior concentração de PEC no complexo. Este comportamento evidencia a formação de interações eletrostáticas entre os grupos carregados da GEL e da PEC. Neste valor de pH o grupo amina da GEL deveria encontrar-se protonado ($-\text{NH}_4^+$) e os grupos carboxílicos da PEC desprotonados (COO^-).

4.3.2 Aspecto Visual das soluções filmogênicas em pH de coacervação

Os testes de potencial zeta foram realizados com baixa concentração de material polimérico 0,4g de polímero/100mL de solução, em decorrência da alta sensibilidade do equipamento. Os filmes coacervados foram elaborados na concentração de 8g de polímero/100mL, nesta concentração a maioria das soluções filmogênicas ao terem ajustado o pH apresentaram aspectos indesejáveis para a produção de filmes, tais como: separação de fase, pouca dispersão na placa suporte, presença de sólidos insolúveis, entre outros.

O aspecto visual das soluções filmogênicas de GEL/PEC elaboradas pelo método de coacervação (com ajuste de pH - pH_{zeta}), pode ser verificado na Figura 16. As soluções contendo 100% de GEL (1:0 de GEL/PEC) e 100% PEC (0:1 de GEL/PEC) apresentaram aspecto homogêneo e translúcido. Entretanto, para as formulações com maior concentração de pectina (1:6 e 1:2 – GEL/PEC), os polímeros interagiram e aglomeram-se de tal forma que as soluções geleificaram instantaneamente. Ao diminuir a concentração de PEC no sistema ocorreu separação de fase, sendo mais evidenciada nas formulações 4:1; 6:1; 8:1 e 10:1 de GEL/PEC. Desta forma, a maioria das soluções filmogênicas em condição de coacervação apresentou aspecto indesejável para a produção de filmes. Apenas a solução filmogênica contendo 20:1 de GEL/PEC foi selecionada por apresentar aspecto homogêneo e boa dispersão na placa suporte. A partir destes aspectos

desejáveis foram elaborados os seguintes filmes: filme coacervado de GEL/PEC (20:1) e os filmes de 100% GEL (1:0) e de 100% PEC (0:1).

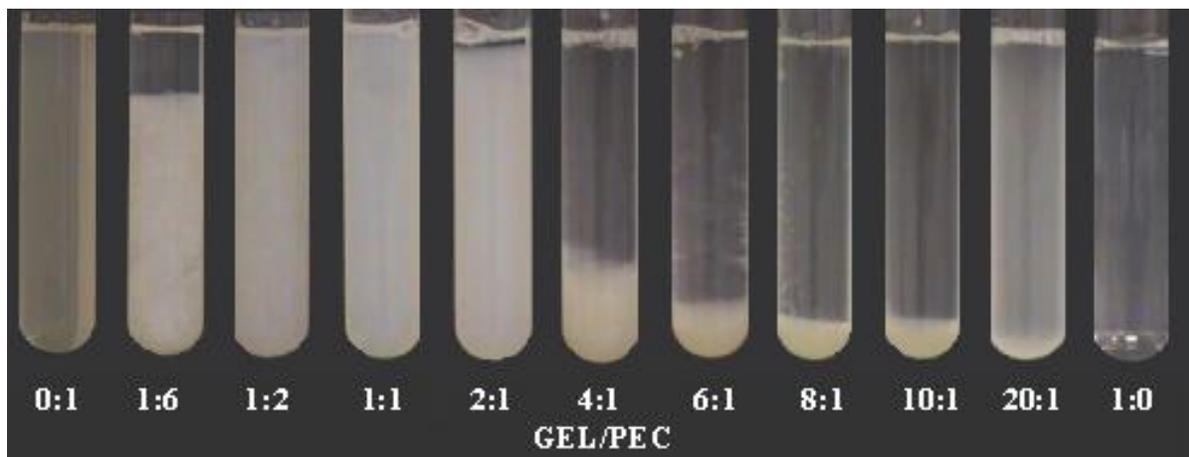


Figura 16. Imagens das soluções filmogênicas de GEL/PEC elaborados pelo método de coacervação (pH_{zeta}), em diferentes proporções estequiométricas.

4.3.3 Caracterização do filme coacervado

Efeitos do método de coacervação nas propriedades funcionais dos filmes coacervados de GEL/PEC (20:1) em relação aos filmes de GEL e de PEC são apresentadas na Tabela 10. Observou-se que a combinação entre a GEL e a PEC elaborados na condição de coacervação (pH_{zeta}) apresentou melhor propriedade de barreira ao vapor de água (PVA) e solubilidade em água (SOL), em relação aos filmes de GEL e de PEC. Os valores de espessura ($0,034 \pm 0,009$ mm) dos filmes controle de GEL e PEC e os filmes coacervados de GEL/PEC (20:1) não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações estudadas.

O filme coacervado de GEL/PEC reduziu a PVA em 47% e 40%, em relação aos filmes de PEC e de GEL, respectivamente. Além disso, o filme coacervado apresentou maior estabilidade em água, sendo o valor de SOL 60% menor do que

os filmes de PEC e de GEL, que apresentaram 100% de solubilidade em água. Sendo assim, as interações formadas entre os biopolímeros pelo método de coacervação afetaram positivamente e significativamente os valores de PVA e de SOL. Esta resistência à presença da água pode estar associada à presença de interações eletrostáticas formadas pelo método de coacervação, que poderia estar reduzindo o volume livre na matriz polimérica do filme coacervado. Um indício desta compactação pode ser observado no valor de umidade (UMI) do filme coacervado (Tabela 10), onde menor teor de água livre ou UMI foi notado no filme coacervado em relação ao filme de GEL. Portanto, o método de coacervação poderia estar reduzindo a ação plastificante da água na estrutura do filme, o que justificaria os baixos valores de PVA e SOL.

De acordo com HIGUSHI & AGUIAR (1959) os valores de PVA dos filmes esta intimamente ligado ao número de grupos polares livres presente na cadeia polimérica, pois estes grupos facilitam o transporte das moléculas de vapor de água através do filme. No filme coacervado de GEL/PEC os grupos polares destes polímeros poderiam estar interagindo entre si eletrostaticamente, o que poderia justificar a baixa PVA deste filme coacervado.

As propriedades mecânicas de tensão na ruptura (TR) e alongação (ELO) do filme de GEL/PEC mostraram-se inferiores ao filme de PEC. Uma explicação para o fato do filme de PEC apresentar-se mais resistente pode estar relacionada a sua estrutura molecular mais rígida e compacta em comparação com a estrutura da GEL. Devido a repetição das unidades dos monômeros de ácidos galacturônicos ligados por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ os mesmos conferem a cadeia de PEC uma estrutura mais rígida e compacta, segundo WANG, PAGÁN & SHIO (2002). Por outro lado, a cadeia da GEL por apresentar em sua estrutura 18 unidades monoméricas diferentes (aminoácidos) pode conferir à proteína um rearranjo molecular mais complexo e aberto (KEENAN, 1998).

Ao comparar as propriedades mecânicas do filme coacervado com o filme de GEL, o complexo mostrou-se mais resistente e com similar flexibilidade. Este resultado foi similar ao relatado por LIU et al. (2007), que observaram que a

presença de gelatina de pele de peixe em filmes de pectina melhorou suas propriedades mecânicas (TR e ELO). Além disso, o conteúdo de PEC (95% de GEL e 5% de PEC) pode estar interagindo fortemente com a GEL conferindo maior compactação da estrutura do filme.

Na literatura os filmes compostos de GEL E PEC apresentam propriedades mecânicas bem variadas, como pode ser observado nos trabalhos de: LIU et al. (2007) em filmes compostos de gelatina de pele de peixe e pectina a TR variou de 43,5 a 59,1 MPa e a ELO de 2,1 a 3,2 % e de FARRIS et al. (2011) com hidrogéis complexos gelatina e pectina apresentou TR de 11,09 MPa e 151,57 % de ELO.

Tabela 10. Propriedades funcionais dos filmes coacervados de GEL/PEC (20:1) e dos filmes de GEL e de PEC.

Filmes	TR (MPa)*	ELO (%)*	PVA (gmm/m ² hkPa)*	SOL (%)*	UMI (%)*
GEL	68,84±0,11 ^c	3,09±0,48 ^b	0,30±0,01 ^b	100,0±0,5 ^a	13,2±1,7 ^a
GEL/PEC	76,37±3,73 ^b	3,26±0,20 ^b	0,18±0,01 ^c	40,0±0,9 ^b	9,2±1,5 ^b
PEC	91,39±7,28 ^a	5,66±0,61 ^a	0,34±0,01 ^a	100,0±0,0 ^a	10,0±1,1 ^b

TR (tensão na ruptura), ELO (elongação), PVA (permeabilidade ao vapor de água); SOL (solubilidade em água) e UMI (umidade).

* Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: Letras diferentes minúsculas na vertical representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

Os filmes simples (GEL e PEC) e o filme coacervado de GEL/PEC foram submetidos à análise de FTIR na tentativa de confirmar a interação entre os grupos amino da proteína (carregado positivamente) e grupo carboxila do polissacarídeo (carregado negativamente) devido o método de coacervação (pHzeta), como pode ser observado na Figura 17.

O espectro de FTIR do filme de GEL apresenta pico de amida-A em 3275 cm^{-1} representando o estiramento NH e de amida-B em 2900 cm^{-1} do estiramento do grupo CH e $-\text{NH}_2$. Entre 1650 e 1200 cm^{-1} foram encontrado três picos

característicos do grupamento amida, como: amida I em 1630 cm^{-1} referente a estiramento do C=O e das pontes de hidrogênio acoplados ao COO, amida II em 1530 cm^{-1} consiste do dobramento do grupo N-H e do estiramento do grupo C-N e amida III em 1240 cm^{-1} , segundo YAKIMETS, WELLNER, SMITH, WILSON, FARHAT & MITCHALL (2005). Resultados similares foram encontrados por (HOQUE, BENJAKUL & PRODPRAN, 2011) em filmes a base de gelatina de pele de lula.

Para o espectro FTIR do filme de PEC pode-se observar a presença de um pico característico do grupo éster e do carboxila em 1780 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} , respectivamente (YAO et al., 1996). Estes picos apresentam-se pouco pronunciados por se tratar de uma pectina com baixo teor de esterificação amidada, esta característica do polissacarídeo confere ao filme picos com maior intensidade na região de 1590 cm^{-1} recorrentes do grupamento amida (SARAVANAN & RAO, 2010).

No filme coacervado de GEL/PEC o espectro FTIR apresenta-se similar ao espectro do filme de GEL, o que pode ser explicado pelo fato deste polímero estar em maior concentração (95% em relação ao material polimérico total) no sistema. Uma explicação para o fato dos 5% de PEC adicionados ao filme coacervado não afetarem o comportamento do espectro foi de que o grupo carboxila da PEC pode ter interagido com o grupo amina da GEL gerando novos grupamentos amida, portanto os picos característicos da PEC em 1780 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} que deveriam ser notados foram substituídos pelos picos do grupo funcional amida (1630 e 1530 cm^{-1}). Resultado similar foi observado por SARAVANAN & RAO (2010) para coacervado GEL/PEC, sendo confirmada a reação entre grupo amino da GEL e grupo carboxila da PEC pela presença do pico característico do grupo amida na região de $1500\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$.

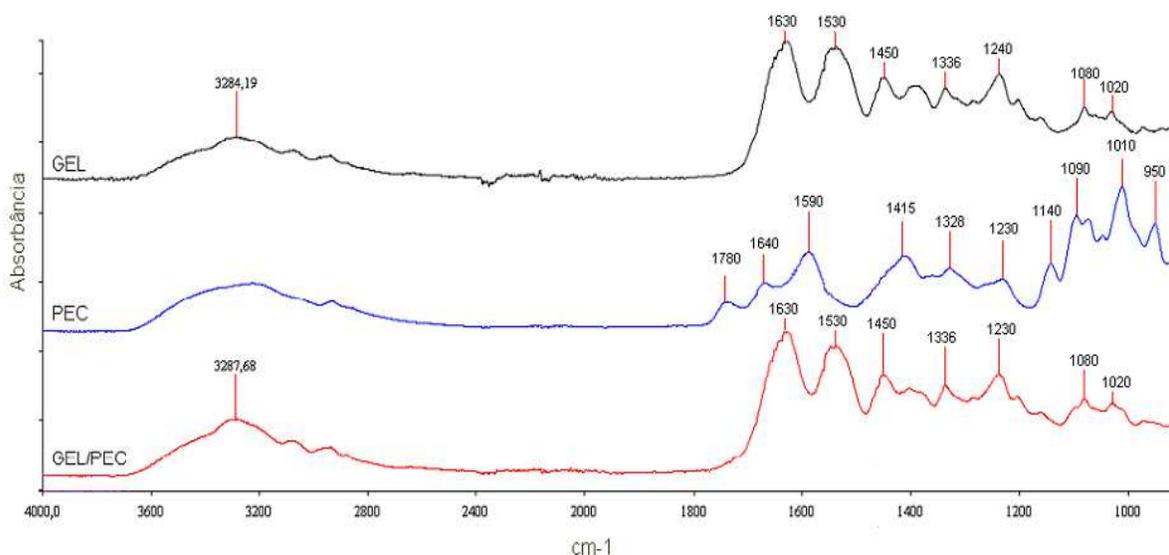


Figura 17. Espectrometria de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) do filme coacervado de GEL/PEC e dos filmes simples de GEL e PEC.

4.3.4 Efeito da adição do plastificante no filme coacervado

Segundo ARVANITTOYANNIS (2002) a função do agente plastificante nos filmes poliméricos seria a de reduzir a rigidez e a dureza, conferindo maior extensibilidade. Por esta razão, na tentativa de melhorar a flexibilidade e a extensibilidade do filme coacervado de GEL/PEC foi realizado um estudo adicionando dois tipos de plastificantes (triacetina e glicerol) em diferentes concentrações.

4.3.4.1 Aspecto Visual, Opacidade e Espessura

Todos os filmes coacervados de GEL/PEC contendo plastificante foram avaliados visualmente. Os filmes com glicerol apresentaram-se transparentes com Op em torno de $12,90 \pm 0,02\%$ não diferindo significativamente em relação ao filme

controle sem plastificante ($12,86 \pm 0,02\%$). À adição crescente de GLI (2,5 a 30g de plastificante/100g de material polimérico) não afetou os valores de Op. Comportamento similar foi observado por HOQUE, BENJAKUL & PRODPRAN (2011) na transparência dos filmes de gelatina de pele de lula adicionados de glicerol.

Já os filmes contendo triacetina mostraram-se levemente translúcidos e opacos apresentando aumento significativo na Op de 17% e 15%, para os filmes contendo 10 e 15g de TRI/100g de material polimérico, respectivamente. Resultado similar foi observado por JIANG et al. (2010) em filmes de gelatina de pele de catfish (bagre) contendo 50% de TRI. O tipo de plastificante (triacetina ou glicerol) não afetou significativamente os valores de Op dos filmes coacervados de GEL/PEC. Em concentrações mais elevadas (acima de 15%) observou-se resíduos oleosos na superfície do filme o que ocorre quando a concentração do plastificante excede o limite de compatibilidade com o polímero causando a separação de fase e a exclusão do plastificante (DONHOWE & FENNEMA, 1993).

Todos os filmes coacervados de GEL/PEC contendo plastificante (GLI ou TRI) apresentaram boa resistência durante o manuseio. O controle de espessura foi realizado para todas as formulações estudadas com plastificante apresentando valores de espessura ($0,037 \pm 0,008$ mm) que não diferiram significativamente ($p < 0,05$).

4.3.4.2 Propriedades Mecânicas

Na Tabela 11 pode ser visualizada a influência da concentração do agente plastificante (Triacetina ou Glicerol) na tensão na ruptura (TR), alongação (ELO), permeabilidade ao vapor de água (PVA) e solubilidade em água (SOL) do filme coacervado de gelatina e pectina.

Tabela 11. Efeito da concentração de plastificante (Cp) nas propriedades mecânicas (tensão na ruptura – TR e alongação – ELO) do filme coacervado de GEL/PEC elaborados com triacetina (TRI) e glicerol (GLI), como agente plastificante.

Cp *	TR (MPa)**		ELO (%)**	
	TRI	GLI	TRI	GLI
0	76,37±3,73 ^{dA}	76,37±3,73 ^{bcA}	3,26±0,19 ^{dA}	3,26±0,19 ^{cA}
2,5	107,34±1,77 ^{aA}	85,91±4,33 ^{aB}	5,99±0,38 ^{aA}	5,91±0,80 ^{cA}
5	96,63±1,38 ^{abA}	83,49±0,35 ^{aB}	4,55±0,30 ^{bA}	3,30±0,06 ^{cB}
7,5	92,52±2,73 ^{bcA}	81,27±1,99 ^{abB}	4,48±0,21 ^{bcA}	4,89±0,53 ^{cA}
10	88,28±10,47 ^{bcdA}	74,06±2,62 ^{bcA}	5,74±0,18 ^{aA}	4,54±0,20 ^{cB}
15	78,62±1,32 ^{cdA}	51,71±2,04 ^{dB}	3,53±0,14 ^{cdB}	4,44±0,10 ^{cA}
20	#	41,70±0,41 ^e	#	25,13±2,25 ^b
25	#	30,91±0,38 ^f	#	35,07±1,54 ^a
30	#	23,33±2,20 ^g	#	35,82±1,87 ^a

* Cp (unidade) g de plastificante/100g de material polimérico;

**Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados na horizontal, enquanto as letras minúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados na vertical, todas as médias foram obtidas através do teste de TUKEY.

Filmes descartados por apresentar aspecto oleoso, devido a exudação da triacetina na superfície do filme.

O aumento na concentração de glicerol (GLI) na faixa de 20 – 30 (g de glicerol/100g de polímero) reduziram a TR e conferiram maior ELO ao filmes coacervado de GEL/PEC. Este mesmo comportamento foi registrado por RIVERO, GARCÍA & PINOTTI (2010) para filmes de gelatina em concentrações maiores que 30% de GLI e por SILVA, BIERHALZ & KIECKBUSCH (2009) para filmes compostos de pectina e alginato contendo 5 ou 10% de GLI. Isto pode ser explicado, pelo fato dos grupos polares (-OH) do glicerol competir com os grupos envolvidos na interação entre polímero-polímero, sendo substituído pelas ligações de H entre plastificante-polímero, reduzindo as interações entre as moléculas da

cadeia polimérica aumentando sua mobilidade, a qual se reflete na redução da TR e no aumento da ELO (YANG & PAULSON, 2000). Entretanto, a adição de GLI nas concentrações abaixo de 20% não alterou significativamente os valores de ELO, em relação ao filme controle. RIVERO, GARCÍA & PINOTTI (2010) observaram o mesmo comportamento resposta para o filme de gelatina na mesma faixa de concentração de GLI. O comportamento da TR foi diferente para cada concentração de GLI adicionada à solução filmogênica, em baixas concentrações 2,5 e 5% de GLI ocorreu elevação na TR (em torno de 10%), enquanto as concentrações de 7,5 e de 10% de GLI não afetaram significativamente a tensão, em relação ao filme controle (sem plastificante).

A adição de TRI (2,5; 5; 7,5 e 10%) nos filmes coacervado de GE/PEC (20:1) proporcionou um aumento significativo na ELO ao comparar com o filme controle. Este comportamento foi mais pronunciado na concentração 2,5% promovendo elevação de 83,7% na ELO em relação ao filme controle (0%TRI). A TR aumentou significativamente ao se adicionar 2,5; 5; 7,5 ou 10% de TRI, em relação ao filme controle, exceto para 15% de TRI que não se alterou significativamente em relação ao controle (0% de plastificante). Efeito similar para ELO foi observado por JIANG et al. (2010) nos filme de gelatina de pele de bacalhau com TRI, onde a adição de 50% de TRI aumentou a ELO em 110,3% em relação ao controle (0%TRI). Já para os valores de TR, estes autores relataram redução em torno de 41% com a adição de TRI (50%), efeito contrario ao observado para os filmes coacervados deste trabalho.

O efeito do tipo de plastificante (Triacetina ou Glicerol) adicionado ao filme coacervado de GEL/PEC pode ser visualizado na Tabela 3. Os filmes elaborados com TRI apresentaram maior TR que os filmes com glicerol. Os filmes elaborados com 2,5 e 7,5g de plastificante/100g de polímero, não apresentaram diferença significativa entre os agentes plastificantes utilizados glicerol e triacetina. O glicerol conferiu maior flexibilidade ao filme (maior ELO) em relação a TRI, apenas na concentração de 15 g de plastificante/g de polímero. Efeito oposto foi observado para as formulações contendo 5 e 10% de GLI.

Em filmes compostos de pectina e alginato inter cruzados com Ca^{+2} adicionados de 10 % de glicerol observou-se valores de TR em torno de 60 MPa e de ELO 9% (SILVA, BIERHALZ & KIECKBUSCH, 2009); filmes compostos de GEL, PEC, polivinil álcool e glicerol apresentaram TR de 106,6 kPa (ou 0,1066MPa) e ELO de 20,35%, segundo JO et al. (2005) e em filmes de PEC contendo sorbitol a TR variou de 2 a 7,5 MPa e a ELO de 6 a 12 % (MAFTOONAZAD; RAMASWAMY & MARCOTTE, 2007). Ao comparar os resultados de TR e ELO do filme coacervado de GEL/PEC (20% GLI) com os resultados citados anteriormente da literatura, pode-se constatar que o método de coacervação produziu filmes com boas propriedades mecânicas.

4.3.4.3 Permeabilidade ao vapor de água

A Tabela 12 apresenta os resultados de permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes coacervados de GEL/PEC contendo diferentes teores de plastificante (Triacetina ou Glicerol).

Tabela 12. Efeito da concentração de plastificante (Cp) nas propriedades funcionais: permeabilidade ao vapor de água (PVA) e solubilidade em água (SOL) dos filmes coacervados de GEL/PEC elaborados com triacetina (TRI) e glicerol (GLI), como agente plastificante.

Cp*	PVA (g.mm/m ² .h.kPa)**		SOL (%)**	
	TRI	GLI	TRI	GLI
0	0,18±0,01 ^{dA}	0,18±0,01 ^{bcA}	40,0±0,9 ^{dA}	40,0±0,9 ^{aA}
2,5	0,27±0,02 ^{bcA}	0,30±0,01 ^{abA}	50,9±8,9 ^{cdA}	40,3±5,1 ^{aA}
5	0,32±0,02 ^{aA}	0,21±0,03 ^{bcB}	59,4±5,0 ^{bcA}	35,4±3,0 ^{abB}
7,5	0,19±0,00 ^{dB}	0,22±0,01 ^{bcA}	61,9±3,8 ^{bcA}	39,9±2,9 ^{abB}
10	0,33±0,02 ^{aA}	0,16±0,01 ^{cB}	89,5±9,3 ^{aA}	32,6±1,9 ^{bB}
15	0,23±0,02 ^{cdA}	0,17±0,04 ^{cB}	66,9±1,1 ^{bA}	36,2±2,1 ^{abB}
20	#	0,27±0,02 ^{abc}	#	38,7±1,1 ^{ab}
25	#	0,30±0,04 ^{ab}	#	37,5±1,6 ^{ab}
30	#	0,38±0,01 ^a	#	36,6±0,6 ^{ab}

* Cp (unidade) g de plastificante/100g de material polimérico;

**Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa (p<0,05) entre os resultados na horizontal, enquanto as letras minúsculas diferentes representam diferença significativa (p<0,05) entre os resultados na vertical, todas as médias foram obtidas através do teste de TUKEY.

Filmes descartados por apresentar aspecto oleoso, devido a exudação da triacetina na superfície do filme.

Para os filmes coacervados de GEL/PEC a adição de TRI, nas concentrações de 2,5; 5 e 10% de plastificante, elevou os valores de PVA ao comparados com o filme sem plastificante. Para os filmes de GEL/PEC elaborados com glicerol, nas concentrações de 2,5 a 25%, os valores de PVA não diferiram significativamente em relação ao filme controle (0% de plastificante), já em 30% de GLI observa-se que o valor de PVA apresentou um pouco mais que o dobro do que a PVA do controle (sem plastificante).

Geralmente, a incorporação de plastificante nos filmes aumenta o valor da PVA, como foi observado por MAFTOONAZAD, RAMASWAMY & MARCOTTE

(2007), MALI et al. (2004) e YANG & PAULSON (2000). Este fato pode ser explicado por dois aspectos: primeiro, a inclusão de moléculas de plastificantes promove uma reorganização da rede polimérica causando aumento do espaço intercadeias (ou do volume livre) e conseqüentemente maior difusividade do vapor de água através do filme (YANG & PAULSON, 2000). Em segundo lugar, a natureza hidrofílica confere ao plastificante alta capacidade de interagir com a água facilitando a solubilização e permeação através do filme (CUQ et al., 1997). Vários autores observaram este mesmo efeito, RIVERO, GARCÍA & PINOTTI (2010), KOKOSZKA et al. (2010), RODRIGUEZ et al. (2006) e THOMAZINE, CARVALHO & SOBRAL (2005).

Comparando os resultados de PVA entre os dois plastificantes, pode-se observar que os filmes coacervados de GEL/PEC nas concentrações de 5, 10 e 15% de GLI apresentam menor valor de PVA que os filmes contendo TRI. A diferença entre tamanho molecular dos plastificantes pode explicar este efeito, sendo a molécula de glicerol (massa molar de 92,08g/mol - $C_3H_8O_3$) menor que a molécula de triacetina (massa molar de 218,21g/mol - $C_3H_5(OCOCH_3)_3$) o que pode permitir uma maior infiltração entre a cadeia polimérica adjacente do que as moléculas de TRI, a qual poderia agir de forma menos pronunciada no aumento volume livre entre as cadeias poliméricas da GEL e PEC (CUQ et al., 1997).

JO, KANG, LEE KWON & BYUN (2005) produziram filmes a base de gelatina e pectina adicionados de polivinil álcool e glicerol com PVA de 0,65 g.mm/m².h.kPa. Filme de gelatina de pele de peixe e pectina adicionado de glicerol com PVA de 0,06 g.mm/m².h.kPa apresentou maior resistencia ao vapor de água do que o filme coacervado de GEL/PEC (0,19 g.mm/m².h.KPa).

Para as demais concentrações testadas não houve diferença significativa nos valores de PVA entre os dois plastificantes.

4.3.4.4 Solubilidade em água

A solubilidade em água (SOL) dos filmes coacervados de GEL/PEC plastificados com diferentes concentrações de triacetina (TRI) e glicerol (GLI), pode ser observada na Tabela 12. Para os filmes plastificados com TRI, verificou-se que o aumento da concentração provocou aumento da solubilidade em relação ao filme controle (0% TRI). Comportamento similar foi verificado por JIANG et al. (2010) na solubilidade dos filmes de gelatina de pele de catfish (bagre), onde a SOL aumentou 20% nos filmes contendo 150% de TRI em relação ao filme controle (0% TRI).

A adição crescente de GLI nos filmes coacervados não afetou significativamente os valores de SOL em relação ao controle. Mesmo efeito foi verificado em filmes de proteína do soro de leite (SOTHORNVIT & KROCHTA, 2000) e em filmes de gelatina e quitosana reticulados com transglutaminase (KOLODZIEJSKA & PIOTROWSKA, 2007). De modo geral, a adição deste plastificante deveria agir aumentando a SOL dos filmes, devido sua natureza higroscópica e por promover um aumento nos volume livre durante o rearranjo das cadeias poliméricas, como foi relatado na literatura por SOARES & SOLDI (2010) e SILVA, BIERHALZ & KIECKBUSCH (2009).

Filmes contendo TRI apresentaram solubilidades estatisticamente superiores às solubilidades observadas para os filmes contendo GLI independente das quantidades de plastificante utilizadas, por exemplo, filmes contendo TRI na concentração de 10g de plastificante/100g de material polimérico apresentaram SOL 174% maior do que o filme contendo GLI na mesma concentração.

Ao comparar os resultados de SOL com os da literatura, verifica-se que o filme coacervado GEL/PEC (2,5% de GLI), deste trabalho, apresenta valor de SOL 29% menor em relação ao filme composto de GEL/PEC/Polivinil álcool contendo 2,5% de glicerol, segundo JO et al. (2005).

4.3.4.5 Difração de Raio-X

Na Figura 18 pode-se observar o difratograma de raio-X dos filmes coacervados de GEL/PEC adicionados de agente plastificante (triacetina e glicerol). Os difratogramas dos filmes contendo plastificante (triacetina ou glicerol) apresentaram os mesmos picos característicos, mas com maior intensidade que o filme coacervado sem plastificante.

Todos os filmes coacervados com ou sem plastificante apresentaram um pico característico em $2\theta = 7 - 8^\circ$ atribuído a cristalinidade da GEL pela presença de estruturas tripla hélice, em pequenas quantidades. Uma hipótese para este resultado, deve-se ao fato da GEL estar em maior quantidade (95,2%) na formulação do filme, o que prevalece nas características morfológicas do filme. Este pico foi também observado para filmes de gelatina (YAKIMETS et al., 2007). O pico em $2\theta = 20^\circ$ denota a característica amorfa dos filmes coacervados de GEL/PEC, sendo este perfil um indicativo da alta estabilidade desses filmes. BERGO & SOBRAL (2007) e CHENG et al. (2003) observaram resultados similares para filmes à base de gelatina suína contendo glicerol.

Observou-se um aumento na intensidade do pico de difração de raio-X dos filmes coacervados com a adição do plastificante, o qual reflete diretamente no aumento da cristalinidade do material. Este efeito foi mais pronunciado na formulação contendo glicerol do que no filme com triacetina. ZIANI et al. (2008) observaram que a presença de glicerol nos filmes de quitosana atuou reduzindo a T_g , aumentando a mobilidade e organização das cadeias poliméricas conferindo um aumento de sua cristalinidade.

Outro parâmetro que pode explicar este comportamento é a umidade dos filmes. Pelo fato do glicerol apresentar natureza mais hidrofílica que a triacetina, já era esperado que o filme contendo GLI ($9,65 \pm 1,83\%$) apresentasse maior umidade do que o filme de TRI ($5,81 \pm 1,99\%$). A molécula de água atua como um plastificante na rede polimérica do filme reduzindo a Tg e consequentemente aumentando sua cristalinidade, segundo KOSKOSZKA et al. (2010).

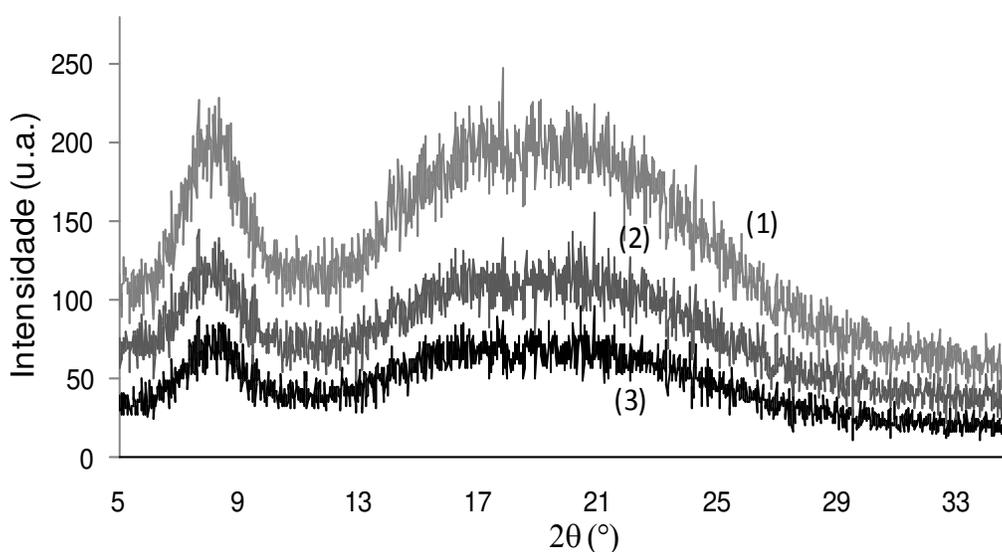


Figura 18. Caracterização microestrutural por difração de raio-X dos filmes coacervados de GEL/PEC, sendo que em: (1) 10% de glicerol, (2) 10% de triacetina e (3) sem plastificante.

4.3.4.6 Espectrometria de Infravermelho (FTIR)

A adição de plastificante (triacetina e glicerol) nos filmes coacervados não provocou alterações no comportamento dos espectros de FTIR, como pode ser visualizado na Figura 19. Os picos de amida-I, II e III (1633, 1538 e 1450 cm^{-1} , respectivamente) foram observados em todos filmes e o pico situado na região 1030 cm^{-1} pode estar relacionado com as interações entre o grupo hidroxil do glicerol e a matriz polimérica do filme, de acordo com BERGO & SOBRAL (2007). HOQUE, BENJAKUL & PRODPRAN (2011) observaram resultados similares para os filmes de gelatina de pele de lula adicionados de glicerol. ZIANI et al. (2008) observaram que a similaridade entre os espectros FTIR pode ser indicativo de que novas ligações não foram geradas entre a matriz polimérica e os plastificantes.

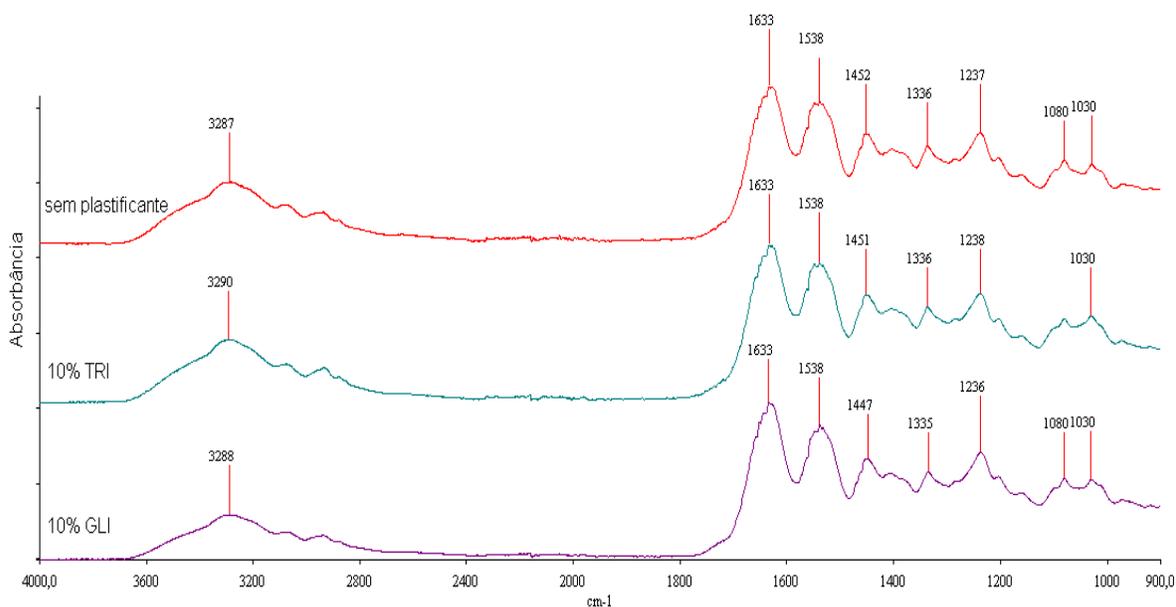


Figura 19. Espectrometria de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) do filme coacervado de GEL/PEC sem plastificante (0%) e contendo 10% de triacetina (TRI) e 10% de glicerol (GLI).

4.4 Conclusões

Uma baixa concentração de PEC (5%) na formulação foi o suficiente para interagir eletrostaticamente com a GEL, já que a solução de PEC apresenta alta carga elétrica negativa (ζ potencial zeta = -50mV em pH 5,0), enquanto a GEL encontra-se neutra nesta condição de pH. Por este fato, a melhor condição de pH para realizar a coacervação da GEL e PEC foi em pH ácido, pH_{zeta} ou de coacervação igual a 4,0 (ζ potencial zeta nulo).

A combinação de GEL e PEC pelo método de coacervação foi eficaz, por ter conferido ao filmes boa resistência à: ruptura (TR), permeabilidade ao vapor de água (PVA) e solubilização em água (SOL), em relação aos filmes simples de GEL E PEC e a muitos filmes compostos citado na literatura.

O FTIR foi uma ferramenta útil para identificar que a porção de PEC adicionada ao filme interagiu eletrostaticamente com a GEL, isto foi comprovado pelo desaparecimento do pico do grupo carboxil (1780 cm^{-1} e 1640 cm^{-1}) que foi substituído pelo pico do grupo funcional amida (1630 e 1530 cm^{-1}).

Ao adicionar o plastificante (triacetina e glicerol), o glicerol promoveu melhora efetiva nas propriedades mecânicas dos filmes coacervados, pois as moléculas de GLI incorporaram-se de forma mais eficaz na matriz polimérica do filme coacervado de GEL/PEC do que as moléculas de TRI (que exudaram em concentrações superiores a 15%). Além da boa incorporação, o glicerol atuou melhorando a flexibilidade do filme (10 vezes mais flexíveis em relação ao filme sem plastificante), quando adicionado em concentrações superiores a 20%. Apesar da sua natureza hidrofílica, o GLI não alterou de forma significativa os valores de SOL e de PVA em relação ao filme sem plastificante.

A intensidade do pico da difração de raio-X do filme coacervado com GLI foi mais pronunciado que o filme contendo TRI, o que reflete a melhor incorporação do GLI na matriz polimérica do filme.

4.5 Referências Bibliográficas

AKEN, G. A. V. Polysaccharides in Food Emulsions. In: STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O. & WILLIAMS, P. A. (Eds), **Food Polysaccharides and their Applications**, Taylor & Francis Group, LLC, p.532-536, 2006.

ANDREUCETTI, C.; CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Gelatin-based films containing hydrophobic plasticizers and saponin from *Yucca shidigera* as the surfactant. **Food Research International**, v. 43, n. 6, p. 1710-1718, 2010.

ARVANITOYANNI, I. S. Formation and properties of and gelatin films and coatings. In: GENNADIOS, A. Editors, **Protein-based Films and Coatings** (1nd ed.), Boca Raton, Florida, 2002.

ASTM D 523. Standard test method for specular gloss. Philadelphia: **American Society for testing and Materials**, 1999.

ASTM D 882-95. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting. Philadelphia: **American Society for Testing and materials**, 1995.

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

BÉDIÉ, G. K.; TURGEON, S. L.; MAKHLOUF, J. Formation of native whey protein isolate-low methoxyl pectin complexes as a matrix for hydro-soluble food ingredient entrapment in acidic foods. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 5, p. 836-844, 2008.

BERGO, P.; SOBRAL, P. J. A. Effect of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1285-1289, 2007.

BORAL, S.; BOHIDAR, H. B. Effect of ionic strength on surface –selective patch binding-induced phase separation and coacervation in similarly charged gelatin-agar molecular systems. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, p. 12027-12-35, 2010.

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

CHENG, M.; DENG, J.; YANG, F.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. **Biomaterials**, v. 24, p. 2871-2880, 2003.

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

DEASY, P. Developments in microencapsulation. **Manufacturing Chemist**, v. 55, n. 7, p. 47-48, 1984.

DONHOWE, I. G.; FENNEMA, O. The effects of plasticizers on crystallinity, permeability, and mechanical-properties of methylcellulose films. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 17, n. 4, p. 247-257, 1993.

DUCEL, V.; RICHARD, J.; SAULNIER, P.; POPINEAU, Y.; BOURY, F. Evidence

and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 232, p. 239-247, 2004.

FARRIS, S.; SCHAICH, K. M.; LIU, L.; COOKE, P. H.; PIERGIOVANNI, L.; YAM, K. L. Gelatin-pectin composite films from polyion-complex hydrogels. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 61-70, 2011.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids water vapor permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 29, n. 1, p. 39-50, 1994.

HIGUCHI, T.; AGUIAR, A. Study of permeability to water vapor of fats, waxes, and other enteric coating materials. **Journal of the American Pharmaceutical**, v. 48, n. 10, p. 574-583, 1959.

HOQUE, M. S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Effects of partial hydrolysis and plasticizer content on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 82-90, 2011.

JIANG, M.; LIU, S.; DU, X.; WANG, Y. Physical properties and internal microstructures of films made from catfish skin gelatin and triacetin mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 105-110, 2010.

JO, C.; KANG, H.; LEE, .N Y.; KWON, J.H.; BYUN, M. W. Pectin- and gelatin-based film: effect of gamma irradiation on the mechanical properties and biodegradation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, p. 745-750, 2005.

JONES, O. G.; LESMES, U.; DUBIN, P.; McCLEMENTS, D. J. Effect of polysaccharide charge on formation and properties of biopolymer nanoparticles created by heat treatment of β -lactoglobulin-pectin complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 374-383, 2010.

JOSEPH, I.; VENKATARAM, S. Indomethacin sustained release from alginate-gelatin or pectin-gelatin coacervates. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 126, n. 1-2, p. 161-168, 1995.

KEENAN, T. R. Gelatin. In: WISEMAM, D. M.; KOST, J.; DOMB, A.J. (Eds), **Handbook of Biodegradable Polymers**, CRC Press, 1998.

KOKOSZKA, S.; DEBEAUFORT, F.; HAMBLETON, A.; LENART, A. Protein and glycerol contents affects physic-chemical properties of soy protein isolate-based edible films. *Innovative*. **Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 11, p. 503-510, 2010.

KOŁODZIEJSKA, I.; PIOTROWSKA, B. The water vapor permeability, mechanical properties and solubility of fish gelatin-chitosan films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and plasticized with glycerol. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 295-300, 2007.

LIU, L.; LIU, C-K.; FISHMAN, M. L.; HICKS, K. B. Composite films from pectin and fish skin gelatin or soybean flour protein. **Journal Food Chemistry**, v. 55, p. 2349-2355, 2007.

LOOTENS, D.; CAPEL, F.; DURSND, D.; NICOLAI, T.; BOULENGUER, P.; LANGENDORFF. Influence of pH, Ca concentration, temperature and amidation on the gelation of methoxyl pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 237-244, 2003.

LOPES DA SILVA, J.A.; RAO, M. A. Pectins: structure, functionality, and uses. In: STEPHEN, A. M. AND WILLIAMS, P.A. Editors, **Food polysaccharides and their applications** (2nd ed.), pp. 354–411 Boca Raton, Florida, 2006.

MAFTOONAZAD, N.; RAMASWAMY, H.; MARCOTTE, M. Evaluation of factors affecting barrier, mechanical and optical properties of pectin-based films using response surface methodology. **Journal Food Process Engineering**, v. 30, p. 539-563, 2007.

MALAY, Ö.; BAYRAKTAR, O.; BATIGÜN, A. Complex coacervation of silk fibroin and hyaluronic acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, p. 387-393, 2007.

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

MATIA-MERINO, L.; LAU, K.; DICKINSON, E. Effects of low-methoxyl amidated pectin and ionic calcium on rheology and microstructure of acid-induced sodium caseinate gels. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 2, p. 271-281, 2004.

MCMULLEN, J. N.; NEWTON, D. W.; BECKER, C. H. Pectin gelatin complex coacervates. 1. Determinants of microglobule size morphology and recovery as

water-dispersible powders. **Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 71, n. 6, p. 628-633, 1982.

MOUNSEY, J. S.; O'KENNEDY, B. T.; FENELON, M. A.; BRODKORB, A. The effect of heating on beta-lactoglobulin-chitosan mixtures as influenced by pH and ionic strength. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 1, p. 65-73, 2008.

PIAZZA, L.; DÜRR-AUSTER, N.; GIGLI, J.; WINDHAD, E. J.; FISHER, P. Interfacial rheology of soy proteins- high methoxyl pectin films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2125-2131, 2009.

POPPE, J. Gelatin, In: **Thickening and gelling agents for food**, New York, Ed. Alan Imenson, Blackie Academic & Professional, Cap. 7, p.144-168, 1997.

PLASHCHINA, I. G.; BRAUDO, E. E.; TOLSTOGUZOV, V. B. Circular dichroism studies of pectin solutions. **Carbohydrate Research**, v. 60, p.1–8, 1978.

PLASHCHINA, I. G.; ZHURAVLEVA, I. L.; ANTONOV, Y. A. Phase behavior of gelatin in the presence of pectin in water-acid medium. **Polymer Bulletin**, v. 58, n. 3, p. 587-596, 2007.

RALET, M. C.; DRONNET, V.; BUCHHOLT, H. C.; THIBAUT, J. F. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterization, polyelectrolyte behavior and calcium binding properties. **Carbohydrate Research**, v. 336, n. 2, p. 117-125, 2001.

RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 2, p. 369-375, 2010.

RODRIGUEZ, M.; OSES, J.; ZIANI, K.; MATE, J. I. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. **Food Research International**, v. 39, n. 8, p. 840-846, 2006.

SARAVANAN, M.; RAO, K. P. Pectin-gelatin and alginate-gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 808-816, 2010.

SARAVANAN, M.; KISHORE, G. S.; RAMACHANDRAN, S.; RAO, G. S.; SRIDHAR, S. K. Preparation and characterization of nimesulide microcapsules by gelatin-pectin complex coacervation system. **Indian Drugs**, v. 39, n. 7, p. 368-372, 2002.

SILVA, J. A. L.; RAO, M. A. Pectin: Structure, functionality, and uses. In STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A.; (Ed.), **Food Polysaccharides and their applications** (p. 354-397). Boca Raton, FL: CRC Press., 2006.

SILVA, M. A.; BIERHALZ, A. C. K.; KIECKBUSCH, T. G. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca²⁺ ions: Effect of the plasticizer concentration. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 4, p. 736-742, 2009.

SOARES, R. M. D.; SOLDI, V. The influence of different cross-linking reactions and glycerol addition on thermal and mechanical properties of biodegradable gliadin-based film. **Material Science & Engineering C- Materials for Biological Applications**, v. 30, n. 5, p. 691-698, 2010.

SOTHORNVIT, R.; KROCHATA, J. M. Water vapor permeability and solubility of films from hydrolyzed whey protein. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 4, p. 700-703, 2000.

SURH, J.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by fish gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 5, p. 596-606, 2006.

THOMAZINE, M.; CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. I. A. Physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 3, p. E172-E176, 2005

TOLSTOGUZOV, V. Thermodynamic aspects of biopolymer functionality in biological systems, food, and beverages. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 89-174, 2002.

VRIES, R.; WEINBRECK, F.; KRUIF, C. G. Theory of polyelectrolyte absorption on heterogeneously charged surfaces applied to soluble protein-polyelectrolyte complexes. **Journal of Chemical Physics**, v. 118, n.10, p.4649-4659, 2003.

WANG, Q.; PAGÁN, J.; SHIO, J. Pectin from fruits. In MAZZA, G.; MARGUER, M.

L.; SHI, J. (Ed.), **Functional Foods Biochemical and Processing Aspects**, v. 2, Boca Raton, FL: CRC Press., 2002.

WEINBRECK, F.; MINOR, M.; KRUIF, C. G. Microencapsulation of oils using whey protein/gum Arabic coacervates. **Journal Microencapsulation**, v. 21, n. 6, p. 667-679, 2004.

XU, K.; YAO, P. Stable oil-in-water emulsions prepared from soy protein-dextran conjugates. **Langmuir**, v. 25. N.17, p. 9714-9720, 2009.

YAKIMETS, I.; PAES, S. S.; WELLNER, N.; SMITH, A. C.; WILSON, R. H.; MITCHELL, J. R. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 5, p. 1710-1722, 2007.

YAN, X.; KHOR, E.; LIM, L-Y. ÉC films prepared from chitosan-alginate coacervates. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, n. 7, p.941-946, 2000.

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

YAO, K.; LIU, J.; CHENG, G. X.; DAÍ, X. D.; TU, H. L.; LOPES DA SILVA, J. A. Swelling behavior of pectin/chitosan complex films. **Journal Applied Polymer Science**, v. 60, n. 2, p. 279-283, 1996.

ZIANI, K.; OSES, J.; COMO, V.; MATÉ, J. I. Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films base don chitosan with different degree of deacetylation. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 2159-2165, 2008.

Capítulo 5

Filmes coacervados de gelatina e goma arábica e suas propriedades funcionais.

5 FILMES COACERVADOS DE GELATINA E GOMA ARÁBICA.

Resumo

Filmes compostos de gelatina suína tipo B (GEL) e goma arábica (GAR) foram elaborados pelo método de coacervação. A máxima interação eletrostática entre os biopolímeros foi atingida em valor de pH conhecido como $pH_{\text{coacervação}}$. Neste valor de pH, o ζ -potencial zeta da solução filmogênica da GEL/GAR é igual a zero, devido a neutralização da carga positiva ($-\text{NH}_3^+$) da GEL com a carga negativa ($-\text{COO}^-$) da GAR. Nas proporções estequiométricas 0:1; 1:1; 2:1; 4:1; 6:1; 8:1; 10:1; 20:1 e 1:0 de GEL/GAR foi feita a medida do potencial zeta do pH 3,0 até o pH 5,0, para definir a condição de $pH_{\text{coacervação}}$ para a produção dos filmes de GEL/GAR. Os filmes coacervados de GEL/GAR foram selecionados pelo aspecto visual (homogeneos, uniformes, coesos e de fácil remoção da placa de secagem), em seguida todos os filmes foram caracterizados fisicamente pelas suas propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água, solubilidade em água, umidade e opacidade. Análises complementares de difração de raio-X (DRX), espectroscopia de infravermelho (FTIR) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram realizadas em alguns dos filmes. Pela análise do potencial zeta foi definido que o pH ótimo para a coacervação variou de 4,5 a 5,0 nos filmes de GEL/GAR. O filme de GAR (0:1 de GEL/GAR) foi descartado devido sua fragilidade mecânica, já as demais formulações produziram filmes coesos, uniformes e homogêneos. Filmes coacervados com alto teor de GEL mostraram-se mais resistentes e flexíveis e menos solúveis em água do que as formulações com menor teor de GEL (1:1 e 2:1 de GEL/GAR). As análises de FTIR, DSC e DRX confirmam que os filmes coacervados contendo 10:1 de GEL/GAR apresentaram maior interação eletrostática entre a GEL e GAR do que a proporção 1:1 de GEL/GAR. O método de coacervação formou filmes mais resistentes do que os filmes não coacervados e para as formulações 10:1 e 8:1 de GEL/GAR verificou-se menor valor de SOL e de PVA para os filmes

coacervados em relação aos filmes não coacervados. O aumento da concentração do material polimérico de 2 para 6% reduziu o tempo de secagem do filme de GEL/GAR (10:1) pela metade sem alterar suas propriedades funcionais. A triacetina utilizada como plastificante apresentou menor incorporação do que o glicerol, pois acima de 10g de plastificante/100g de material polimérica ocorre a exudação das moléculas de triacetina na superfície do filme. As análises de FTIR e DRX confirmam a maior interação do glicerol na matriz polimérica do filme. O glicerol aumentou a ELO dos filmes, nas concentrações de 10 e de 30g de plastificante/ 100g de material polimérico, reduziu a PVA dos filmes contendo altas concentrações de plastificante (exceto em 30%) e não alterou a Op dos filmes, em relação ao filme controle. Os dois plastificantes conferiram menor resistência mecânica e maior solubilidade em água ao filme. No entanto, a triacetina não conferiu flexibilidade, aumentou a permeabilidade ao vapor de água e opacidade dos filmes coacervados em relação ao filme controle.

Palavra-chave: biodegradable films, coacervation, gelatin-arabic gum complexes, plasticization.

5.1 Introdução

Filmes biodegradáveis formados a partir da mistura de proteínas e polissacarídeos são sistemas em potencial no controle da transferência do vapor de água do alimento para o meio ou do meio para o alimento, além de proporcionar maior resistência mecânica (PIAZZA et al., 2009). Essa mistura permite uma combinação favorável das propriedades dos diferentes polímeros, que podem ser melhores quando utilizados conjuntamente (ROGOVINA, 1998).

A aplicação de filmes compostos de proteínas e de polissacarídeos esta ligada às limitações nas propriedades funcionais dos biopolímeros (baixa barreira a gases e ao vapor de água e propriedades mecânicas) e ao grau de miscibilidade ou compatibilidade dos seus componentes. O ganho por novas propriedades dependerá do grau de compatibilidade ou miscibilidade entre os biopolímeros utilizados (BASAVARAJU, DAMAPPA & RAI, 2006).

Segundo MATALANIS et al. (2010) a interação entre as proteínas e os polissacarídeos pode ocorrer através de dois mecanismos, o segregativo (incompatibilidade) ou o agregativo (complexação). A natureza destas interações dependem da característica do biopolímero (exemplo, densidade de carga, tipo e distribuição do grupo reativo e tamanho), concentração do biopolímero, razão do biopolímero e condição do meio (pH, temperatura, força iônica) (LIU, LOW & NICKERSON, 2009). Em condições que favoreçam as interações associativas como a formação do complexo coacervado, deverá ocorrer à redução da repulsão eletrostática entre as cargas dos biopolímeros, e como resultado, os complexos solúveis crescem ambos em tamanho e número; acentuando assim a turbidez da solução. Depois deste estágio, a saturação das ligações entre as cargas opostas inicia-se a separação de fase e a formação do coacervado (GUZEY & McCLEMENTS, 2006).

O ajuste de pH pode conferir ao filme condição de grande compatibilidade entre os biopolímeros através da formação do complexo coacervado. O estudo do pH de coacervação ocorre em uma faixa muito estreita entre o pKa do grupo reativo do polissacarídeo e o ponto isoelétrico (pI) da proteína (LIU et al. 2010; WEINBRECK et al. 2003; DUCEL et al. 2004). Na condição ótima de pH para o sistema coacervado, definido como pH de coacervação, ocorre a máxima interação eletrostática atrativa entre as cargas opostas dos biopolímeros. Neste valor de pH, a carga elétrica positiva de um biopolímero (em geral da proteína) e a carga elétrica do outro (em geral do polissacarídeo) encontram-se na mesma intensidade e interagem entre si, neutralizando as cargas em solução (ζ -potencial zeta igual a zero).

De acordo com SARAVANAN & RAO (2010) o processo de coacervação pode melhorar a estabilidade do complexo em água, como foi verificado em microcápsulas de gelatina e alginato. Esta propriedade pode ser repassada das microcápsulas para os filmes, onde filmes de alginato e quitosana apresentaram alta insolubilidade em água, segundo YAN, KHOR & LIM (2000). O método de coacervação nos filmes ainda pode promover a redução do grau de inchamento (YAO et al. 1996) e melhora na resistência mecânica (FARRIS et al. 2011). Entretanto, existem poucos estudos avaliando as propriedades funcionais dos filmes coacervados de gelatina-goma arábica (PEKERBASARA, ÖVEZ & BALCIOGLU, 1993; NIXON & WONG, 1989).

O complexo gelatina (GEL) e goma arábica (GAR) é um dos melhores sistemas para o estudo da coacervação, devido à abundância e biodegradabilidade desses biopolímeros. Além da característica intrínseca de cada polímero, a GEL possui caráter anfótero o que possibilita a variação da carga da mesma em uma ampla faixa de pH, o que facilita a obtenção de complexos coacervados (MAYYA; BHATTACHARYYA; ARGILLIER, 2003; XING, CHENG, YI & MA, 2005).

Por outro lado, a GAR apresenta baixa viscosidade proporcionando maior interação entre os biopolímeros (MAYYA; BHATTACHARYYA & ARGILLIER, 2003 e RABISKOVA et al. 1994). Este biopolímero é composto por três frações distintas com diferentes conteúdos de proteínas e diferentes massas moleculares, a fração arabinogalactana (é pobre em proteína) e representa 80-90% da fração total da goma, arabinogalactana-proteína (contém proteína-polissacarídeos) 20-10% e a fração glicopeptídica (pobre em polissacarídeos) representa 2-4% do peso total da goma (ANDERSON; BRIDGEMAN & DEPINTO, 1984). Em sua molécula o ácido glucurônico é responsável por toda carga negativa da goma arábica em ambos pHs ácido e neutro (LIZ et al., 2006). Em pHs extremamente ácido (pH < 2,2) a dissociação do grupo carboxílico é reduzida podendo ocorrer neutralização das cargas da goma (YE; FLANAGAN & SINGH, 2006).

A característica anfóterica ou polieletrólítica da gelatina confere a cadeia características de carga elétrica positiva e/ou negativa. O sinal e a densidade de carga elétrica esta diretamente relacionada com o valor de pH em relação ao valor do ponto isoelétrico – pI da GEL (4,8-5,2). Portanto, em pH igual ao pI ocorre a eletroneutralidade das cargas da GEL, mas se o valor do pH for abaixo ao pI, a proteína apresenta carga elétrica positiva e em níveis acima do pI a carga encontra-se negativa.

A GAR e GEL formam complexos coacervados sob condição acida, entre o pH de 3,0 a 5,0, onde o pKa da GAR (2,2) encontra-se acima e o pI (5,2) abaixo desta faixa de pH. Portanto, nestas condições o grupamento amina da GEL ($-\text{NH}_4^+$) encontra-se protonada ou carregada positivamente e o grupamento carboxila da goma arábica ($-\text{COO}^-$) encontra-se desprotonado ou carregado negativamente. Por todas estas características, o par gelatina e goma arábica pode ser caracterizado como excelente alternativa de biopolímeros formadores de filmes coacervados.

O objetivo deste trabalho foi estudar o método de coacervação nas propriedades funcionais dos filmes de gelatina e goma arábica.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Material

Gelatina tipo B (suína, 40 mesh, marca Gelita do Brasil, Cotia - São Paulo) e Goma Arábica (CNI-Rouen - lote IRX49345, France). Ácido clorídrico (Merck - São Paulo, Brasil) foi usado como agente ajustador de pH na elaboração dos filmes coacervados. Como plastificantes foram utilizados a triacetina (cedida pela

Rhodia, Brasil) e o glicerol (Merck - São Paulo, Brasil). Ácido Clorídrico (Merck – São Paulo, Brasil) foi utilizado como agente ajustador de pH.

5.2.2 Preparação dos filmes

A solução de Goma Arábica - GAR (2%) foi preparada dispersando 2g do polímero em 100mL de água deionizada em banho maria por 30min/50⁰C sob agitação magnética. A solução de Gelatina tipo B - GEL (2%) foi solubilizada de acordo com a metodologia descrita por CARVALHO & GROSSO (2004), onde 2g de gelatina tipo B foram hidratadas em 100mL de água deionizada por 30min, em temperatura ambiente e dissolvida por agitação mecânica (60°C) durante 15 minutos. Os filmes de GEL/GAR foram preparados volumetricamente mantendo-se o volume final de 100ml para cada formulação, de acordo com a Tabela 13. A homogeneização dos biopolímeros foi realizada sob agitação magnética a 60°C por 10 min. Após a homogeneização foi realizados o ajuste de pH com HCl no valor determinado pelo ζ -potencial zeta ou pH_{zeta} , conforme descrito no item .

A proporção estequiométrica e a concentração de material polimérico foram definidas de acordo com suas propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água e de solubilidade em água, descritas no item 2.7.

Em relação à proporção estequiométrica de GEL/QUI, definiu-se o melhor filme na condição de coacervação (pH_{zeta}); neste foi realizado um estudo de concentração de material polimérico (4, 6, 8 e 10 g de biopolímero 100 g⁻¹ de solução filmogênica). Estes filmes foram elaborados seguindo o mesmo protocolo de elaboração descrito anteriormente e posteriormente foram caracterizados e selecionados.

A adição do agente plastificante (2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25 e 30 g plastificante 100 g⁻¹ de material polimérico) foi realizada para a melhor concentração de material polimérico, ou seja, filmes que apresentaram melhores

propriedades funcionais com maior concentração polimérica. A formulação contendo o plastificante (Triacetina ou Glicerol) foi submetida à agitação magnética a $50 \pm 5^\circ\text{C}$ por 10 min e posteriormente foi feito o ajuste de pH (pH_{zeta}).

Para o controle da espessura do filme um alíquota de 20-25mL da solução filmogênica foi dispersa na placa de plaxglass (Pleion) de 15 cm de diâmetro e mantida a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e $31 \pm 5\%$ de umidade relativa (URE) por 24h para secagem. Depois desse período, os filmes foram removidos e condicionados em dessecadores ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $52 \pm 5\%$ URE, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) durante 7 dias e em seguida caracterizados.

Tabela 13. Composição dos filmes de GEL/GAR.

GEL/GAR	Gelatina (%)	Goma (%)
1:0	100	0
20:1	95	5
10:1	91	9
8:1	89	11
6:1	86	14
4:1	80	20
2:1	66	34
1:1	50	50
0:1	0	100

5.2.3 Potencial zeta

As soluções filmogênicas foram diluídas com água deionizada mantendo-se concentração final de 0,4g de polímero/100mL de solução, este sistema foi

colocado em um Becker encamisado para controle da temperatura ($50\pm 5^\circ\text{C}$) e submetido à agitação magnética por 10 minutos. Posteriormente foi realizada a titulação da solução filmogênica com HCl varrendo o pH de 3,0 a 5,0, com auxílio de um pHmetro (DIGMED, marca). O potencial zeta foi medido pelo equipamento modelo Malvern Zetamaster Zeta-M (Malvern Instruments Ltda).

Foi construída uma curva da medida do potencial zeta (eixo y) em função do pH (eixo x) para cada formulação, pode-se calcular o valor de pH onde ocorre a eletroneutralidade do sistema (ζ -potencial zeta igual a zero) intitulado como pH_{zeta} . Este valor de pH foi determinado pela intersecção da curva no eixo x para $y = 0$.

5.2.4 Aspecto Visual e Espessura

Inicialmente, os filmes foram caracterizados pela observação visual e tátil, visando utilizar apenas os filmes homogêneos (ausência de partículas insolúveis e coloração uniforme), contínuos (sem a presença de rupturas ou zonas quebradiças) e resistentes ao manuseio (facilidade de desprendimento dos filmes do suporte). Os filmes que não apresentaram tais características foram descartados. A espessura do filme foi determinada pela média aritmética de 10 medidas aleatórias sobre a área do filme, utilizando-se um micrômetro digital Modelo MDC-25M, Mitutoyo, MFG (Tóquio, Japão) com 0,001 mm de resolução.

5.2.5 Opacidade

Opacidade (Op) dos filmes foi determinada utilizando-se colorímetro Hunterlab (Colorquest II, Reston, VA, USA) pelo método da ASTM D523 (ASTM, 1999). As determinações foram feitas em triplicata após a calibração do colorímetro com padrão branco e padrão preto, onde $Op = (Opb/Opp) \times 100$, sendo

O_p porcentagem de opacidade do filme, O_{pb} opacidade do filme com o fundo branco e O_{pp} opacidade do filme com o fundo preto.

5.2.6 Propriedades Mecânicas

As medidas de tensão na ruptura (TR) e de alongação na ruptura (E) foram realizadas em texturômetro TA-XT2 (Stable Micro System, Surrey, UK), operando de acordo com o método ASTM D 882 (ASTM, 1995). Amostras de 10 cm de comprimento X 25 mm de largura foram utilizadas com 8 repetições e fixadas a separação inicial do probe (50 mm), e a velocidade do teste (1 mm/s).

5.2.7 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA, g.mm/m².h.kPa) foi determinada pelo método E-96-95 da ASTM (ASTM, 1995). As amostras dos filmes foram cortadas na forma de discos e lacradas sobre células de permeação feitas de acrílico, contendo cloreto de cálcio. As células de permeação foram acondicionadas em dessecadores contendo solução salina saturada de cloreto de sódio 75% URE e mantidas a 25±2°C. O vapor de água transferido através do filme foi determinado pelo ganho de massa no sistema, referente a cinco medidas para cada amostra durante 48 horas. Os dados foram registrados em um gráfico de ganho de peso versus tempo. O coeficiente da reta, obtido por regressão linear, foi determinado e a PVA foi calculada por $PVA = gx/t.A.Po. (RH_1 - RH_2)$, onde g/t é o coeficiente da reta (g/h), x é a espessura média do material (mm), A é a área de permeação (m²), Po é a pressão parcial de vapor d'água a 25°C (kPa) e (RH₁-RH₂) é o gradiente de umidade relativa entre o meio contendo cloreto de cálcio anidro

(0% UR) e a solução de NaCl saturada (UR 75%). Foram feitas triplicatas para cada filme.

5.2.8 Solubilidade em água

A solubilidade em água dos filmes foi feita de acordo com GONTARD & GUILBERT (1994). Discos de filme com 2cm de diâmetro (m_i) foram pesados () e imersos em um béquer contendo 50 mL de água deionizada, mantidos sob lenta agitação mecânica por um período de 24h, a temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$). Após este período, as amostras remanescentes foram retiradas da solução e secas em estufa com circulação de ar (105°C por 24 h) para determinação da massa seca final da amostra (m_f). Todas as determinações foram realizadas em triplicatas. A solubilidade em água (%) foi calculada de acordo com a equação demonstrada abaixo:

$$\% \text{SOL} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \cdot 100$$

5.2.9 Difração de Raio-X

Os filmes de GEL/QUI foram analisados utilizando um difratômetro de raio-X (Rigaku D, Max, Tokyo, Japan) com radiação de Cu K α na voltagem de 30kV e 30mA. As amostras foram submetidos a uma velocidade de varredura de 2°min^{-1} entre $2\theta = 5-35^\circ$.

5.2.10 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

O espectro de infravermelho com transformada de Fourier foi realizado de acordo com a metodologia descrita por VICENTINI (2003), utilizando-se um espectômetro IR Prestige-2 Shimadzu (Kioto, Japão). Para cada filme, efetuou-se 10 varreduras em um intervalo espectral de 400-4000 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

5.2.11 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As temperaturas de transição vítrea foram determinadas por análise calorimétrica de varredura utilizando-se um DSC 882e (TA Instruments, Mettler Toledo, Ohio, EUA). As amostras (5 $\text{mg}\pm 0,0001\text{g}$) foram pesadas em uma microbalança (Boeco CE 03 0111, Alemanha) e condicionadas em cápsulas herméticas de alumínio em dessecadores contendo sílica gel por 7 dias (25 $\pm 2^\circ\text{C}$). O equipamento foi calibrado com indium. As amostras condicionadas foram aquecidas a 10 $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, entre 30 e 250 $^\circ\text{C}$ em ambiente inerte (100 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de N_2) e como referência foi utilizada uma cápsula vazia. A temperatura de transição vítrea (T_g) e a entalpia de fusão (ΔH) foram calculados utilizando o *software* Universal Analysis V3.9A (Ta Instruments Thermal Analysis, Ohio, EUA).

5.2.12 Análise Estatística

O programa SAS foi utilizado para calcular as análises de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para avaliar diferenças entre as médias no intervalo de 95% de confiança.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Potencial Zeta

Na solução filmogênica de gelatina (GEL) e goma arábica (GAR) foi realizada a medida de ζ -potencial zeta no intervalo de pH de 3,0 a 5,5 conforme apresentado na Figura 20.

A gelatina apresenta carga elétrica zero, quando o valor do pH é igual ao seu ponto isoelétrico (pI), para a gelatina tipo B este valor varia de 4,8-5,2 (POPPE, 1997). Portanto, a gelatina encontra-se carregada negativamente em pH maior do que pI (desprotonação do grupo carboxila, $-\text{COO}^-$) e positivamente em pH menor do que pI (protonação do grupo amina, $-\text{NH}_4^+$). Por outro lado, a goma arábica apresenta carga negativa, onde sua intensidade varia de acordo com o valor do pH, quando o valor do pH se aproxima do ponto de dissociação da GAR (pKa em torno de 2,2) ocorre uma redução drástica da dissociação do grupo carboxila e conseqüentemente diminui a intensidade da carga negativa (WEINBRECK, TROMP & KRUIF, 2004). HUANG et al. (2007) relataram a formação do complexo coacervado em condições de pH abaixo do ponto isoelétrico (pI), onde a GEL encontra-se carregada positivamente e a goma arábica negativamente.

O grau de ionização das soluções poliméricas (gelatina e goma arábica) individuais ou combinadas apresentam-se altamente dependente da variação do pH, como pode ser observado na Figura 20. SINGH et al. (2007) relataram a influência da variação do pH na complexação intermolecular e na separação de fase do sistema gelatina-goma arábica. Alguns fatores como o ajuste de pH podem afetar a formação do complexo coacervado de GEL/GAR, bem como a: taxa de adição do agente ajustador de pH (HAUNG et al. 2007) e o tipo de agente ajustador de pH utilizado (DANIELS & MITTERMAIER, 1995).

A GEL no intervalo de pH de 3,0 a 5,5 apresenta-se carregada positivamente e a intensidade da carga aumenta com a redução do pH, atingindo máximo de +30mV em pH 3,0 e mínimo de 0mV em pH igual a 5,0 (pI). No pI, a carga elétrica encontra-se neutra, devido a fraca dissociação entre os grupos carregados na superfície do biopolímero (VRIES, WEINBRECK & KRUIF, 2003). Resultado similar de eletroneutralidade da carga da gelatina foi relatado por SINGH et al. (2007) e GINSEMAN, RICHARDSON & MORRIS (2003).

Na solução de goma arábica verificou-se máxima dissociação (ζ -potencial zeta igual a -30mV) do grupo carboxila nos pHs 4,5 e 5,0, não observou-se alteração nos valores de ζ -potencial zeta acima desses valores. SING et al. (2007) observaram ζ -potencial zeta negativo e constante da goma arábica entre os pHs 4,0 e 10,0. A acidificação da solução de goma reduziu significativamente o ζ -potencial zeta (-10mV em pH igual a 3,0).

Na Figura 20 pode-se observar o efeito do pH no ζ -potencial zeta da solução filmogênica de GEL/GAR, em várias proporções estequiométricas. Este estudo foi realizado para definir a condição ótima de pH ($\text{pH}_{\text{coacervação}}$) para que ocorresse máxima interação eletrostática atrativa entre a carga positiva da gelatina ($-\text{NH}_4^+$) e a carga negativa da goma arábica ($-\text{COO}^-$) caracterizada pelo ζ -potencial zeta igual a zero. Para a proporção estequiométrica 1:1 de GEL/GAR o ζ -potencial zeta apresenta-se nulo em pH 4,3 e para a proporção de 2:1 o valor do $\text{pH}_{\text{coacervação}}$ foi de 4,5. Entretanto, para as demais soluções de GEL/GAR (4:1; 6:1; 8:1; 10:1 e 20:1) não se observou alterações no valor do $\text{pH}_{\text{coacervação}}$ (4,9) em função da proporção estequiométrica. Nestas formulações, a proximidade do valor de $\text{pH}_{\text{coacervação}}$ com o valor do pI da gelatina provocou baixa dissociação do grupamento amina da proteína e altamente dissociação do grupamento carboxílico da goma, por isso alta concentração de gelatina foi utilizada para neutralizar o grupo carregado da goma em baixa concentração.

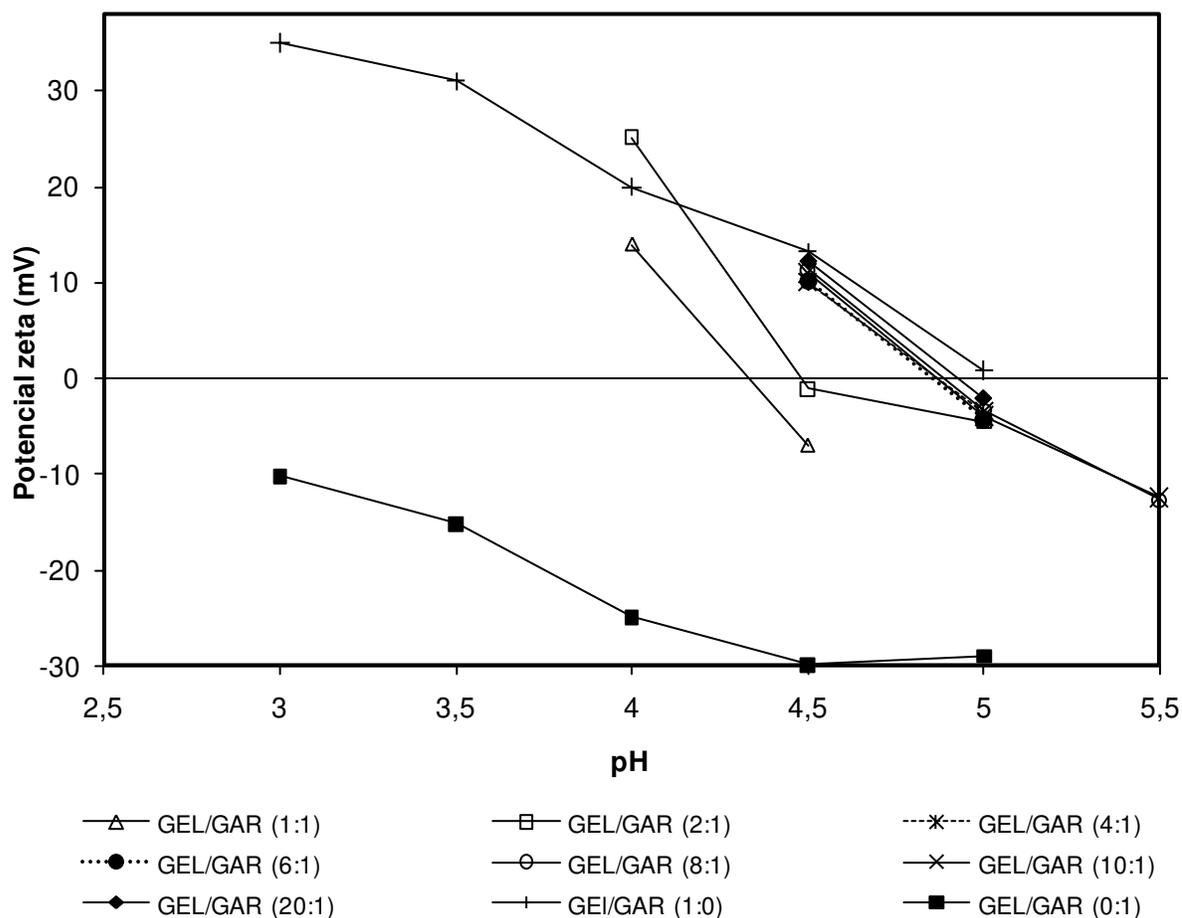


Figura 20. Curva do potencial zeta da solução filmogênica do par polimérico GEL/GAR em função da variação do pH (titulação com HCl) em diferentes proporções estequiométricas.

5.3.2 Efeito da proporção estequiométrica

A elaboração do filme em condições de coacervação favorece o surgimento de novas interações, e com isso, produz um material com novas propriedades. De acordo com WANG et al. (2009) a interação eletrostática entre as moléculas dos biopolímeros pode afetar as propriedades funcionais dos biofilmes. A razão entre

os biopolímeros é um dos parâmetros que afetam a intensidade das interações e o grau de auto agregação durante a complexação, sendo um fator importante no controle do balanço de cargas entre o polissacarídeo e a proteína (LIU, LOW & NICKERSON, 2009).

5.3.2.1 Aspecto Visual e Espessura

Inicialmente, os filmes coacervados ($\text{pH}_{\text{coacervação}}$) e compostos (sem ajuste de $\text{pH} - \text{pH}_{\text{inicial}}$) de gelatina e goma arábica foram avaliados de acordo com seu aspecto visual, facilidade de manuseio e com relação a espessura dos mesmos.

Visualmente, todos os filmes apresentaram-se transparentes, homogêneos com superfícies uniformes (ausência de partículas insolúveis). O filme controle de GEL (100% de GEL) e os filmes de GEL/GAR, nas diversas proporções estequiométricas testadas, mostraram-se compactos e coesos, o que permitiu a fácil remoção da placa, principalmente para os filmes contendo maior teor de GEL, enquanto para o filme contendo maior teor de GAR (1:1 de GEL/GAR) observou-se maior fragilidade durante o manuseio. Dessa forma, o filme controle de GAR (100% de GAR) foi descartado por apresentar-se quebradiço impossibilitando sua remoção da placa.

Foi realizado o controle da espessura dos filmes para que ocorra maior constância dos resultados, sendo assim a média da espessura foi de $0,030 \pm 0,004\text{mm}$ não se observando diferença significativa ($p < 0,05$) entre formulações estudadas.

Posteriormente a caracterização visual, nas formulações selecionadas foi realizada um estudo variando a proporção estequiométrica de GEL e GAR frente suas nas propriedades funcionais (tensão na ruptura - TR, alongação – ELO, permeabilidade ao vapor de água – PVA e solubilidade em água – SOL), como pode ser observado na Tabela 14.

5.3.2.2 Propriedades Mecânicas

Nos filmes coacervados de GEL/GAR não foi observado diferença significativa da TR entre as várias proporções estequiométricas testadas, exceto para a formulação contendo 1:1 de GEL/GAR (Tabela 14). Para esta formulação notou-se redução significativa da TR em relação aos demais filmes (incluindo o filme controle de GEL). Esta diferença na TR poderia estar relacionada a desorganização da estrutura do filme 1:1 de GEL/GAR, onde foi adicionado 50% de GAR. Portanto, a presença de goma arábica poderia estar conferindo ao filme uma estrutura com maior fragilidade mecânica, devido a natureza rígida de sua cadeia polimérica limitando a mobilidade do filme, o que poderia tornar a estrutura do filme mais quebradiça e inflexível. Efeito oposto foi observado em filmes compostos de quitosana e goma guar, onde a TR aumentou com a incorporação de goma guar no filme de quitosana, segundo RAO et al. (2010). Estes autores atribuíram este aumento da TR a formação da ligação intermolecular entre NH_3^+ da cadeia da quitosana e OH^- da goma arábica.

Filmes comerciais sintéticos de polietileno e de polietileno/nylon apresentaram valores de tensão na ruptura de $84,6 \pm 1,4 \text{ KPa}$ e $235,0 \pm 1,0 \text{ KPa}$ com espessura de 0,02 e 0,08 μm , respectivamente (JO et al. 2005). Os resultados de tensão na ruptura dos filmes coacervados de GEL/GAR contendo maior teor de GEL (10:1 e 20:1 de GEL/GAR) mostraram similares ao filme de polietileno, entretanto apresentaram-se menos resistentes do que o filme de polietileno/nylon.

A elongação dos filmes não apresentou alteração significativa entre as formulações contendo 20:1; 10:1; 8:1; 6:1 1:0 de GEL/GAR e estes filmes apresentaram maiores valores de ELO do que os filmes nas proporções 4:1; 2:1 e 1:1 de GEL/GAR. Isto pode ser explicado pelo alto teor de GAR presentes nas formulações 4:1; 2:1 e 1:1 (compostas por 20, 34 e 50% de GAR, respectivamente) em relação às outras formulações.

A alongação do filme de polietileno e do polietileno/nylon foi de $11,6 \pm 2,4\%$ e $18,0 \pm 1,9\%$, respectivamente (JO et al. 2005). Ao comparar os valores de ELO dos filmes coacervados com os filmes sintéticos pode-se constatar a superioridade dos filmes sintéticos frente à flexibilidade. Estes baixos valores de ELO podem ser melhorados com adição de um agente plastificante compatível ao sistema coacervado GEL/GAR.

WANG et al. (2007) elaboraram filmes contendo diferentes combinações de proteínas e polissacarídeos. Em geral, estes autores verificaram que filmes a base de proteína apresentavam menor TR ao serem comparados com os filmes a base de polissacarídeos. Efeito oposto foi observado para a ELO, onde os filmes proteicos mostraram-se mais flexíveis.

5.3.2.3 Solubilidade em água

Filme controle de GEL (1:0 de GEL/GAR) apresentou 100% de solubilidade em água (SOL). Ao incorporar GAR no sistema, observou-se redução significativa da solubilidade em água nos filmes coacervados de GEL/GAR, dependendo da relação estequiométrica utilizada. O maior valor de SOL foi verificado na formulação 1:1 de GEL/GAR (maior teor de GAR) e o menor valor de SOL para 10:1 de GEL/GAR (menor teor de GAR), em relação aos demais filmes testados (Tabela 14).

Uma hipótese que explicaria a menor SOL esta relacionada à condição de pH da solução filmogênica utilizada. Como o filme coacervado de GEL/GAR (10:1) foi elaborado em pH ($\text{pH}_{\text{coacervação}}$ 4,9) próximo ao pl da GEL (5,2), nesta condição de pH a proteína apresenta baixa solubilidade em água, devido a carga elétrica neutra na superfície da proteína (ζ -potencial zeta igual a zero) (LIU & NICKERSON, 2009). Efeitos antagônicos podem promover maior solubilidade dos biopolímeros, segundo SCHMITT et al. (1998) afirmaram que a alta densidade de

carga elétrica entre os biopolímeros e a baixa hidrofobicidade favorecem a solubilidade dos biopolímeros.

Complexos de isolado protéico de ervilha e goma arábica reduziram a solubilidade da proteína em 60% quando elaboradas em condição de coacervação (LIU et al. 2009). Biopolímeros formam complexos insolúveis em água, através da neutralização das cargas do sistema pelo método de coacervação (SCHIMITT et al. 2007).

5.3.2.4 Permeabilidade em água

A adição de goma arábica ao filme aumentou significativamente a transferência ao vapor de água ao se comparar com filme 1:0 de GEL/GAR (filme controle – sem adição de GAR), em todas as proporções estudadas (Tabela 14). Este comportamento pode ser explicado por dois fenômenos, primeiramente, a natureza hidrofílica da goma facilitando a interação entre as moléculas de água e os grupos polares presentes em sua estrutura. Em segundo lugar, a adição da goma pode ter perturbado a organização do sistema protéico gerando um filme com maior porosidade.

Os valores de PVA variaram de $0,25 \pm 0,02$ a $0,20 \pm 0,03$ g.mm/m².h.kPa para os filmes coacervados de GEL/GAR (Tabela 14), mas esta diferença não foi significativa entre as várias proporções estequiométricas estudadas. Isto pode ser justificado pela interação efetiva e pela compatibilidade entre GEL e GAR, que permitiu a formação de um filme coeso mantendo entretanto a porosidade da rede polimérica. Resultados similares foram encontrados em filmes de quitosana e goma guar (RAO et al. 2010) e em filmes de quitosana e alginato (YAN, KHOR & LIM, 2000).

Os filmes coacervados de GEL/GAR mostraram-se mais resistentes a transferência de vapor de água do que o filme de celofane ($0,30$ g.mm/m².h.kPa) e

menos resistentes que o polietileno de baixa e alta densidade ($3,33 \times 10^{-3}$ e $8,33 \times 10^{-4}$ g.mm/m².h.kPa, respectivamente) (ANDREUCETTI, CARVALHO & GROSSO, 2009). Ao comparar os resultados de PVA dos filmes coacervados com outros biofilmes encontrados na literatura pode-se verificar resultados similares ou inferiores de PVA. Por exemplo, filmes polieletrólitos de quitosana e alginato quando elaborados em meio com HCl apresentaram PVA de 0,10 g.mm/m².h.kPa (YAN, KHOR & LIM, 2000) e filmes compostos de gelatina bovina e quitosana e goma guar apresentaram com PVA de 0,14 g.mm/m².h.kPa (GOMEZ-ESTACA et al. (2011). PEKERBASARA, OVEZ & BALCIOGLU (1993) reticularam o filme coacervado de gelatina e goma arábica com formaldeído e obtiveram PVA de $1,20 \times 10^{-10}$ g/Pa.s.m, enquanto o filme coacervado de GEL/GAR deste estudo apresentou PVA quatro vezes menor ($3,15 \times 10^{-11}$ g/Pa.s.m).

5.3.2.5 Umidade

Na Tabela 14 pode-se observar os valores de umidade (UMI) dos filmes coacervados de GEL/GAR em diferentes proporções estequiométricas dos biopolímeros. Em geral, os valores de UMI não diferem significativamente entre as proporções estequiométricas de GEL/GAR estudadas.

Tabela 14. Efeito da proporção estequiométrica entre os biopolímeros (gelatina - GEL e goma arábica - GAR) nas propriedades funcionais dos filmes coacervados (pH_{zeta}).

GEL/GAR	TR (MPa)*	ELO (%)*	PVA (g.mm/m ² .h.kPa)*	SOL (%)*	UMI (%)*
1:1	64,26±1,56 ^b	2,30±0,31 ^d	0,20±0,03 ^{ab}	54,6±5,2 ^b	16,4±2,0 ^{ab}
2:1	75,65±1,20 ^a	3,26±0,10 ^{bc}	0,22±0,02 ^{ab}	41,9±3,8 ^c	15,6±2,0 ^{ab}
4:1	78,15±2,65 ^a	2,97±0,39 ^{cd}	0,25±0,02 ^a	26,5±2,8 ^{de}	15,2±3,2 ^{ab}
6:1	82,53±2,63 ^a	4,40±0,25 ^a	0,22±0,02 ^{ab}	37,5±3,1 ^c	17,4±0,8 ^a
8:1	77,12±3,09 ^a	4,49±0,27 ^a	0,23±0,02 ^{ab}	35,1±4,8 ^{cd}	16,0±0,2 ^{ab}
10:1	85,40±3,41 ^a	3,89±0,25 ^{ab}	0,25±0,02 ^a	23,4±1,8 ^e	15,5±1,8 ^{ab}
20:1	81,75±7,05 ^a	4,01±0,11 ^{ab}	0,24±0,03 ^a	38,1±3,5 ^c	16,0±1,1 ^{ab}
1:0	84,88±2,23 ^a	3,05±0,33 ^{ab}	0,16±0,006 ^b	100,0±0,0 ^a	13,2±1,7 ^b

TR (tensão na ruptura), ELO (elongação), PVA (permeabilidade ao vapor de água), SOL (solubilidade em água) e UMI (umidade).

*Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: Letras diferentes minúsculas na representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

5.3.2.6 Difração de raio-X

Os resultados da difração de raio-X dos filmes coacervados nas proporções estequiométricas 1:1, 10:1 e 20:1 de GEL/GAR e do filme controle de GEL podem ser visualizados na Figura 21.

Como os filmes controle de GAR foram descartados por sua baixa resistência adotou-se como referência os resultados de COZIC et al. (2009) e de TIWARI (2007). Estes autores verificaram que a GAR apresenta área de cristalinidade na região 2θ 20-30° e pico largo revela a predominância da característica amorfa do material.

Na Figura 21(4) pode-se observar que o filme de GEL apresenta dois picos de difração, sendo um pico agudo em aproximadamente $2\theta=8^\circ$ e o outro pico largo em $2\theta=20^\circ$. O pico agudo está relacionado com o diâmetro da tripla hélice e sua intensidade está associada ao conteúdo de tripla hélice presente no filme de GEL (LIU et al. 2012). O perfil mais largo do que o segundo pico é atribuído a região amorfa do filme de GEL.

Mesmo perfil foi notado para os difratogramas do filme de GEL e dos filmes coacervados de GEL/GAR nas proporções 20:1 (95% de GEL), 10:1 (91% de GEL) e 1:1 (50% de GEL). Os filmes coacervados de GEL/GAR (20:1 e 10:1) apresentaram picos de difração mais intensos e agudos do que o filme de GEL/GAR (1:1), sendo indicativo do aumento da presença de regiões cristalinas no filme. Comportamento similar foi verificado por LI et al. (2011) em membranas de alginato e gelatina. Estes autores observaram elevação gradativa na intensidade do pico de difração à medida que se aumentava o conteúdo de gelatina na formulação, devido às fortes interações eletrostáticas atrativas entre a gelatina e o alginato.

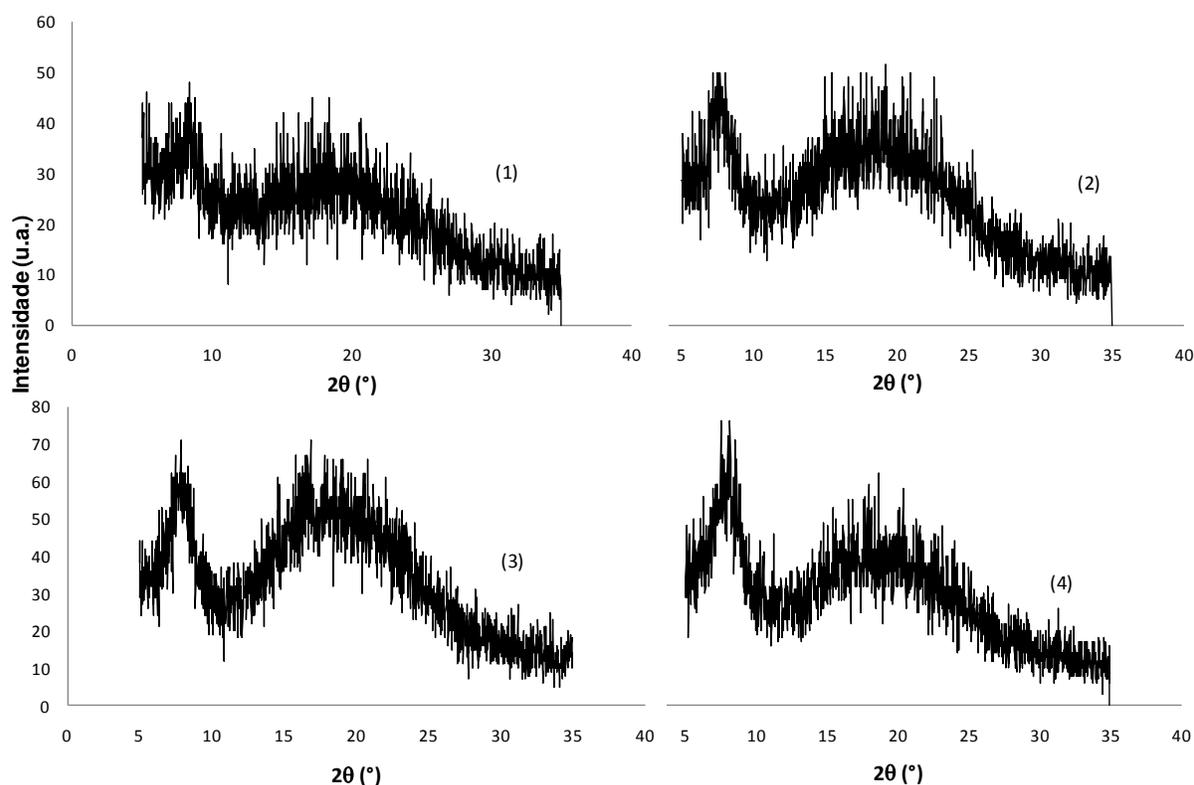


Figura 21. Caracterização microestrutural por difração de raio-X dos filmes coacervados em diferentes proporções estequiométricas de GEL/GAR: (1) 1:1, (2) 10:1, (3) 20:1 e (4) 1:0 – controle gelatina.

5.3.2.7 Calorimetria Diferencial de varredura

A calorimetria diferencial de varredura – DSC (differential scanning calorimeter) é uma técnica muito utilizada para investigar a miscibilidade entre os polímeros. Dessa forma, foi realizado um estudo das propriedades térmicas (temperatura de transição vítrea– T_g e entalpia– ΔH) dos filmes coacervados de GEL/GAR em diferentes proporções estequiométricas, como apresentado na Tabela 15.

O termograma do filme de GEL exibiu dois picos endotérmicos e, conseqüentemente, duas temperaturas de transição vítrea em 98,22°C (T_{g1}) e 202,05°C (T_{g2}). BIGI et al. (1998) também relataram a presença de um pico endotérmico em 91,5°C e associaram a transição helicoidal do filme de gelatina. Vários autores relataram a total desidratação do filme de gelatina na temperatura de transição vítrea em 200-220°C (SOBRAL & HABITANTE, 2001; MARSHALL & PETRIE, 1980; SLADE & LEVINE, 1987). Esta faixa de variação da T_g esta associada a diversos fatores, como a origem da gelatina, a distribuição do peso molecular, os métodos de extração e a dificuldade no controle de umidade das amostras (SOBRAL & HABITANTE, 2001).

Os filmes coacervados de GEL/GAR (1:1 e 10:1) apresentaram o mesmo perfil dos termogramas do filme controle de GEL, com dois picos endotérmicos. Este comportamento parece evidenciar a compatibilidade entre a GAR e a GEL nos filmes coacervados. Entretanto, nos filmes coacervados de GEL/GAR pode-se observar alteração significativa nos valores de T_g em relação ao filme controle, onde o filme elaborado na proporção 10:1 de GEL/GAR apresentou maior valor de T_g nos dois picos endotérmicos em relação ao filme controle, enquanto para o filme 1:1 de GEL/GAR o valor de T_{g1} mostrou-se menor do que para o filme de GEL. Os altos valores de T_g do filme coacervado (10:1 de GEL/GAR) poderiam indicar como ótima essa proporção estequiométrica entre os biopolímeros para que ocorresse maior interação eletrostática em condição de coacervação. LI et al. (2011) observaram comportamento semelhante nos complexos de gelatina e alginato, os altos valores de T_g dos filmes são atribuídos às intensas ligações intermoleculares de hidrogênio e as interações eletrostáticas atrativas.

Tabela 15. Efeito da proporção estequiométrica sobre a temperatura de transição vítrea (T_g) e a entalpia de fusão (ΔH) do filme coacervado de GEL/GAR.

Filme	T_{g1} (°C)	ΔH (J/g)	T_{g2} (°C)	ΔH (J/g)
GEL controle	98,22	317,5	202,05	11,59
GEL/GAR (1:1)	76,99	181,10	223,92	8,63
GEL/GAR (10:1)	109,96	263,90	226,25	5,41

5.3.2.8 FTIR

A espectrometria com transformada de Fourier (FTIR) é uma importante ferramenta utilizada para detectar possíveis alterações na estrutura do complexo, através da formação ou rompimento de ligações ou interações químicas. Portanto, esta técnica foi empregada na tentativa de confirmar a interação eletrostática atrativa entre a GEL (carga positiva) e GAR (carga negativa). O filme controle de GEL e os filmes coacervados (10:1 e 1:1 de GEL/GAR) foram analisados pela FTIR, como pode ser observado na Figura 22.

O espectro de FTIR do filme de GEL apresenta pico de amida-A em 3275 cm^{-1} representando o estiramento NH e de amida-B em 2900 cm^{-1} do estiramento do grupo CH e $-\text{NH}_2$. Entre 1650 e 1200 cm^{-1} foram observados três picos característicos do grupamento amida: amida I em 1630 cm^{-1} referente a estiramento do C=O e das pontes de hidrogênio acoplados ao COO, amida II em 1530 cm^{-1} , que consiste do dobramento do grupo N-H e do estiramento do grupo C-N e amida III, que representa o estiramento vibracional em 1240 cm^{-1} (C–N e N–H), em 1080 cm^{-1} (C–O) e 1030 cm^{-1} (CO–O), segundo YAKIMETS et al. (2005) e STAROSZCZYK et al. (2012).

Como não foi realizada análise de FTIR do filme controle de GAR, a referência utilizada neste trabalho foi a de TIWARI (2007). Este autor registrou

para amostras de GAR uma banda larga e forte em 3418 cm^{-1} devido o estiramento do grupo OH, em 2932 cm^{-1} devido ao estiramento de do grupo CH; em 1720 cm^{-1} devido à presença do grupo carboxílico (COOH); em 1634 cm^{-1} devido ao estiramento do grupo carbonila (C=O); em 1423 cm^{-1} devido ao dobramento do grupo hidroxila (–OH) do ácido carboxílico e em 1254 cm^{-1} devido ao estiramento do C=O do grupo carboxílico.

Ao comparar os filmes coacervados 1:1 de GEL/GAR com o filme de GEL, notou-se redução na intensidade das bandas em 3277 cm^{-1} (referente ao grupo amida da GEL), em 1548 cm^{-1} (referente ao dobramento do grupo N-H e do estiramento do grupo C-N da GEL), em 1451 cm^{-1} (referente ao dobramento do grupo hidroxila do ácido carboxílico) e em 1239 cm^{-1} (referente ao estiramento do grupo C=O), enquanto a banda em 1029 cm^{-1} sofreu um alargamento e aumento em sua intensidade. Entretanto, ao realizar essa mesma comparação com o filme coacervado 10:1 de GEL/GAR pode-se observar aumento na intensidade da banda em $3285, 1539, 1079$ e 1029 cm^{-1} , portanto, este aumento esta intimamente relacionado com o aumento de teor do grupo amida no filme em decorrência da interação eletrostática entre o grupo amina da GEL (NH_4^+) e grupo carboxila da GAR (COO^-).

Estas alterações referem-se à formação de fortes interações intermoleculares, incluindo pontes de hidrogênio e atrações eletrostáticas entre a GEL e a GAR (LI et al., 2011 e DONG, WANG & DU, 2006).

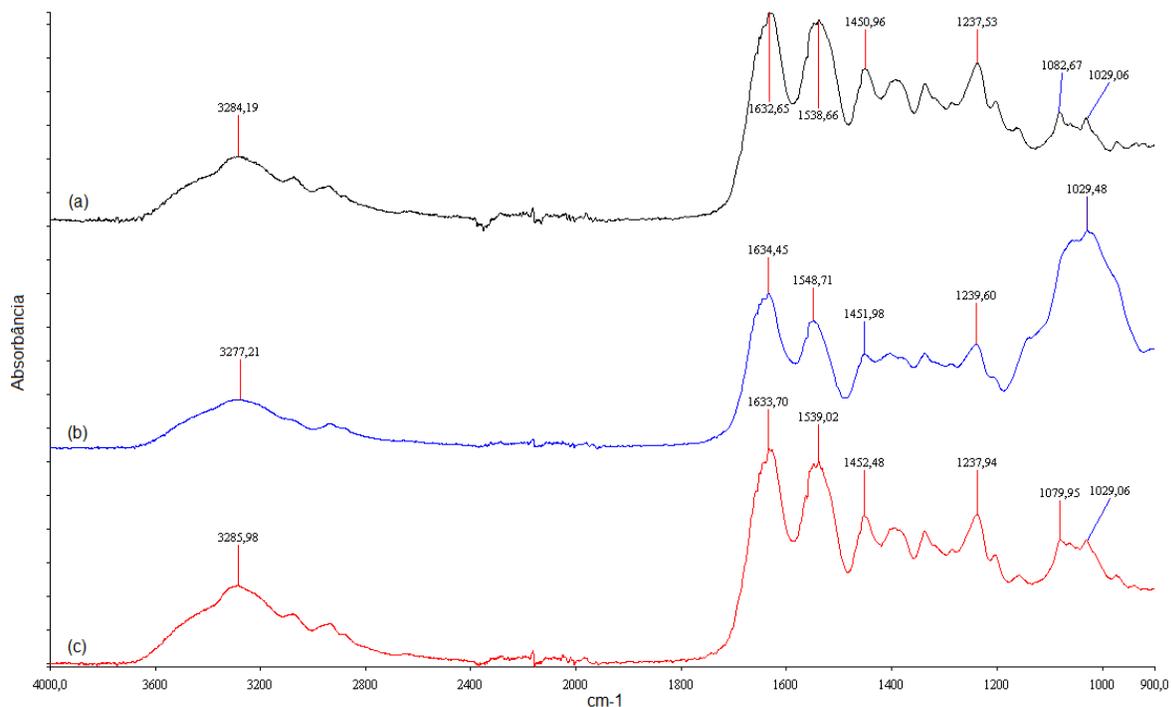


Figura 22. Espectrometria de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) dos filmes simples de gelatina (a), filme coacervados de GEL/GAR nas proporções 1:1 (b) e 10:1 (c).

Todos os testes realizados (tensão na ruptura, alongação, permeabilidade ao valor de água, solubilidade em água, umidade, DSC e difração de raio-X) sugerem que existe uma proporção ótima entre a gelatina e goma arábica para formar um forte complexo coacervado nos filmes de GEL/GAR.

5.3.3 Efeito do método de coacervação nas propriedades funcionais dos filmes de GEL/GAR

Na Figura 23 pode-se visualizar a comparação entre as propriedades funcionais (TR, ELO, PVA e SOL) dos filmes coacervados de GEL/GAR (elaborados em $pH_{\text{coacervação}}$) e dos filmes compostos (elaborados sem ajuste de

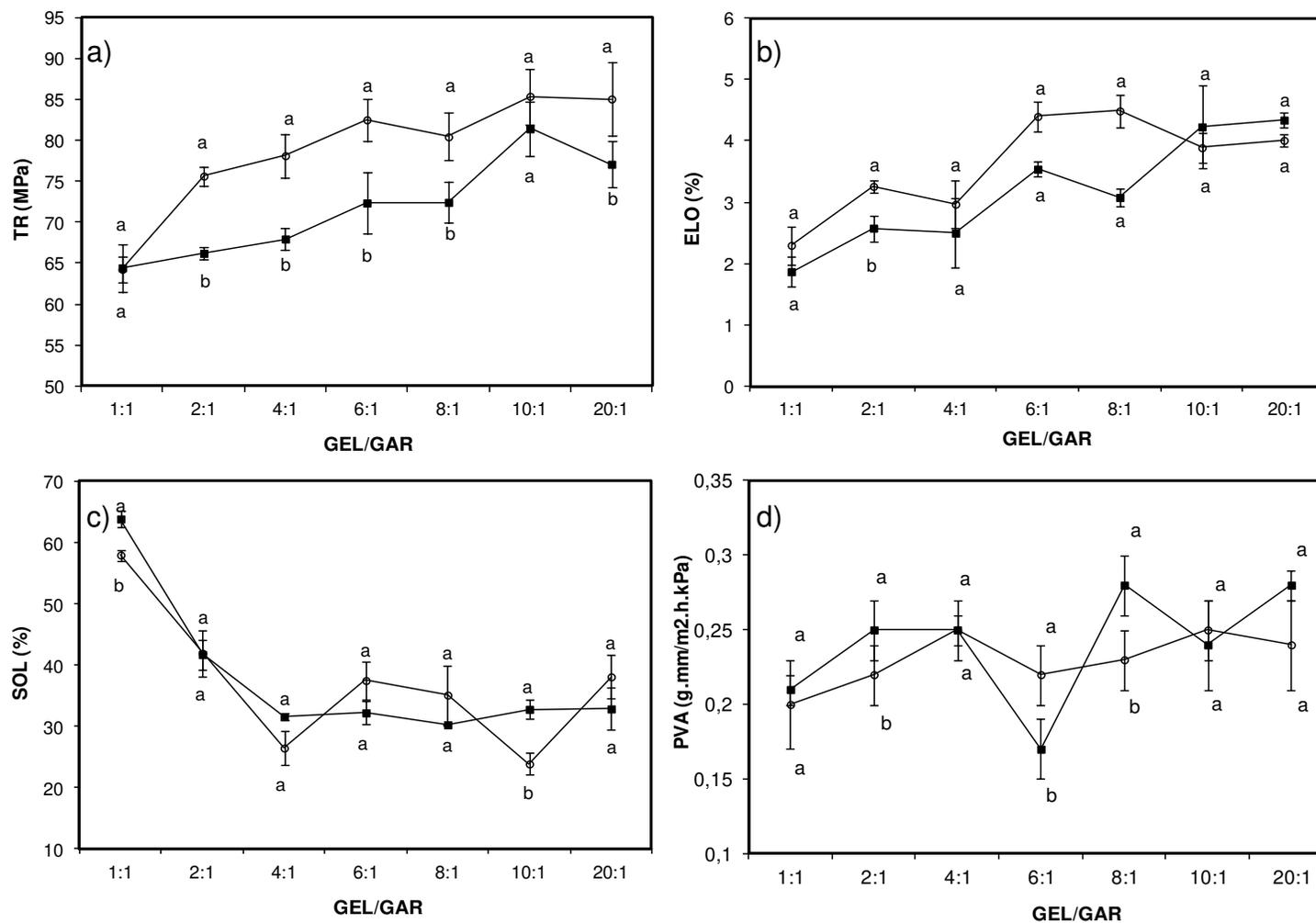
pH – pH_{inicial}) nas mesmas proporções estequiométricas. Os filmes compostos (sem ajuste de pH) foram elaborados com valores de espessura variando entre $0,038 \pm 0,006$ mm não se observando diferença significativa ($p < 0,05$) entre filmes coacervados e compostos.

A obtenção dos filmes através da coacervação atuou melhorando a resistência dos filmes de GEL/GAR. Este comportamento é indicativo de que o método produziu filmes com fortes interações iônicas e ligações mais estáveis do que os filmes não coacervados. Comportamento similar foi verificado por YAN, KHOR & LIM (2000) elaborando filmes complexos de quitosana e alginato em meio ácido (HCl) com melhor resistência do que o filme elaborados sem tratamento (sem a adição do ácido). Estes autores atribuíram esta melhora a complexação entre as cargas opostas dos dois polímeros.

Em algumas proporções estequiométricas testadas podem-se notar diferenças significativas nos parâmetros de TR, ELO, SOL e de PVA quando o filme coacervado foi comparado ao filme composto (sem ajuste de pH). Portanto, o filme coacervado contendo 2:1 de GEL/GAR apresentou maior ELO do que o filme composto (sem ajuste de pH), o filme coacervado de GEL/GAR (10:1) mostrou-se menos solúvel em água e os filmes coacervados (2:1 e 8:1 de GEL/GAR) apresentaram menor PVA do que o filme composto. Entretanto, os filmes coacervados (2:1; 4:1; 6:1; 8:1 e 20:1 de GEL/GAR) foram mais resistentes mecanicamente do que o filme composto.

Em filmes polieletrólitos de quitosana e alginato não foi observado redução na ELO com neutralização das cargas (YAN, KHOR & LIM, 2000). Neste mesmo estudo, também verificou-se a redução significativa da PVA em condição de complexação das cargas em relação ao filme não tratado. Este comportamento provavelmente pode estar relacionado ao rearranjo mais efetivo da cadeia polimérica nos filmes complexados em meio ácido do que nos filmes sem tratamento ácido.

Da mesma forma que foi avaliada a influencia da proporção estequiométrica nas propriedades funcionais dos filmes coacervados (descrito no item 5.3.2), este mesmo estudo foi realizado para os filmes compostos (sem ajuste de pH), como pode ser verificado na Figura 23. Ao comparar influencia da proporção estequiométrica nas diferentes propriedades funcionais (TR, ELO, PVA e SOL) do filme composto verificou-se o mesmo comportamento apresentado para os filmes coacervados.



○ Filme coacervado de GEL/GAR (pH_{coacervação})

■ Filme composto de GEL/GAR (sem ajuste de pH)

Figura 23. Efeito do método de coacervação nas propriedades funcionais nos filmes de GEL/GAR: tensão na ruptura – TR (a), alongação – ELO (b), solubilidade em água – SOL (c) e permeabilidade ao vapor de água – PVA (d).

Análises complementares de difração de raio-X (DRX), calorimetria eletrônica de varredura (DSC) e espectrometria com transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas nos filmes compostos e nos filmes coacervados de GEL/GAR elaborados na proporção estequiométrica 10:1. Esta proporção foi selecionado por apresentar um dos maiores valores de TR, ELO e o menor valor de SOL em relação às demais proporções estudadas.

Na Figura 24 pode-se observar a difração de raio-X para os filmes coacervados e para os compostos (sem ajuste de pH). Para os dois filmes de GEL/GAR constatou-se o mesmo perfil, ou seja, a presença de dois picos de difração em 2θ 8° e 20° , mas nota-se diferença na intensidade dos picos entre os filmes. O aspecto do pico de difração agudo ($2\theta=8^\circ$) e largo ($2\theta=20^\circ$) confirma a natureza semicristalina dos filme coacervado e do filme composto, onde o pico agudo é atribuído a regiões cristalinas e o pico largo a regiões amorfas. No filme coacervado, os dois picos de difração apresentaram menor intensidade do que o filme composto, indicativo do seu aspecto mais amorfo em relação ao filme composto.

CHEN et al. (2003) atribuíram a diminuição na cristalinidade do filme composto de gelatina-quitosana a quebra nas ligações de hidrogênio na molécula da quitosana, o que resulta na estrutura amorfa no complexo polieletrólito. BERGO & SOBRAL (2007) observaram que filmes com características amorfas não apresentaram tendência a recristalização, devido ao aumento na umidade nos mesmos. A redução na cristalinidade do filme coacervado poderia ser explicada pela diferença significativa entre os valores de UMI do filme coacervado ($15,46\pm 1,77\%$) em relação ao filme composto ($10,23\pm 1,64\%$).

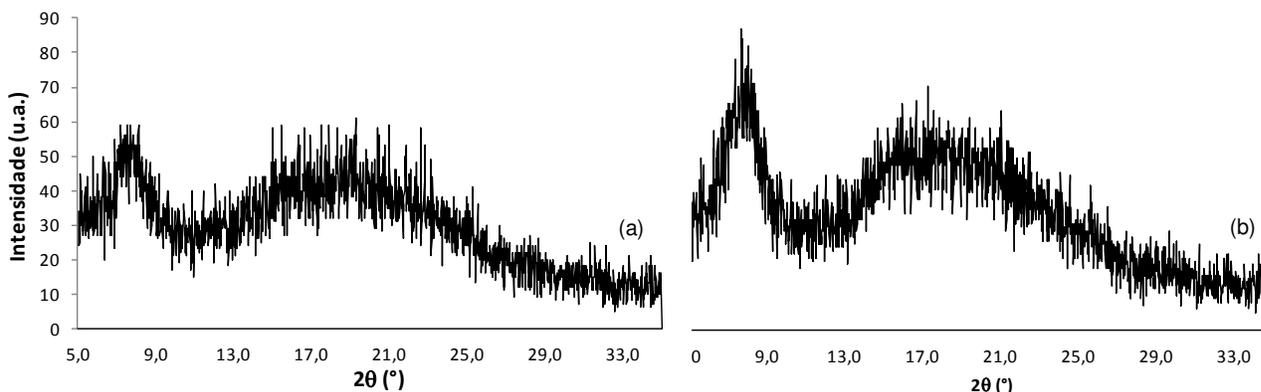


Figura 24. Caracterização microestrutural por difração de raio-X do filme de GEL/GAR (10:1) coacervados (a) e do filme composto de GEL/GAR (10:1) (b).

Filmes coacervados e compostos de GEL/GAR foram avaliados termicamente através da calorimetria diferencial de varredura (DSC), como pode ser visualizado na Tabela 16.

O método de coacervação não afetou o comportamento da curva calorimétrica dos filmes, indicado pela presença de dois picos endotérmicos no filme coacervado e composto. Ao avaliar os dados para o primeiro pico pode-se observar que o filme coacervado apresentou menor valor de Tg_1 e maior valor de ΔH (aproximadamente 12 vezes maior) do que o composto. STAROSZCZYK, PIELICHOWSKA, SZTUKA, STANGRET & KOLODZIEJSKA (2012) relataram que valores mais elevados de entalpia (ΔH) refletem na formação de uma estrutura mais estabilizada através das ligações intramoleculares de hidrogênio e também pela presença de uma camada de água. Estes autores ainda observaram que a diminuição da Tg pode estar relacionada com a formação de novas ligações que alteram a estrutura do filme, o que resulta no aumento do volume livre na matriz polimérica.

No segundo pico verificou-se que o valor da Tg_2 foi muito maior para o filme coacervado do que o composto (sem ajuste de pH), ou seja, o filme coacervado apresentou maior estabilidade térmica ocasionada pela formação de um complexo

forte e bem estruturado quando produzido em condições de coacervação. Comportamento similar foi verificado em complexo de β -lactoglobulina e pectina (JONES, DECKER & McCLEMENTS, 2010). Os autores observaram aumento da temperatura de fusão com a incorporação da pectina na β -lactoglobulina, o que promoveu estabilidade térmica ao complexo através da interação eletrostática entre os grupos carregados positivamente da proteína com os grupos negativos da pectina.

Tabela 16. Efeito do método de coacervação sobre a temperatura de transição vítrea (T_g) e a entalpia de fusão (ΔH) do filme de GEL/GAR.

Filme	T_{g1} (°C)	ΔH_1 (J/g)	T_{g2} (°C)	ΔH_2 (J/g)
GEL/GAR coacervado ($pH_{coacervação}$)	109,96	263,9	226,25	5,40
GEL/GAR composto (sem ajuste de pH)	119,59	21,55	150,20	17,40

Efeito do método de coacervação também foi avaliado por FTIR, mas não foi notada diferença entre o espectro do filme coacervado e do composto e desta forma os resultados não foram apresentados.

5.3.4 Concentração do material polimérico

Todos os estudos realizados neste trabalho foram feitos com filmes contendo 2% de material polimérico, devido o elevado tempo de secagem (30h). Foram também testadas outras concentrações poliméricas (4, 6, 8 e 10g de polímero por 100g de água), na tentativa de reduzir o tempo de secagem e otimizar o processo de produção dos filmes coacervados utilizando-se a relação 10:1 de GEL/GAR (Tabela 17). Em todas as concentrações testadas, os filmes coacervados apresentaram-se com baixa viscosidade, facilitando a dispersão do filme da placa de secagem e promovendo maior controle da espessura ($0,034 \pm$

0,007mm). O tempo de secagem foi reduzido drasticamente de 30h para 8h (filme com 10%), para 12 (filme com 8%), para 15h (filme com 6%) e para 22h (filme com 4%). Após a secagem os filmes mostraram-se transparentes, facilmente manuseáveis, homogêneos e coesos.

Os filmes coacervados contendo 6, 8 e 10% de material polimérico apresentaram pequena redução nos valores de TR em relação aos filmes contendo 2 e 4% de material polimérico (Tabela 17). Apesar das diferenças significativas, os valores de TR apresentaram-se altos para todas as concentrações de material polimérico. O aumento na concentração de material polimérico em solução poderia ter promovido uma saturação de cadeias poliméricas em solução, dificultando a interação entre os grupos laterais das cadeias da GEL e da GAR carregadas positivamente e negativamente, respectivamente. Portanto, o impedimento estérico dentro da matriz do filme pode ter formado uma estrutura desorganizada e com poucas interações. Em geral, os valores de alongação (ELO) não foram afetados pela concentração polimérica dos filmes coacervados de GEL/GAR.

Os filmes elaborados com 2, 4 e 6% de polímeros apresentaram os menores valores de permeabilidade ao vapor de água (PVA) e entre estas formulações não foi observada diferença significativa. Os filmes contendo 8 e 10% de material polimérico apresentaram os maiores valores de PVA. Como observado anteriormente, a alta concentração de polímero na solução filmogênica parece ter produzido a desorganização da estrutura e a redução das interações, e conseqüentemente um aumento no volume livre da matriz facilitando a difusão do vapor de água através do filme.

De acordo com a Tabela 17, pelos resultados de TR e PVA pode-se notar a formação de uma estrutura mais organizada, devido a maior facilidade de interação entre os biopolímeros em filmes com menor concentração polimérica do que os filmes contendo alto teor de polímero.

Em relação à umidade (UMI) não foi observado nenhuma tendência com o aumento da concentração do material polimérico. Geralmente, o alto teor de material polimérico na matriz aumenta a compactação da estrutura do filme e conseqüentemente, reduz o espaço livre onde à água poderia se ligar na rede polimérica.

A concentração de 6% de material polimérico foi eficaz em reduzir o tempo de secagem pela metade do que foi verificado para o filme contendo 2% de material e além desta propriedade sem alterar negativamente as propriedades funcionais dos filmes coacervados de GEL/GAR, ou seja, o aumento da concentração para 6% não alterou significativamente a PVA e nem SOL do filme em relação a concentração de 2%.

Tabela 17. Efeito da concentração de polímero total (C_{pol}) dos filmes coacervados de GEL/GAR (10:1) propriedades funcionais (TR, ELO, PVA, SOL e UMI).

C_{pol}^*	TR (MPa)**	ELO (%)**	PVA (g.mm/m ² .h.kPa)**	SOL (%)**	UMI (%)**
2	85,40±3,41 ^a	3,89±0,25 ^{ab}	0,25±0,02 ^{bc}	23,5±1,8 ^c	15,5±1,8 ^a
4	82,91±0,78 ^a	4,99±0,63 ^a	0,19±0,01 ^c	35,4±3,1 ^a	8,5±0,4 ^b
6	75,09±1,81 ^b	3,93±0,84 ^{ab}	0,21±0,02 ^c	26,2±1,9 ^{bc}	14,7±1,7 ^a
8	77,70±1,03 ^b	3,59±0,17 ^{ab}	0,32±0,04 ^{ab}	32,1±1,8 ^{ab}	14,2±1,8 ^a
10	76,54±1,77 ^b	3,23±0,31 ^b	0,35±0,05 ^a	30,3±1,8 ^{ab}	8,5±0,4 ^b

* Unidade de C_{pol} g de polímero 100g⁻¹ solução;

** Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: Letras diferentes minúsculas representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

5.3.5 Efeito da adição do plastificante no filme coacervado

A escolha do plastificante é muito importante uma vez que afeta fortemente a propriedade físico-química do filme.

Os filmes coacervados contendo 6% de material polimérico de GEL/GAR (10:1) mostraram-se resistentes, porém com baixa flexibilidade. Por esta razão, fez-se necessário a adição de uma agente plastificante (2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25 e 30g de plastificante/100g de material polimérico) na tentativa de aumentar a alongação (ELO) dos filmes.

Para todas as formulações adicionadas de plastificante foi realizado um estudo para manter a espessura ($0,035 \pm 0,006$ mm) sem diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações estudadas anteriormente.

5.3.5.1 Opacidade

A opacidade (Op) é um parâmetro crítico e determinante na escolha do tipo de aplicação para o biofilme biodegradável, particularmente quando o filme for utilizado diretamente na superfície do alimento ou para melhorar a aparência do produto (PARK, WHITESIDE & CHO, 2008).

O efeito da adição do agente plastificante (triacetina ou glicerol) na opacidade (Op) dos filmes coacervados de GEL/GAR pode ser observado na Figura 25. Os filmes elaborados com glicerol, em várias concentrações testadas, apresentaram-se transparentes com Op em torno de $12,74 \pm 0,03\%$. Este valor não diferiu significativamente em relação ao filme controle (sem plastificante). RIVERO, GARCÍA & PINOTTI (2009) também relataram que a Op dos filmes de gelatina e quitosana não sofreu influencia da adição do glicerol.

A adição de triacetina aumentou significativamente a opacidade dos filmes coacervados em relação ao filme controle. MAFTOONAZAD, RAMASWAMY & MARCOTTE (2007) observaram nitidamente que a elevação da Op foi proporcional ao aumento do conteúdo de sorbitol no filme de pectina.

Os filmes contendo triacetina apresentaram maior valor de Op do que os filmes contendo glicerol, em todas as concentrações de plastificante.

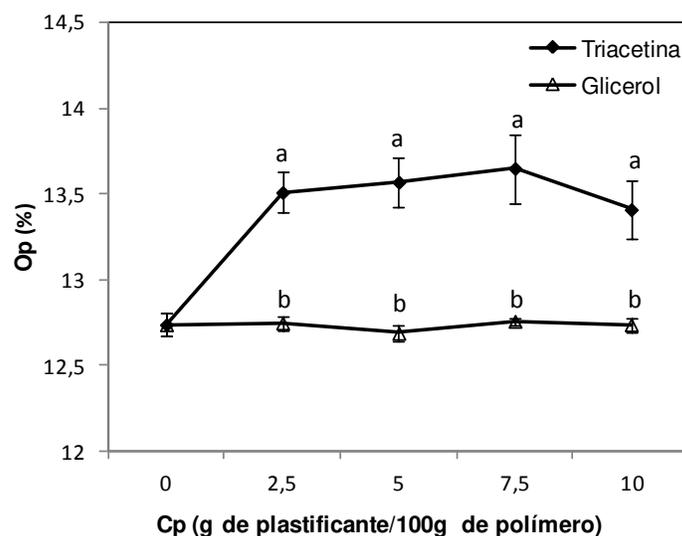


Figura 25. Efeito do tipo de plastificante (glicerol ou triacetina) na opacidade dos filmes coacervados testados em várias concentrações.

5.3.5.2 Propriedades Mecânicas

Na Tabela 18 pode-se observar o efeito do tipo e da concentração de plastificante utilizada e a influencia nas propriedades mecânicas dos filmes coacervados de GEL/GAR (10:1).

A adição da triacetina provocou alterações significativas na estrutura dos filmes coacervados, reduzindo os valores de tensão na ruptura (TR) em relação ao

filme controle (sem plastificante), como observado na Tabela 18. Contudo, a triacetina não afetou significativamente os valores de alongação (ELO) em comparação ao filme controle.

A adição crescente de glicerol nos filmes coacervados (10:1) foi proporcional a redução da TR, mas somente nas concentrações de 10 e de 30% de glicerol foi observado elevação da ELO dos filmes coacervados de GEL/GAR em relação ao filme controle (sem plastificante). Acredita-se que os grupos polares (-OH) ao longo da cadeia do plastificante estabelecem ligações de hidrogênio entre polímero-plastificante substituindo as interações entre o polímero-polímero nos biofilmes, segundo GENNADIOS, WELLER & TESTIN (1993). O glicerol apresentou uma ação efetiva como plastificante em filme composto de gelatina e quitosana, reduzindo a tensão na ruptura em 50% e aumentando a ELO em 50% (RIVERO, GARCÍA & PINOTTI, 2009).

Ao comparar o efeito do tipo de plastificante (triacetina e glicerol) nos valores de TR, pode-se constatar maior resistência dos filmes contendo 2,5 e 5 % de triacetina do que os filmes contendo glicerol, nas mesmas concentrações. Ao prosseguir com esta comparação para os valores de ELO, pode-se constatar que na concentração de 10% de plastificante, o filme contendo glicerol foi mais flexível do que o filme com triacetina. Isto pode ser explicado pela diferença na massa molar dos plastificantes, o glicerol ($C_3H_8O_3$ – 92,08 g/mol) por apresentar menor massa molar do que a triacetina ($C_9H_{14}O_6$ – 218,21g/mol) pode inserir com mais facilidade na matriz polimérica, exercendo maior influencia na ELO dos filmes. Efeito similar foi constatado por DONHOWE & FENNEMA (1993) relataram que plastificantes com menor massa molar, como o glicerol e polietileno glicol, foram mais efetivos do que outros plastificantes com alta massa molar nos filmes a base de metilcelulose.

Tabela 18. Efeito da concentração de plastificante - C_p (Triacetina/Glicerol) nas propriedades funcionais (TR, ELO, PVA, SOL e UMI) dos filmes coacervados de GEL/GAR (10:1) elaborados com 6% de material polimérico.

C_p^*	TR (MPa)**		ELO (%)**	
	TRI	GLI	TRI	GLI
0	75,09±1,81 ^a	75,09±1,81 ^a	3,93±0,84 ^{ab}	3,93±0,84 ^{bc}
2,5	66,20±1,62 ^{bA}	63,96±1,38 ^{bB}	4,01±0,21 ^{aA}	4,37±0,34 ^{bcA}
5	60,11±0,51 ^{cdA}	56,53±1,15 ^{bcdB}	4,30±0,93 ^{aA}	3,38±0,21 ^{cA}
7,5	56,57±2,83 ^{dA}	57,75±3,17 ^{bcdA}	3,95±0,20 ^{aA}	3,90±0,53 ^{bcA}
10	64,51±1,70 ^{bcA}	62,21±5,60 ^{bcA}	4,50±0,45 ^{aB}	6,06±0,03 ^{aA}
15	#	53,67±0,27 ^{cd}	#	3,54±0,72 ^c
20	#	49,29±1,28 ^d	#	5,08±0,56 ^{ab}
25	#	53,96±1,38 ^{cd}	#	4,37±0,34 ^{bc}
30	#	37,42±5,37 ^e	#	5,97±0,37 ^a

* C_p (unidade) g de plastificante/100g de material polimérico;

**Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados na horizontal, enquanto as letras minúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados na vertical, todas as médias foram obtidas através do teste de TUKEY.

Filmes descartados por apresentar aspecto oleoso, devido à exudação da triacetina na superfície do filme.

5.3.5.3 Solubilidade em água

Solubilidade em água (SOL) dos filmes é um fator determinante na escolha da aplicação alimentícia. Em geral, filmes biodegradáveis utilizados como camada de proteção em alimentos devem apresentar baixa solubilidade em água, na tentativa de melhorar a integridade do produto e sua resistência a água (PEREZ-GAGO & KROCHTA, 1999). Diante disso, foi realizado um estudo da SOL nos

filme coacervados de GE/GAR, em função da adição de plastificante (triacetina e glicerol) (Tabela 19).

Filmes coacervados de GEL/GAR contendo altas concentrações de glicerol (acima de 15%) apresentaram SOL maior diferindo significativamente ($p < 0,05$) em relação ao filme controle (0% de glicerol). Isto pode ser explicado, primeiramente, devido à natureza hidrofílica do glicerol que permite maior afinidade da matriz polimérica do filme por moléculas de água. Em segundo lugar, a alta concentração de glicerol pode ter desestruturado a matriz reduzindo a interação intermolecular entre a GEL e a GAR, aumentando o volume livre da cadeia e facilitando a inclusão das moléculas de água.

Em geral, os valores de SOL não diferiram significativamente entre as concentrações de glicerol testadas. Efeito oposto foi observado em filmes compostos de pectina e alginato intercruzados com Ca^{2+} adicionados de glicerol (SILVA, BIERHALZ & KIECKBUSCH, 2009) e em filmes de isolado protéico de ervilha adicionados de sorbitol (KOWALCZYK & BARANIAK, 2011). Estes autores observaram que o aumento da SOL foi proporcional ao aumento do plastificante.

Em concentrações inferiores a 10% de plastificante, a SOL dos filmes coacervados não apresentaram diferença significativa em relação ao filme controle, para ambos plastificantes (glicerol ou triacetina). Isto poderia ser reflexo da alta densidade de interações intermoleculares entre a GEL e GAR proveniente da condição de coacervação, ou seja, o complexo GEL/GAR por possuir uma matriz altamente estruturada poderia evitar que a incorporação do plastificante afetasse a SOL do filme. Em filmes de isolado protéico de ervilha a adição crescente de glicerol não afeta significativamente os valores de SOL, variando entre 25 e 30%.

O tipo de plastificante (glicerol ou triacetina) não afetou os valores de SOL dos filmes. Efeito oposto foi verificado por KOWALCZYK & BARANIAK (2011) onde os filmes de isolado protéico de ervilha contendo glicerol apresentaram menor valor de SOL do que os filmes com sorbitol.

5.3.5.4 Permeabilidade ao vapor de água

O plastificante modifica a rede molecular promovendo mobilidade com o aumento da distância intercadeia, isto provoca competição entre as moléculas de água do meio com as moléculas de água nos sítios ativos da rede polimérica do filme (RAO et al. 2010).

Na Tabela 19 pode-se verificar o efeito da adição do plastificante (triacetina e glicerol) em várias concentrações nos filmes coacervados de GEL/GAR. A adição do glicerol, em baixas concentrações (2,5 e 5% de plastificante), não influenciou os valores de permeabilidade ao vapor de água (PVA) do filme coacervado de GEL/GAR em relação ao filme controle (sem plastificante). Entretanto, em concentrações superiores a 7,5% notou-se uma redução significativa da PVA. Efeito similar foi observado por RIVERO, GARCÍA & PINOTTI (2009) ao adicionar 0,75g de glicerol/100g de matéria seca em filmes de gelatina e quitosana. Estes autores atribuem este efeito a ação de fazer ligações cruzadas da quitosana na matriz da gelatina, modificando a rede polimérica do filme pela forte interação entre os biopolímeros.

Em geral, vários trabalhos relataram aumento da PVA com a adição do plastificante, por exemplo, em filmes de gelatina ao elevar o teor de glicerol em 15%, a PVA aumentou cerca de 50% (YANG & PAULSON, 2000), em filmes de amido de inhame este aumento foi de 15% na PVA, ao elevar o teor de glicerol de 1,3 para 2,0g de glicerol/100g de matéria seca (MALI et al. 2002), entre outros trabalhos.

A adição de triacetina aumentou significativamente a PVA do filme coacervado de GEL/GAR em relação ao filme controle (sem plastificante). A inclusão da molécula de triacetina pode ter causado desorganização na rede polimérica do filme, aumentando o volume livre e facilitando o transporte de vapor de água através do filme. Efeito similar foi observado por MAFTOONAZAD, RAMASWAMY & MARCOTTE (2007) em filme de pectina contendo sorbitol e por

GALDEANO et al. (2009) em filmes de amido de aveia ao adicionar plastificante (glicerol, sorbitol, ureia e glicerol). Segundo LIEBERMAN & GILBERT (1973) e MAFTOONAZAD, RAMASWAMY & MARCOTTE (2007) relataram que a incorporação das moléculas de plastificante no filme poderia promover elevação da PVA, devido à natureza hidrofílica das moléculas de plastificante que favorecem a adsorção das moléculas de água e/ou pelo aumento no espaço intercadeias (ou volume livre) dos biopolímeros, facilitando a difusividade das moléculas de água através da matriz do filme.

Os filmes coacervados de GEL/GAR contendo glicerol, em todas as concentrações testadas, apresentaram menor valor de PVA do que os filmes com triacetina. Este comportamento não era esperado já que a triacetina apresenta caráter menos hidrofílico do que o glicerol. A triacetina ($C_9H_{14}O_6$ – 218,21g/mol) por apresentar maior massa molar do que o glicerol ($C_3H_8O_3$ – 92,08 g/mol) poderia provocar maior desorganização na matriz do filme elevando o volume livre na rede, o que justificaria a maior transferência de vapor de água através do filme contendo triacetina do que no filme com glicerol.

Tabela 19. Efeito da concentração de plastificante (Cp) nas propriedades funcionais: permeabilidade ao vapor de água (PVA) e solubilidade em água (SOL) do filme coacervado de GEL/GAR elaborados com triacetina (TRI) e glicerol (GLI), como agente plastificante.

Cp*	PVA (g.mm/m ² .h.kPa)**		SOL (%)**	
	TRI	GLI	TRI	GLI
0	0,21±0,02 ^{CA}	0,21±0,02 ^{AA}	26,2±1,9 ^{abcA}	26,2±1,9 ^{CA}
2,5	0,28±0,02 ^{abA}	0,20±0,01 ^{AB}	29,8±2,3 ^{AA}	30,5±0,2 ^{abcA}
5	0,33±0,02 ^{AA}	0,19±0,01 ^{abB}	21,7±1,5 ^{CA}	27,6±2,2 ^{CA}
7,5	0,27±0,02 ^{bA}	0,17±0,01 ^{bcB}	28,0±2,8 ^{abA}	30,4±1,1 ^{abcA}
10	0,27±0,02 ^{bA}	0,18±0,02 ^{bcB}	23,9±0,7 ^{bcA}	29,2±2,3 ^{bcA}
15	#	0,16±0,00 ^C	#	35,0±3,5 ^{ab}
20	#	0,08±0,00 ^D	#	34,3±1,7 ^{ab}
25	#	0,17±0,02 ^{bc}	#	35,0±2,7 ^{ab}
30	#	0,18±0,01 ^{bc}	#	35,9±2,1 ^a

* Cp (unidade) g de plastificante/100g de material polimérico;

**Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa (p<0,05) entre os resultados na horizontal, enquanto as letras minúsculas diferentes representam diferença significativa (p<0,05) entre os resultados na vertical, todas as médias foram obtidas através do teste de TUKEY.

Filmes descartados por apresentar aspecto oleoso, devido à exudação da triacetina na superfície do filme.

5.3.5.5 Difração de raio-X

A análise de difração de raio-X foi realizada para determinar a influencia do agente plastificante (triacetina ou glicerol) na estrutura dos filmes coacervados de GEL/GAR (Figura 26).

Os dois picos de difração (2θ igual a 8° e a 20°) referente ao filme coacervado de GEL/GAR sem plastificante (citado e discutido no item 3.2.5) também foi constatado nos filmes coacervados contendo plastificante (triacetina ou glicerol). A adição do glicerol no filme coacervado acentuou a intensidade do pico agudo em 8° , o que denota um aumento no caráter cristalino do filme. Resultado similar foi observado por EPURE et al. (2011) nos filmes de quitosana contendo glicerol. Estes autores associaram este comportamento à ação plastificante do glicerol, o qual favorece a mobilidade da cadeia e o processo de cristalização do filme. Entretanto, MALI et al. (2002) não observaram influência marcante do glicerol nos difratogramas de raio-X dos filmes de amido de inhame. Ao adicionar a triacetina observou-se elevação na intensidade dos dois picos, em 8° (pico agudo) e 20° (pico largo) conferindo um caráter semicristalino ao filme.

Ao comparar o tipo de plastificante (triacetina/glicerol) pode-se verificar que a diferença entre o intensidade do pico agudo (8°) foi menor do que o pico largo (20°), sendo a intensidade do pico largo ($2\theta=20^\circ$) na triacetina 94% maior do que para o filme contendo glicerol. Portanto, como este pico (20°) confere característica amorfa ao filme, o filme contendo triacetina conferiu maior caráter amorfo do que o glicerol. Este comportamento poderia estar relacionado à diferença de massa molar dos plastificantes, a triacetina (218,21g/mol) com maior massa molar do que o glicerol (92,08g/mol) poderia incorporar com maior dificuldade na rede polimérica, provocando maior desestruturação, o que e ressaltaria a característica amorfo do filme.

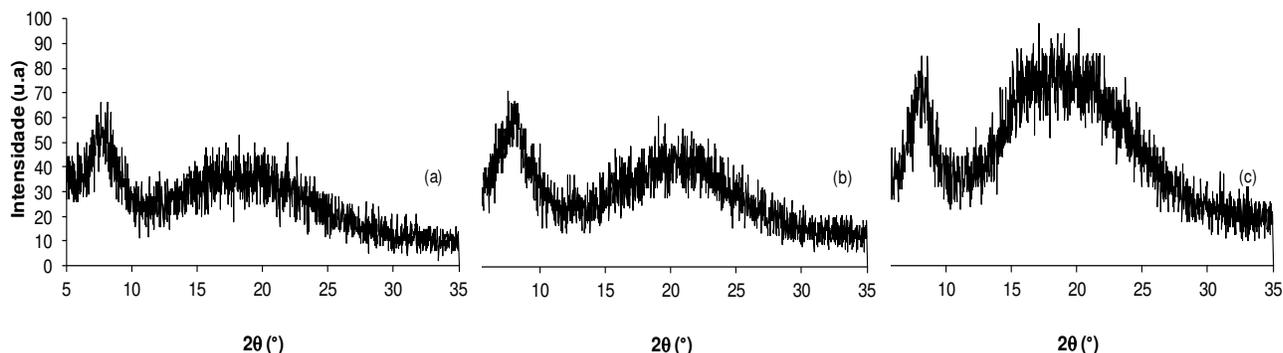


Figura 26. Caracterização microestrutural por difração de raio-X dos filmes de GEL/GAR coacervados (a) adicionados de 10% de glicerol (b) e 10% de triacetina (c).

5.3.5.6 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

O espectro de FTIR dos filmes coacervados de GEL/GAR contendo plastificante (triacetina ou glicerol) esta apresentada na Figura 27.

Nos filmes contendo glicerol observou-se redução na amplitude do pico em 1080 cm^{-1} e elevação no pico em 1032 cm^{-1} , em relação ao filme controle (sem plastificante). Segundo BERGO, SOBRAL & PRISON (2010) algumas alterações em termos de forma e intensidade dos picos no espectro de FTIR podem ser resultado das novas interações entre o plastificante e a matriz do filme. Portanto, a alteração no pico em 1033 cm^{-1} poderia evidenciar a interação entre o grupo hidroxila (-OH) do glicerol e a cadeia polimérica do filme. HOQUE, BENJAKUL & PRODPRAN (2011) relataram que a presença de glicerol em altas concentrações (10, 20 e 30%) poderia reduzir a interação entre as moléculas de gelatina. Esta evidencia poderia justificar a redução do pico em 1080 cm^{-1} ao adicionar o glicerol no filme coacervado de GEL/GAR.

Nos filmes coacervados de GEL/GAR adicionados de triacetina observa-se o mesmo perfil do que o espectro de FTIR do filme controle (sem plastificante), o

que poderia indicar menor interação entre a triacetina e a cadeia polimérica do filme.

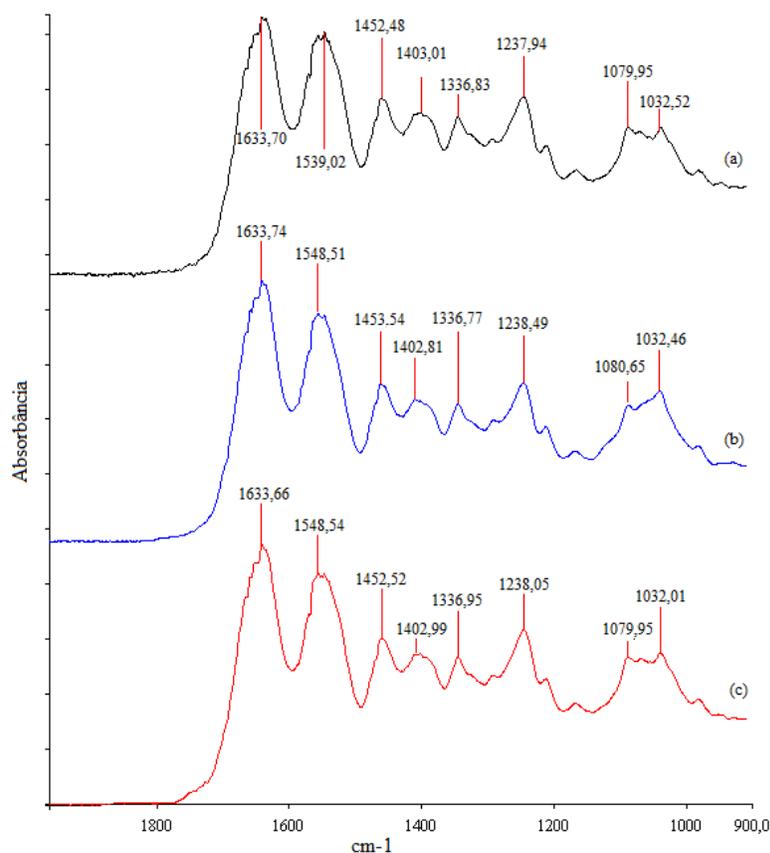


Figura 27. Espectrometria de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) dos filmes coacervados de GEL/GAR (a) adicionados de 10% de glicerol (b) e 10% de triacetina (c).

5.3.5.7 Calorimetria diferencial de Varredura (DSC)

Na Tabela 20 observou-se o efeito da adição do plastificante (glicerol e triacetina) nos valores de entalpia e T_g dos filmes coacervados de GEL/GAR. Os valores de T_{g1} e T_{g2} dos filmes coacervados de GEL/GAR reduziram significativamente com a adição de plastificante (triacetina ou glicerol). Segundo

GONTARD & GUILBERT (1994) e SPERLING (1992) este comportamento pode ser provavelmente resultado do efeito plastificante das moléculas de glicerol, que geralmente aumentam o volume livre da rede polimérica provocando maior mobilidade da cadeia, e conseqüentemente, diminuição da Tg.

ZIANI et al. (2008) observaram nos filmes de quitosana que a adição de glicerol reduziu a Tg dos filmes, aumentou a mobilidade da cadeia, facilitou a organização da cadeia polimérica com o aumento da cristalinidade. Resultado similar foi observado neste estudo ao associar DSC com os resultados de difração de raio-X dos filmes coacervados contendo glicerol.

Entretanto, YANG & PAULSON (2000) acreditam que a redução nos valores de Tg do filme de gelatina pode ser atribuída a sua inerente característica estrutural (alta mobilidade da cadeia) e a alta hidrofiliçidade do filme de gelatina que pode absorver moléculas de água, então o efeito plastificante das moléculas de água poderia estar prejudicando o valor de Tg. Entretanto, neste trabalho esta justificativa não confere, pois os valores de UMI dos filmes contendo glicerol ($10,11 \pm 0,58\%$) ou triacetina ($9,5 \pm 2,08\%$) apresentaram menor valor de UMI do que o filme controle ($14,64 \pm 1,68\%$), portanto menor efeito plastificante das moléculas de água na estrutura do filme.

O filme contendo glicerol por ser mais hidrofílico que a triacetina deveria apresentar menor Tg, devido à maior afinidade por moléculas de água que poderiam gerar maior efeito plastificante. Entretanto, este resultando não foi confirmado, pois as alterações nos valores de Tg nos filmes coacervados não foram tão relevantes entre a triacetina e o glicerol.

Tabela 20. Efeito da concentração de plastificante (Cp) e do tipo de plastificante (glicerol ou triacetina) sobre a temperatura de transição vítrea (Tg) e a entalpia de fusão (ΔH) do filme coacervado de GEL/GAR.

Filme	Tg ₁ (°C)	ΔH_1 (J/g)	Tg ₂ (°C)	ΔH_2 (J/g)
GEL/GAR	109,96	263,9	226,25	5,40
GEL/GAR (10%GLI)	82,79	220,0	206,72	11,55
GEL/GAR (10%TRI)	77,49	230,0	215,76	11,10

5.4 Conclusão

A condição de coacervação foi eficaz na elaboração dos filmes coacervados de GEL e GAR coesos, uniformes e homogêneos, onde o pH de coacervação variou de 4,5-5,0, nas diferentes proporções estequiométricas estudadas. O filme de GAR foi descartado devido sua fragilidade mecânica, portanto ao combinar a adição da GEL (acima de 50% de GEL ou 50g de GEL/100g de material polimérico) com o método de coacervação possibilitou a formação de filmes com melhores propriedades funcionais.

Filmes coacervados com alto teor de GEL mostraram-se mais resistentes e flexíveis e menos solúveis em água do que as formulações com menor teor de GEL (1:1 e 2:1 de GEL/GAR). Isto é reflexo da maior interação eletrostática entre a GEL e GAR observada pelo aumento na intensidade das bandas em 3285, 1539, 1079 e 1029 cm^{-1} no FTIR e pelo maior valor da Tg no DSC. Portanto, a maior interação entre a GEL e GAR proporciona a formação de uma estrutura mais compacta e cristalina confirmada pelo aumento na intensidade do pico agudo em 8° na difração de raio-X.

O aumento da interação eletrostática entre a GEL e GAR pelo método de coacervação foi evidenciado pelos altos valores de TR dos filmes coacervados

(elaborados em $pH_{\text{coacervação}}$) em relação aos filmes não coacervados (elaborados sem ajuste de pH). Estes resultados também foram confirmados pelos baixos valores de SOL e de PVA dos filmes coacervados de GEL/GAR (10: e 8:1) em relação aos filmes não coacervados.

Em geral, o filme coacervado elaborado na proporção 10:1 de GEL/GAR foi selecionado por apresentar menor valor de SOL e maior valor de TR em relação as demais formulações. Por esta razão, o estudo da concentração polimérica e do efeito do agente plastificante foi realizado nesta proporção estequiométrica.

O aumento da concentração de material polimérico de 2 para 6% do filme coacervado reduziu o tempo de secagem do filme para 15h sem alterar suas propriedades funcionais.

A triacetina incorporou com maior dificuldade na matriz polimérica do filme do que o glicerol, isto foi comprovado pela exudação das moléculas de triacetina na superfície do filme, em concentrações acima de 10g de plastificante/100g de material polimérica. As análises de FTIR e difração de raio-X também confirmam a maior interação do glicerol na matriz polimérica do filme.

O glicerol executou sua função, como agente plastificante, aumentando a flexibilidade do filme, nas concentrações de 10 e de 30g de plastificante/ 100g de material polimérico. Além disso, a adição do glicerol reduziu a PVA em altas concentrações do plastificante (exceto em 30%) e não alterou a Op dos filmes, em relação ao filme controle. Tanto a adição do glicerol quanto a da triacetina conferiram menor resistência mecânica e maior solubilidade em água ao filme. No entanto, a triacetina não conferiu flexibilidade, aumentou a permeabilidade ao vapor de água e opacidade dos filmes coacervados.

5.5 Referencias Bibliográficas

ANDERSON, D. M. W.; BRIDGEMAN, M. M. E.; DEPINTO, G. Studies of uronic-acid materials acacia gum exudates from species of the series *gummiferae*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 3, p. 575-577, 1984.

ANDREUCETTI, C.; CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films. **Food Research International**, v. 42, p. 1113-1121, 2009.

ASTM D 882-95. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting. Philadelphia: **American Society for Testing and Materials**, 1995.

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

ASTM D 523. Standard test method for specular gloss. Philadelphia: **American Society for testing and Materials**, 1999.

PEKERBASARA, S.; OVEZ, B.; BALCIOGLU, I. Properties of gelatin gum-arabic coacervates composited with amino resins. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 175-184, 1993.

BASAVARAJU, K. C.; DAMAPPA, T.; RAI, S. K. Preparation of chitosan and its miscibility studies with gelatin using viscosity, ultrasonic and refractive index. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 357-362, 2006.

BERGO, P.; SOBRAL, P. J. A. Effect of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 8, p. 1285-1289, 2007.

BERGO, P.; SOBRAL, P. J. A.; PRISAN, J. M. Effect of glycerol on physical properties of cassava starch films. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 34, sup. 2, p. 401- 410, 2010.

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

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

CHEN, M.; DENG, J.; YANG, F.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. **Biomaterials**, v. 24, p. 2871-2880, 2003.

COZIC, C.; PICTON, L.; GARDA, M-R.; MARLHOUX, F.; CERF, D. L. Analysis of arabic gum: Study of degradation and water desorption processes. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1930-1934, 2009.

DANIELS, R.; MITTERMAIER, E. M. Influence of pH adjustment on microcapsules obtained from complex coacervation of gelatin and acacia. **Journal of Microencapsulation**, v. 12, n. 6, p. 591-599, 1995.

DONG, Z. F.; WANG, Q.; DU, Y. M. Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release, **Journal Membrane Science**, v. 280, p. 37–44, 2006.

DONHOWE, I. G.; FENNEMA, O. The effects of plasticizers on crystallinity, permeability, and mechanical-properties of methylcellulose films. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 17, n. 4, p. 247-257, 1993.

DUCEL, V.; RICHARD, J.; SAULNIER, P.; POPINEAU, Y.; BOURY, F. Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 232, p. 239-247, 2004.

EPURE, V.; GRIFFON, M.; POLLET, E.; AVEROUS, L. Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 947-952, 2011.

FARRIS, S.; SCHAICH, K. M.; LIU, L.; COOKE, P. H.; PIERGIOVANNI, L.; YAM, K. L. Gelatin-pectin composite films from polyion-complex hydrogels. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 61-70, 2011.

GALDEANO, M. C.; MALI, S.; GROSSMANN, YAMASHITA, F.; GARCÍA, M. A. Effects of plasticizers on the properties of oat starch films. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 512-538, 2009.

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

GINSEMAN, P. M.; RICHARDSON, R. K.; MORRIS, R. K. Associative and segregative interactions between gelatin and low-methoxy pectin: Part 1. Associative interactions in the absence of Ca^{2+} . **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 723-737, 2003.

GOMEZ-ESTACA, J.; GOMEZ-GUILLÉN, M. C.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, F.; MONTERO. Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatin chitosan films. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1461e1469, 2011.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. In: **Food packaging and Preservation**. MATHOUSHI, M. ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow, p. 159-181, 1994.

GUSEY, D.; McCLEMENTS, D. J. Characterization of beta-lactoglobulin-chitosan interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 1, p. 124-131, 2006.

HOQUE, M. S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Effects of partial hydrolysis and plasticizer content on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 82-90, 2011.

HUANG, Y-I.; CHENG, Y-C.; YU, C-C.; TSAI, T-R.; CHAM, T-M. Microencapsulation of extract containing shikonin using gelatin-acacia coacervation method: A formaldehyde-free approach. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.58, p. 290-297, 2007.

JO, C.; KANG, H.; LEE, .N Y.; KWON, J.H.; BYUN, M. W. Pectin- and gelatin-based film: effect of gamma irradiation on the mechanical properties and biodegradation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, p. 745-750, 2005.

JONES, O.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. J. Thermal analysis of b-lactoglobulin complexes with pectin or carrageenan for production of stable biopolymer particles. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 239-248, 2010.

KOŁODZIEJCZYK, E.; LESER, M. E. Effect of time on the interfacial and foaming properties of beta-lactoglobulin/acacia gum electrostatic complexes and coacervates at pH 4.2. **Langmuir**, v. 21, n. 17, p. 7786-7795, 2005.

LI, Y.; JIA, H.; CHENG, Q.; PAN, F.; JIANG, Z. Sodium alginate–gelatin polyelectrolyte complex membranes with both high water vapor permeance and high permselectivity. **Journal of Membrane Science**, v. 375, p. 304–312, 2011.

LIU, S. H.; CAO, Y. L.; GHOST, S.; ROUSSEAU, D.; LOW, N. H.; NICKERSON, M. T. Intermolecular interactions during complex coacervation of pea protein isolate and gum Arabic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 552-556, 2010.

LIU, Z.; GE, X.; LU, Y.; DONG, S.; ZHAO, Y.; ZENG, M. Effects of chitosan

molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatin-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 26, p. 311-317, 2012.

LIU, S.; ELMER, C.; LOW, N. H.; NICKERSON, M. T. Effect of pH on the functional behavior of pea protein isolate-gum arabic complexes. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 489-495, 2010.

LIU, S.; LOW, N. H.; NICKERSON, M. T.; Effect of pH, salt, and biopolymer ratio on the formation of pea protein isolate-gum arabic complexes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1521-1526, 2009.

LIZ, C. C. C.; PETKOVA, V.; BENATTAR, J. J.; MICHEL, M.; LESER, M. E.; MILLER, R. X-ray reflectivity studies of liquid films stabilized by mixed β -lactoglobulin-Acacia gum systems. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 282-283, p. 109-117, 2006.

MAFTOONAZAD, N.; RAMASWAMY, H.; MARCOTTE, M. Evaluation of factors affecting barrier, mechanical and optical properties of pectin-based films using response surface methodology. **Journal Food Process Engineering**, v. 30, p. 539-563, 2007.

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

MARSHALL, A. S.; PETRIE, S. E. B. Thermal transition in gelatin and aqueous gelatin solutions. **The Journal of Photographic Science**, v. 28, p.128-134, 1980.

MATALANIS, A.; LESMES, U.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. J. Fabrication and characterization of filled hydrogel particles based on sequential segregate and aggregative biopolymer phase separation. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 8, p. 689-701, 2010.

MAYYA, K. S.; BHATTACHARYYA, A.; ARGILLIER, J. F. Micro-encapsulation by coacervation: influence of surfactant. **Polymer International**, v. 52, n. 4, p. 644-647, 2003.

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, 1994.

MOUNSEY, J.; O'KENNEDY, B. T.; FENELON, M. A.; BRODKORB, A. The effect of heating on β -lactoglobulin-chitosan mixtures as influenced by pH and ionic strength. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n.1, p. 65-73, 2008.

NIXON, J. R.; WONG, K. T. Evaluation of permeation through polymeric membranes as a model for the release of drugs from gelatin-acacia walled microcapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 50, p. 205-212, 1989.

PARK, J. W., WHITESIDE, S., CHO, S. Y. Mechanical and water vapor barrier properties of extruded and heat-pressed gelatin films. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 692-700, 2008.

PEREZ-GAGO, M. B.; KROCHTA, J. M. Water vapor permeability, solubility and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. **Journal of Food Science**, v. 64, p. 1034-1037, 1999.

POPPE, J. Gelatin, In: Thickening and gelling agents for food, New York, Ed. Alan Imenson, **Blackie Academic & Professional**, Cap. 7, p.144-168, 1997.

RABISKOVA, M.; SONG, J.; OPAWALE, F. O.; BURGESS, D. J. The influence of surface-properties on uptake of oil into complex coacervate microcapsules. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, n. 8, p. 631-635, 1994.

RAO, M. S.; KANATT, S. R.; CHAWLA, S. P.; SHARMA, A. Chitosan and guar gum composite films: Preparation, physical, mechanical and antimicrobial properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 1243-1247, 2010.

RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 531-539, 2009.

ROGOVINA, L. Z. Approaches to multicomponent systems of biopolymers. **Food Hydrocolloids**, v. 12, n. 3, p. 325-331, 1998.

SARAVANAN, M.; RAO, K. P. Pectin-gelatin and alginate-gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 808-816, 2010.

SLADE, L.; LEVINE, H. Beyond water activity: recent advances based on an alternatives approach to the assessment of food quality and safety. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 30, p. 115-360, 1987.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and Technofunctional Properties of Protein-Polysaccharide Complexes: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 8, p. 689–753, 1998.

SCHMITT, C.; SILVA, T. P.; BOVAY, C.; RAMI-SHOJAEI, S.; FROSSARD, P.; SING, S. S.; SIDDHANTA, A. K.; MEENA, R.; PRASAD, K.; BANDYOPADHYAY, S.; BOHIDAR, H. B. Intermolecular complexation and phase separation in aqueous solutions of oppositely charged biopolymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 185-192, 2007.

SING, S. S.; SIDDHANTA, A. K.; MEENA, R.; PRASAD, K.; BOHIDAR, H. B. Intermolecular complexation and phase separation in aqueous solutions of oppositely charged biopolymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 2, p. 185-192, 2007.

SILVA, M. A.; BIERHALZ, A. C. K.; KIECKBUSCH, T. G. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca²⁺ ions: Effect of the plasticizer concentration. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 4, p. 736-742, 2009.

SOBRAL, P. J. A.; HABITANTE, A. M. Q. B. Phase transitions of pigskin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 377-382, 2001.

STAROSCZK, H.; PIELICHOWSKA, J.; SZTUKA, K.; STANGRET, J.; KOLODZIEJSKA, I. Molecular and structural characteristics of cod gelatin films modified with EDC and TGase. **Food Chemistry**, v. 130, n. 2, p. 335-343, 2012.

TIWARI, A. Gum Arabic-Graft-Polyaniline: An Electrically Active Redox Biomaterial for Sensor Applications. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 44, p. 735-745, 2007.

VRIES, R.; WEINBRECK, F.; KRUIF, C. G. Theory of polyelectrolyte absorption on heterogeneously charged surfaces applied to soluble protein-polyelectrolyte complexes. **Journal of Chemical Physics**, v. 118, n.10, p.4649-4659, 2003.

WANG, L. Z.; LIU, L.; HOLMES, J.; KERRY, J. F.; KERRY, J. P. Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 42, n. 9, p. 1128-1138, 2007.

WANG, Y.; QIU, D.; COSGROVE, T.; DENBOW, M. L. A small-angle neutron scattering and rheology study of the composite of chitosan and gelatin. **Colloids and Surfaces B-Bionterfaces**, v. 70, n. 2, p. 254-258, 2009.

WEINBRECK, F.; DE VRIES, R.; SCHROOYEN, P.; KRUIF, C. G. Complex coacervation of whey proteins and gum Arabic. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 293-303, 2003.

WEINBRECK, F.; TROMP, R. H.; KRUIF, C. G. Composition and structure of whey protein/gum Arabic coacervates. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 4, p. 1437-1445, 2004.

XING, F.; CHENG, G.; YI, K.; MA, L. Nanoencapsulation of capsaicin by complex coacervation of gelatin, acacia, and tannins. **Journal Applied Polymers Science**. V. 96, p. 2225-2229, 2005.

YANG, L.; PAULSON, A.T. Mechanical and water vapor barrier properties of edible gellan films. **Food Research International**, v. 33, p. 563-570, 2000.

YAN, X.; KHOR, E.; LIM, L-Y. PEC films prepared from chitosan-alginate coacervates. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, n. 7, p. 941-946, 2000.

YAO, K.; LIU, J.; CHENG, G. X.; DAÍ, X. D.; TU, H. L.; LOPES DA SILVA, J. A. Swelling behavior of pectin/chitosan complex films. **Journal Applied Polymer Science**, v. 60, n. 2, p. 279-283, 1996.

YAKIMETS, I.; WELLNER, N.; SMITH, A. C.; WILSON, R. H.; FARHAT, I.; MITCHELL, J. Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. **Polymer**, v. 46, n. 26, p. 12577-12585, 2005.

YE, A.; FLANAGAN, J.; SINGH, H. Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseinate and gum Arabic. **Research, Science and Technology Biopolymers**, v. 82, p. 121-133, 2006.

ZOHURIAAN, M. J.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing**, v. 23, p. 575–579, 2004.

ZIANI, K.; OSES, J.; COMA, V.; MATE, J. I. Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 2159-2165, 2008.

Capítulo 6

Conclusão Geral.

6 Conclusão Geral

Em relação à determinação do pH de coacervação ou pH_{zeta}

O potencial zeta foi uma ferramenta eficaz para determinar o $pH_{coacervação}$ (ou pH_{zeta}) para cada proporção estequiométrica (1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 6:1, 8:1, 10:1 e 20:1) para cada um dos pares poliméricos GEL/QUI, GEL/PEC e GEL/GAR estudados.

As soluções filmogênicas de GEL/QUI e de GEL/GAR interagiram de forma associativa com o método de coacervação ($pH_{coacervação}$), devido seu aspecto visual uniforme, homogêneo e de baixa ou moderada viscosidade. Enquanto, para as soluções filmogênicas de GEL/PEC em condição de coacervação ocorreu separação de fase, devido à interação repulsiva entre os polímeros, exceto para a formulação 20:1 de GEL/PEC.

Em relação à elaboração dos filmes coacervados

A combinação entre a gelatina e a quitosana produziu filmes coacervados com propriedades funcionais intermediárias, entre as propriedades dos filmes simples do polissacarídeo e da proteína. Entretanto, o filme coacervado de GEL/PEC, apresentou melhores propriedades funcionais do que os filmes simples de GEL e PEC. Já para os filmes coacervados de GEL/GAR não foi realizado nenhuma comparação, pois o filme simples de goma arábica não foi elaborado devido sua fragilidade mecânica. A combinação da adição de gelatina juntamente com o método de coacervação foi eficaz para elevar a resistência mecânica dos filmes coacervados de GEL/GAR. Todos os biopolímeros mostram-se totalmente solúveis em água, mas a combinação da proteína com o polissacarídeo pelo método de coacervação reduziu a SOL em até 15,1%.

Em relação à propriedade estequiométrica

As formulações contendo altos teores de gelatina em relação ao polissacarídeo produziram filmes coacervados com maior resistência à ruptura e flexibilidade, além disso, para os filmes de GEL/QUI o maior teor de GEL (proporção estequiométrica 10:1 de GEL/QUI) também promoveu redução nos valores de PVA. Pela análise de DRX constatou-se que o maior teor de gelatina também proporcionou ao filme uma estrutura com maior cristalinidade, o que pode ser atribuído às interações eletrostáticas atrativas entre as cadeias da gelatina e a quitosana ou goma arábica, comprovada pelo FTIR.

Relacionando o $\text{pH}_{\text{coacervação}}$ com a proporção estequiométrica, o filme com 10:1 de GEL/GAR ou QUI foi selecionado para prosseguir o estudo, por que apresentar melhores propriedades funcionais (maior TR e menor valor de SOL para o par GEL/GAR e menor PVA para o par GEL/QUI).

Em relação ao método de coacervação

O método de coacervação aumentou a resistência mecânica dos filmes coacervados ($\text{pH}_{\text{coacervação}}$) em relação aos filmes compostos ou não coacervados (sem ajuste de pH). Para as formulações de GEL/QUI (8:1, 10:1 e 20:1), a coacervação foi capaz de reduzir a PVA em relação aos filmes compostos, por formar uma rede polimérica densa devido à elevada interação eletrostática entre os biopolímeros. Já para formulações com baixo teor de GEL (1:2, 1:1, 2:1 e 4:1 de GEL/QUI) ocorreu redução da SOL, em relação aos filmes não coacervados (sem ajuste de pH). Estes resultados também foram confirmados pelos baixos valores de SOL e de PVA dos filmes coacervados de GEL/GAR (10: e 8:1) em relação aos filmes não coacervados.

A interação eletrostática entre a proteína e o polissacarídeo foi confirmada pelas análises de DRX e FTIR, devido o aumento na cristalinidade do filme e a

formação do grupamento amida (resultado da interação do grupo amina da QUI e do grupo carboxila da GEL), respectivamente.

Em relação à concentração de material polimérico

A elevação da concentração de material polimérico de 2% para 6% nos filmes coacervados GEL/QUI ou GAR proporcionou redução pela metade no tempo de secagem do filme e afetou as propriedades funcionais dos filmes coacervados de GEL/QUI (elevou a TR e a SOL) e de GEL/GAR (reduzindo a TR). O aumento da concentração de material polimérico nos filmes de GEL/GAR provocou saturação da solução filmogênica, dificultando a interação eletrostática entre os biopolímeros produzindo filmes menos resistentes. Para o filme coacervado de GEL/PEC não foi realizado um estudo sobre o efeito da concentração de material polimérico, pois somente na concentração de 8% material polimérico evidenciou-se a formação de matriz coesa e homogênea que permitisse sua produção e caracterização.

Em relação ao tipo de agente plastificante

A triacetina não atuou como agente plastificante conferindo maior a flexibilidade ao filme coacervado. Isto pode ser reflexo da sua baixa incorporação na matriz filmogênica, já que seu limite de incorporação atingiu seu ápice em 10, 15 e 20g de triacetina/100g de material polimérico para os filmes de GEL/GAR, GEL/PEC e GEL/QUI, respectivamente. Este resultado foi confirmado pela análise de DRX, onde o filme contendo triacetina apresenta maior caráter amorfo do que o filme contendo glicerol, segundo o DRX. Para as análises de FTIR e DSC, a adição de triacetina não provocou alterações significativas no espectro de FTIR e na curva calorimétrica pode-se evidenciar baixa interação da triacetina com matriz polimérico do filme ao comparar com o filme controle (sem plastificante).

Os filmes adicionados de glicerol apresentaram-se homogêneos e com boa incorporação na matriz filmogênica, confirmados pelas análises visuais, DSC, FTIR e DSC. A adição de glicerol produziu filmes com menor PVA e menor Op, em relação aos filmes contendo triacetina. Além disso, para os filmes de GEL/PEC ainda atuou reduzindo a SOL e para os filmes de GEL/QUI aumento a resistência mecânica, em relação aos filmes com triacetina.

Em relação à concentração de plastificante

Em geral, o glicerol executou seu papel como agente plastificante de forma eficiente. Para o filme de GEL/PEC ocorreu uma redução de 54% da TR e um aumento de 7,7 vezes no valor da ELO, quando a concentração de glicerol aumentou de 0 para 20g glicerol/100g de material polimérico. Comportamento similar foi observado para o de filme de GEL/QUI com elevação da concentração do glicerol para 25g de glicerol/100g de material polimérico e para o filme de GEL/GAR nas concentrações de 10 e 30g de glicerol/100g de material polimérico.

A adição crescente de glicerol não afetou significativamente os valores de Op, dos filmes coacervados (GEL/QUI, GEL/PEC e GEL/GAR). Mesmo efeito foi observado para os filmes de GEL/QUI em relação aos valores de PVA e para os filmes de GEL/PEC em relação aos valores de SOL.

De modo geral, a adição crescente da triacetina não conferiu flexibilidade, aumentou a permeabilidade ao vapor de água e a solubilidade em água, além de diminuir a tensão na ruptura dos filmes coacervados.

O glicerol interagiu de forma mais eficiente na matriz polimérica dos filmes coacervados (GEL/QUI, GEL/PEC e GEL/GAR) em todas as concentrações estudadas. Entretanto, filmes coacervados em uma determinada concentração de glicerol foi capaz de associar maior flexibilidade com a melhor barreira ao vapor de água, como a formulação de GEL/QUI contendo 25g de glicerol/100g de material polimérico, para a GEL/PEC foi a formulação com 25g de glicerol/100g de material

polimérico e para o filme de GEL/GAR foi com 20g de glicerol/100g de material polimérico.

Anexo

ANEXO - Efeito do tipo do agente ajustador de pH nos filmes coacervados de GEL/QUI

Material e Métodos

Material

Gelatina tipo B (suína, 40 mesh, marca Leiner Davis Gelatin Brasil, Cotia - São Paulo), quitosana com grau de desacetilação de 80% (<50mesh, marca Polymar, Fortaleza, Brasil). Como agente ajustador de pH foram utilizados o hidróxido de amônia – NH₄OH (Merck – São Paulo, Brasil) e o hidróxido de sódio – NaOH (Merck – São Paulo, Brasil).

Métodos

A análise de potencial zeta foi realizada nas soluções filmogênicas de GEL/QUI elaboradas nas proporções estequiométricas 20:1; 10:1; 8:1 e 6:1, com o intuito de determinar o pH ótimo de coacervação entre os biopolímeros, como descrito no Capítulo 3 (item 3.2.3). Os filmes coacervados de GEL/QUI foram caracterizados quanto suas propriedades mecânicas (tensão na ruptura – TR e alongação – ELO), permeabilidade ao vapor de água (PVA), solubilidade em água (SOL) de acordo com a metodologia descrita no Capítulo 3, nos itens 3.2.5; 3.2.6 e 3.2.7, respectivamente. Foi realizada a análise de microscopia ótica da superfície do filme coacervado de GEL/QUI, onde as imagens foram captadas pelo microscópio ótico (marca Carl Zeiss e modelo Jenaval) com lente polarizada. Finalizando a caracterização com a difração de raio-X do filme, de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.9 do Capítulo 3.

Produção dos filmes

A metodologia utilizada para a elaboração dos filmes coacervados de GEL/QUI utilizando como agente ajustador de pH (NaOH ou NH₄OH) foi a mesma descrita no Capítulo 3 (item 3.2.2).

Resultados e Discussões

Sendo o ajuste de pH um parâmetro importante na elaboração dos filmes coacervados foram realizados ensaios para avaliar o efeito do agente ajustador de pH (hidróxido de sódio - NaOH e hidróxido de amônia - NH₄OH) nas propriedades funcionais dos filmes de GEL/QUI. Ambos os hidróxidos são solúveis em água e classificados como monobases (presença de uma hidroxila em sua estrutura). Entretanto, a soda por ser composta de um metal da Família IA é caracterizada como uma base forte, dissociando-se rapidamente, já a amônia uma base fraca com caráter molecular, dissocia-se mais lentamente. Essa diferença no grau de dissociação das bases poderia alterar os potenciais elétricos da solução filmogênica quando ajustados com NaOH e/ou NH₄OH e conseqüentemente, seus valores de pH_{zeta} . No entanto, os valores dos ζ -potencial zeta das soluções filmogênicas não sofreram influencia do agente ajustador de pH, como pode ser observado na Figura 28.

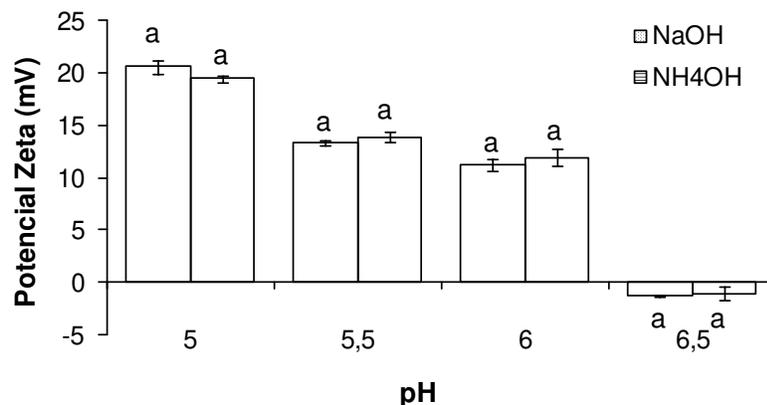


Figura 28. Efeito do tipo de agente ajustador de pH (NaOH/NH₄OH) no ζ -potencial zeta das soluções filmogênicas de GEL/QUI em diferentes valores de pH (5,0; 5,5; 6,0 e 6,5).

Na Tabela 21, pode-se observar o efeito do tipo de agente ajustador de pH nas propriedades funcionais dos filmes complexos ou coacervados. Constatou-se que os filmes de GEL/QUI elaborados com hidróxido de amônia apresentaram maiores valores de TR (tensão na ruptura) do que os filmes ajustados com o hidróxido de sódio.

O tipo de agente ajustador de pH afetou os valores de ELO dos filmes de GEL/QUI (10:1 de GEL/QUI) aumentando sua elasticidade quando elaborado com NaOH, já com os filmes com 8:1 de GEL/QUI o efeito foi antagônico, em relação aos filmes elaborados com NH₄OH. Para as demais formulações não se observou diferença significativa entre os filmes elaborados com NaOH ou NH₄OH.

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) para o filme de GEL/QUI na proporção 20:1 quando o pH foi ajustado com amônia apresentou menor valor em relação ao filme ajustado com soda. Efeito contrário foi observado nas formulações com 8:1 e 6:1 de GEL/QUI. Para o filme com 10:1 de GEL/QUI o tipo de agente ajustador de pH não alterou significativamente os valores de PVA.

A mudança no agente ajustador de pH não provocou alterações significativas nos valores de solubilidade em água (SOL) dos filmes coacervados 20:1 e 8:1 de GEL/QUI, enquanto para os filmes de GEL/QUI (10:1 e 6:1 de GEL/QUI) elaborado com NH_4OH apresentaram menores valores de SOL que os filmes titulados com NaOH .

Tabela 21. Efeito do agente ajustador de pH ($\text{NaOH}/\text{NH}_4\text{OH}$) nas propriedades funcionais (TR, ELO, PVA e SOL) dos filmes coacervados de GEL/QUI em diferentes proporções estequiométricas.

GEL/QUI	Agente Ajustador de pH	TR (MPa)*	ELO (%)*	PVA (g.mm/m ² .h.kPa)*	SOL (%)*
20:1	NaOH	58,56±1,58 ^b	3,38±0,27 ^a	0,22±0,015 ^a	38,41±2,48 ^a
	NH_4OH	84,85±2,60 ^a	3,49±0,25 ^a	0,12±0,006 ^b	36,75±1,57 ^a
10:1	NaOH	48,23±0,13 ^b	4,47±0,34 ^a	0,19±0,017 ^a	41,98±3,13 ^a
	NH_4OH	80,82±0,09 ^a	2,82±0,44 ^b	0,17±0,014 ^a	34,74±4,40 ^b
8:1	NaOH	34,42±5,23 ^b	2,74±0,13 ^b	0,16±0,014 ^b	28,15±1,53 ^a
	NH_4OH	87,00±2,06 ^a	3,74±0,16 ^a	0,22±0,001 ^a	30,40±4,18 ^a
6:1	NaOH	34,11±4,27 ^b	4,96±1,25 ^a	0,14±0,009 ^b	32,81±3,28 ^a
	NH_4OH	76,92±1,25 ^a	2,46±0,43 ^a	0,28±0,01 ^a	24,81±1,49 ^b

*TR (tensão na ruptura), ELO (elongação), PVA (permeabilidade ao vapor de água) e SOL (solubilidade em água).

*Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: Letras diferentes minúsculas na vertical representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste de TUKEY para as formulações na mesma proporção estequiométrica.

Os filmes coacervados de GEL/QUI (>20%QUI) utilizando como agente ajustador de pH o NaOH foram descartados pela análise visual, devido à presença de cristais de sódio na superfície dos filmes, como pode ser observado na microscopia ótica (Figura 29).

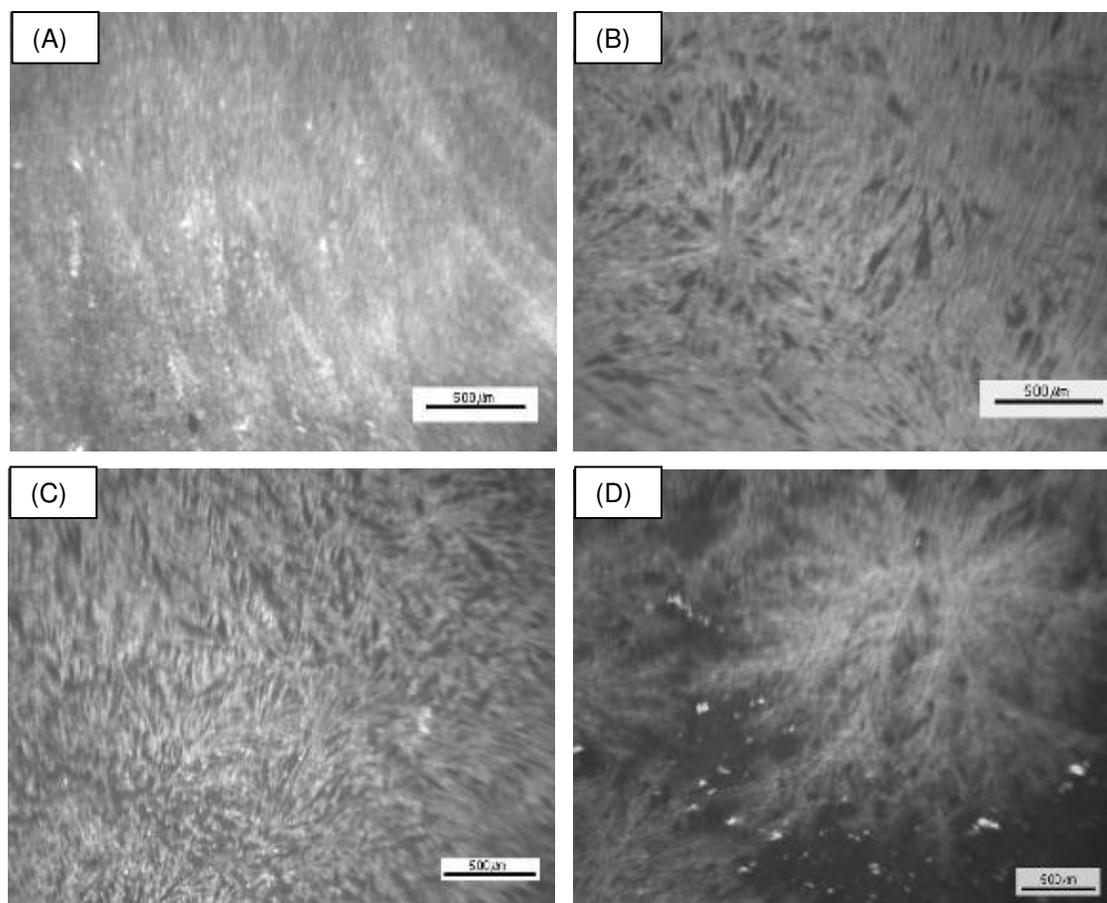


Figura 29. Microscopia ótica dos filmes coacervados de GEL/QUI nas seguintes concentrações: (A) 4:1 de GEL/QUI; (B) 2:1 de GEL/QUI; (C) 1:1 de GEL/QUI e (D) 1:2 de GEL/QUI, elaborados com NaOH.

Ao avaliar a cristalinidade do material pela difração de raio-X, observou-se que os difratogramas dos filmes coacervados de GEL/QUI ajustados com

hidróxido de sódio (NaOH) e/ou hidróxido de amônia (NH₄OH) não diferiram no aspecto e nem na intensidade dos picos.

Tabela 22. pH inicial (condição sem ajuste de pH) e o pH_{coacervação} (condição de coacervação, com ajuste de pH) da solução filmogênica de GEL/QUI, em diferentes proporções estequiométricas.

GEL/QUI	pH _{inicial} (solução sem ajuste de pH)	pH _{coacervação} (solução com ajuste de pH)
20:1	4,99	6,2
10:1	4,89	6,5
8:1	4,76	6,6
6:1	4,76	6,7
4:1	4,75	6,9
2:1	4,72	7,0
1:1	4,64	7,1
1:2	4,62	7,2

O hidróxido de sódio (NaOH) é um composto iônico que em solução aquosa dissocia totalmente em íons Na⁺ e OH⁻, o sódio encontra-se no estado sólido em temperatura ambiente e sem a presença de água. A Tabela 22, mostra os valores de pH na condição inicial (sem ajuste de pH) e na condição de coacervação (pH_{coacervação}). Ao observar as micrografias óticas (Figura 29) com seus respectivos valores de pH coacervação ou inicial (Tabela 22), pode-se observar que o filme com maior teor de GEL (4:1 de GEL/QUI) apresentou um pH inicial da solução filmogênica menos alcalino do que uma formulação com maior teor de QUI (1:2 de GEL/QUI), portanto, necessita-se adicionar menor quantidade de hidróxido para elevar o pH até a condição de coacervação. Por esta razão, para o filme 4:1 de GEL/QUI pode-se verificar a presença de pequenos cristais de sódio dispersos por

toda a sua superfície, enquanto no filme 1:2 de GEL/QUI a concentração destes cristais foi maior, sendo capaz de formando na superfície do filme uma estrutura cristalina grande e organizada, como pode ser visualizado na Figura 29.

Este mesmo comportamento não foi verificado para o hidróxido de amônia (NH_4OH), por se tratar de composto molecular que se ionizam na presença de água, na forma dos íons NH_4^+ e OH^- . O íon amônia presente na solução filmogênica do filme durante o processo de secagem foi liberado gradualmente para o meio ambiente, na forma do gás amônia $\text{NH}_{3(g)}$.

Conclusão

O hidróxido de sódio (NaOH) foi substituído por NH_4OH por afetar o aspecto visual dos filmes coacervados, pois o sódio durante a secagem do filme apresenta-se sólido em temperatura ambiente e na ausência de água, cristalizando-se na superfície (Figura 29). Já o NH_4^+ não permanece na formulação do filme coacervado, pois evapora na forma do gás NH_3 não interferindo no aspecto visual do mesmo.

Além disso, os íons sódio ao permanecerem na rede polimérica do filme de GEL/QUI após a sua secagem interferem na interação intermolecular entre a gelatina e a quitosana, promovendo um impedimento estérico entre os biopolímeros. Este fato pode ser comprovado pelos baixos valores de TR dos filmes contendo NaOH em relação aos filmes contendo NH_4OH , a presença dos íons sódio na matriz do filme reduz os interstícios vazios na rede dificultando a interação intermolecular entre os biopolímeros, o que reflete diretamente nas propriedades funcionais dos filmes.

