

LUCIANA LOPES TAVARES

Efeito da adição de argilas modificadas na estrutura e propriedades funcionais de biofilmes produzidos a base de zeína

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, *Campus* de São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos (Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos)

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Lopes Filho

São José do Rio Preto

Agosto de 2010

Tavares, Luciana Lopes.

Efeito da adição de argilas modificadas na estrutura e propriedades funcionais de biofilmes produzidos a base de zeína / Luciana Lopes Tavares. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.

75 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: José Francisco Lopes Filho

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Alimentos – Embalagens. 2. Argila. 3. Biofilme. 4. Zeína. I. Lopes Filho, José Francisco. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 664.09

Fichacatalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

LUCIANA LOPES TAVARES

**Efeito da adição de argilas modificadas na estrutura e propriedades
funcionais de biofilmes produzidos a base de zeína**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, *Campus* de São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência e Tecnologia de Alimentos (Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos)

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Francisco Lopes Filho
Professor Assistente Doutor
UNESP - São José do Rio Preto
Orientador

Prof^ª.Dr^ª. Elisângela Corradini
Professora Doutora
UFSCAR - São Carlos

Prof. Dr. José Antônio Gomes Vieira
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 13 de agosto de 2010

A minha família, com muito amor e gratidão

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus que possibilitou que eu tivesse vida, saúde, esforço de vontade e determinação para que eu pudesse conquistar mais uma importante etapa de minha vida.

Ao Prof. Dr. José Francisco Lopes Filho pela confiança, dedicação e orientação.

A Prof. Dr^a. Elisângela Corradini pelas valorosas sugestões na ocasião da participação como membro da banca de defesa da dissertação.

Ào Prof. Dr. José Antônio Gomes Vieira pelas generosas sugestões na ocasião da qualificação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro Fernando Romanelli pelas sugestões e correções precisas também na ocasião da qualificação desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, ao técnico Luiz Roberto Falleiros Júnior e alunos de Pós-Graduação, Ricardo Alexandre Fochi e Bianca Facchim Gonçalves, do Centro de Microscopia do Ibilce - UNESP pela generosa contribuição para a realização e análise de Microscopia Ótica.

Ao Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio e aluno de Pós-Graduação, Ícaro Putinhon Caruso do Departamento de Física do Ibilce-UNESP, pela contribuição e auxílio prestado para a análise de Infravermelho.

A Prof. Dr^a. Lilian Madi Ravazzi pelo auxílio prestado para a realização da análise de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Aos meus professores de graduação da Universidade Metodista de Piracicaba - UNIMEP-campus Lins-SP, pelo incentivo ao ingresso à carreira acadêmica, em especial, a minha orientadora Prof. Dr^a. Érika Maria Roel Gutierrez.

Aos meus pais, Flávio César e Maria Helena, muito obrigada por sempre me incentivarem a estudar e por me ensinarem a ter coragem, perseverança, ética e, acima de tudo, respeitar ao próximo e, *claro*, pelo auxílio financeiro, sem o qual, não seria possível dedicar-me integralmente aos estudos durante a graduação e pós-graduação. Amo vocês.

Aos meus inúmeros e amados irmãos, Mauricio, Ricardo, Roberto, Maria Luiza e Flavinho pelo incentivo e por acreditarem em mim, valeu!

Ao Diego Weiler Franco, hoje meu noivo, obrigada pelo seu positivismo... Desculpe-me pelas ausências e estresses... Você também foi muito importante por mais essa conquista.

As minhas amigas Crislene Barbosa de Almeida e Beatriz Mariani Corrêa muito obrigada por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável. Terei sempre boas recordações deste período e da amizade de vocês.

Aos amigos que fiz na Pós-Graduação, em especial, ao Ms. Marcel Oliveira e a Ângela Cardoso, colega de profissão, muitíssimo obrigada pela amizade e apoio sempre prestado em todos os momentos...

As minhas amigas de república que direta e indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho Ana Paula, Daniela, Daniely e Gisele, paz e sucesso.

Aos técnicos de laboratório do Departamento de Engenharia e Ciência de Alimentos, especialmente, Newton Mayer, Ginaldo Vieira dos Santos e Tânia Maria Venturim Gonçalves, muito obrigada pela ajuda e apoio durante minha caminhada.

Agradeço todos os funcionários da Seção de Pós-graduação, principalmente, a Rosemar Rosa de Carvalho Brena e Silvia Emiko Kazama pela presteza e simpatia.

Finalmente, agradeço imensamente a Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida durante esses anos de pesquisa.

O Senhor é meu Pastor: nada me faltará
Salmo 23

RESUMO

O propósito deste estudo foi verificar alterações na estrutura e em algumas propriedades funcionais de biofilmes produzidos com zeína adicionados de argilas modificadas. As argilas modificadas Cloisite® 15A e Cloisite® 30B foram adicionadas na solução filmogênica sob agitação nas proporções de 1, 2 e 4% em relação à massa de zeína e os filmes formados pelo método “*casting*”. Ácido oléico e glicerol foram utilizados como agentes plasticizantes. Para a caracterização da microestrutura dos biofilmes foram realizadas as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Ótica (MO) e Espectroscopia no Infravermelho (FTIR) e as propriedades funcionais avaliadas foram Opacidade, Solubilidade e Permeabilidade ao Vapor d'Água. Por meio das imagens obtidas na MEV observou-se que os acréscimos de argilas nos filmes resultaram na formação de uma microestrutura heterogênea, ou seja, estrutura de fase separada chamada de microcompósito ou tactóide, uma vez que as argilas não dispersaram no filme, o que proporcionou a formação de agregados. No entanto, por meio das imagens obtidas com a MO, observou-se uma distribuição uniforme dos glóbulos de lipídeos na matriz protéica, para todos os filmes. Em concordância com a característica da microestrutura dos filmes elaborados identificados na MEV, o FTIR foi capaz de identificar número de onda referente às argilas, indicando que a mesma não estabeleceu estruturação com a proteína, confirmando a formação de uma estrutura de fase separada tipo tactóide. Todos os filmes elaborados apresentaram maior opacidade quando comparados com o polietileno em razão da presença de pigmentos carotenóides. Pequenas diferenças na espessura das amostras e a quantidade de argila adicionada não influenciaram na transparência dos materiais. Os testes de médias de solubilidade das amostras demonstraram não haver diferença estatística entre os filmes controle e aqueles adicionados com argila. A permeabilidade ao vapor d'água dos filmes adicionados com argila não foram menores que o obtido para o controle o que permite reforçar não haver esfoliação ou intercalação da argila na matriz, mas sim uma estrutura do tipo microcompósito ou tactóide. Assim, concluiu-se ser possível produzir filmes com zeína adicionados com argila pela técnica usada, mas sem obter intercalação ou esfoliação.

Palavras-chaves: Biofilmes, Zeína, Argilas, Microcompósitos

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate changes in the structure and some functional properties of zein edible films added with modified clays. The modified clays Cloisite® 15A and Cloisite® 30B were added in the solution under agitation in the proportions of 1, 2 and 4% based on the weigh of zein. The films were formed pouring the solution on a surface to dry by casting method. Oleic acid and glycerol were used as plasticizer agents. Analyses of Scanning Electron Microscopy (SEM), Optical Microscopy (MO) and Infrared Spectroscopy (FTIR) were performed to characterize the microstructure of biofilms. The functional properties evaluated were opacity, solubility and permeability of water vapor. SEM images showed that the additions of clays in the films resulted in the formation of a heterogeneous microstructure, i.e. the phase separated structure called microcomposite or tactoids, since the clays were not dispersed in the film, which forms points of aggregates. However, the images obtained with MO showed an even distribution of lipids globules in the protein matrix, for all films. In agreement with the characteristic of the microstructure of the films showed by SEM, FTIR analyses pointed out the absence of wave number related to the clays, indicating that it was not established a really binding of the clays with the protein molecule. This confirms the formation of a material with phase separated, tactoid type. All the films prepared showed higher opacity when compared with polyethylene because of the presence of carotenoid pigments. Little differences in thickness of the samples and the amount of clay added did not influence the transparency of materials. Statistical mean tests of water solubility of the samples showed no differences among those films added with clay and the control. Water vapor permeability of the films added with clay were not lower than that obtained for the control, which permit to confirm that there were not exfoliation or intercalation of the clay in the matrix, but a formation of a microcomposite. As a general conclusion it was found that it is possible to elaborate zein films added with clay using casting technique, but without intercalation or exfoliation in the nanocomposite.

Keywords: Biofilms, Zein, Clays, Microcomposite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo estrutural da molécula de zeína: roda em hélice para a sequência de 18 repetições em Z19 e Z22.....	19
Figura 2 - Estrutura da Montmorilonita.....	21
Figura 3 - Estruturas dos nanocompósitos.....	22
Figura 4 - Modelo proposto para o caminho de difusão em "zigue-zague" em um polímero esfoliado-argila.....	32
Figura 5 - Estrutura molecular das argilas organicamente modificadas Cloisite® 15A e Cloisite® 30B.....	33
Figura 6 - Esquema do dispositivo para determinação da permeabilidade ao vapor d'água.....	38
Figura 7 - Imagens Fotográficas obtidas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos filmes: (a) controle; (b) 1% de Cloisite® 15A; (c) 2% de Cloisite® 15A e (d) 4% de Cloisite® 15A.....	45
Figura 8 - Imagens Fotográficas obtidas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos filmes: (a) controle; (e) 1% de Cloisite® 30B; (f) 2% de Cloisite® 30B e (g) 4% de Cloisite® 30B.....	46
Figura 9 - Imagem de Microscopia Ótica (MO) com fixação por <i>Xylidine Ponceau</i> para biofilmes: (a) controle; (b) 1% de Cloisite® 15A; (c) 2% de Cloisite® 15A e (d) 4% de Cloisite® 15A.....	49
Figura 10 - Imagem de Microscopia Ótica (MO) com fixação por <i>Xylidine Ponceau</i> para biofilmes: (a) controle; (e) 1% de Cloisite® 30B; (f) 2% de Cloisite® 30B e (g) 4% de Cloisite® 30B.....	50
Figura 11 - Espectro FTIR-ATR do biofilme de zeína (controle).....	51
Figura 12 - Espectro síncrono dos grupos funcionais dos filmes de zeína adicionados de 1, 2 e 4% de Cloisite® 15A.....	53
Figura 13 - Espectro assíncrono dos grupos funcionais dos filmes de zeína adicionados de 1, 2 e 4% de Cloisite® 15A.....	53
Figura 14 - Espectro síncrono dos grupos funcionais dos filmes de zeína adicionados de 1, 2 e 4% de Cloisite® 30B.....	55
Figura 15 - Espectro assíncrono dos grupos funcionais dos filmes de zeína adicionados de 1, 2 e 4% de Cloisite® 30B.....	56

Figura B1 - Exemplo esquemático de um experimento de espectroscopia de correlação 2D baseada em uma perturbação externa.....	74
Figura B2 - Exemplo de um espectro de correlação 2D- síncrono.....	75
Figura B3 - Exemplo de um espectro de correlação 2D-assíncrono.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Polímeros naturais usados na produção de filmes.....	23
Tabela 2. Média do diâmetro dos glóbulos de lipídeos dos biofilmes de zeína	47
Tabela 3. Opacidade dos biofilmes de zeína.....	57
Tabela 4. Solubilidade dos biofilmes de zeína.....	59
Tabela 5. Permeabilidade do vapor de água nos biofilmes de zeína.....	61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS.....	17
3. REVISÃO de LITERATURA.....	18
3.1. Zeína.....	18
3.2. Argilas.....	20
3.3. Biofilmes.....	23
3.4. Características do Biomaterial.....	27
3.4.1. Microestrutura.....	27
3.4.2. Espessura.....	29
3.4.3. Opacidade.....	30
3.4.4. Solubilidade.....	30
3.4.5. Permeabilidade ao vapor d'água.....	30
4. MATERIAIS e MÉTODOS.....	33
4.1. Material.....	33
4.2. Métodos.....	34
4.2.1. Preparação dos biofilmes de zeína.....	34
4.2.2. Caracterização dos biofilmes.....	35
4.2.3. Análise Estatística.....	39
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	40
5.1. Aspecto visual.....	40
5.2. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	40

5.3. Microscopia Ótica.....	47
5.4. Espectroscopia de Correlação Bidimensional com FTIR-ATR.....	51
5.5. Opacidade.....	57
5.6. Solubilidade.....	59
5.7. Permeabilidade ao vapor d' água (PVA).....	60
6. CONCLUSÕES.....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
8. ANEXOS.....	72
ANEXO A - Modos vibracionais dos grupos peptídicos característicos das proteínas (BARTH, 2007).....	72
ANEXO B - Espectroscopia de Correlação Bidimensional Generalizada (NODA e OZAKI, 2004).....	73

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, há um considerável interesse no desenvolvimento de materiais biodegradáveis como possível contribuição para solução dos problemas ambientais, uma vez que as embalagens plásticas desenvolvidas pelas indústrias são derivadas do petróleo, sendo praticamente não degradáveis (SORRENTINO et al., 2007). Nos últimos anos, vários estudos têm sido realizados visando desenvolver e caracterizar biofilmes com o potencial de aplicação principalmente nos setores alimentício e agrícola. Os polímeros utilizados para a produção de biofilmes são extraídos ou removidos da biomassa (proteínas e polissacarídeos); produzidos por microrganismos (xantana, entre outros); ou por meio da síntese química a partir de monômeros biológicos renováveis, ou ainda, pela mistura de fontes da biomassa e petróleo (ácido polilático ou bio-poliéster) (BATISTA et al., 2005; YU et al., 2006).

Dentre esses materiais, a zeína, uma das proteínas do milho, tem sido usada como um material importante na ciência e na indústria por suas propriedades únicas, uma vez que oferece vantagens potenciais como matéria prima para a produção de filmes, coberturas e aplicações plásticas; além de ser biodegradável e renovável (LAWTON, 2002). No entanto, geralmente, os biopolímeros exibem pobres propriedades mecânicas e de barreiras, as quais necessitam ser aperfeiçoadas para que eles possam ser utilizados em diferentes aplicações. Polímeros produzidos com adição de nanopartículas exibem frequentemente propriedades superiores aos compósitos convencionais como maior resistência mecânica, melhor consistência, maior estabilidade térmica e oxidativa, melhores propriedades de barreiras a gases e água, assim como retardamento à chama (SOZER, KOKINI, 2009). Essas propriedades melhoradas são geralmente alcançadas pelo espaço preenchido na matriz polimérica em comparação com os materiais convencionais. Em relação à biodegradabilidade, esses materiais também apresentam vantagens (PAVLIDOU, PAPASPYRIDES, 2008).

Para um melhor entendimento das interações entre os componentes do filme com a matriz protéica e alterações de algumas de suas propriedades funcionais, este trabalho teve o propósito de elaborar biomateriais à base da proteína zeína adicionados de nanopartículas para analisar características estruturais e propriedades funcionais de interesse desses materiais.

2. OBJETIVOS

- Elaborar filmes biodegradáveis a base de zeína adicionados de nanopartículas de dois tipos de argilas com características hidrofóbicas diferentes: Cloisite® 15A (mais hidrofóbica) e Cloisite® 30B (menos hidrofóbica).
- Identificar a estrutura básica dos biomateriais.
- Determinar as características de transparência/opacidade, solubilidade em água e de permeabilidade do vapor de água nos biofilmes.

3. REVISÃO de LITERATURA

3.1. Zeína

O grão de milho é composto do germe (4%), fibras (1,2%), amido (62%), água (15%) glúten (7,8%) e outros (10%). A técnica utilizada para obter maior rendimento dessas frações é a moagem úmida por meio da qual são realizadas operações mecânicas, transformações químicas e bioquímicas. O maior consumo de mercado do milho no Brasil destina-se a alimentação animal e em segundo lugar a moagem úmida para produzir amido e os co-produtos germe, fibra e glúten (fração protéica) (SINGH, ECKHOFF, 1996; ABIMILHO, 2009).

O glúten do milho é composto por quatro tipos de proteínas: albumina, globulina, prolaminas e glutelina. Sendo que aproximadamente 20% são globulinas e albuminas – proteínas solúveis em água e solução salina; 40% de prolaminas – proteínas solúveis em álcool e 40% de glutelinas – proteínas insolúveis em água e álcool (FORATO, 2000). Dentre as prolaminas a principal é a zeína. Esta proteína ocorre como um agregado, ligado por meio de ligações dissulfeto no grão de milho integral, podendo ser separadas pelo tamanho molecular e solubilidade em quatro tipos distintos: α , β , γ e δ . A α -zeína é a mais abundante, perfazendo 70% do total. Por ser extraída utilizando somente solução aquosa de etanol, é denominada proteína nativa. A segunda mais abundante é a γ -zeína, contribuindo com 20% do total, no entanto, para ser extraída, assim como para as demais frações, é necessário o uso de agentes redutores juntamente com o solvente (LAWTON, 2002; PADUA, WANG, 2002).

A α -zeína é a fração mais comumente encontrada em zeína comercial em pó e conforme Wang et al. (2005) ela contém dois grupos protéicos dominantes Z19 e Z22, os quais consistem em 210 e 245 aminoácidos, respectivamente. Ambos são homólogos um ao

outro: contém N-terminal com 35 a 37 aminoácidos, C-terminal com 8 aminoácidos e a porção central consiste de 9 (para a Z19) ou 10 (para a Z22) domínios repetitivos.

A estrutura da Z19 e Z22 pode ser dividida em quatro segmentos básicos: uma sequência N-terminal, uma região terminal em ciclo, nove sequências repetidas de 14 a 25 resíduos com uma média de 20 resíduos acompanhada por glutamina, e uma região C-terminal. A Z22 exibe uma inserção de 19-resíduos em C-terminal composto de uma repetição extra quando comparada com a Z19 (ARGOS et al., 1982).

Em relação à composição aminoacídica da zeína, há predominância do ácido glutâmico (21-26%), leucina (20%), prolina (10%) e alanina (10%), mas há deficiência de aminoácidos essenciais, como a lisina e o triptofano, por isso ela não é usada preferencialmente para a alimentação humana (SHUKLA, CHERYAN, 2001). A Figura 1 apresenta o modelo estrutural da zeína e a composição aminoacídica da mesma.

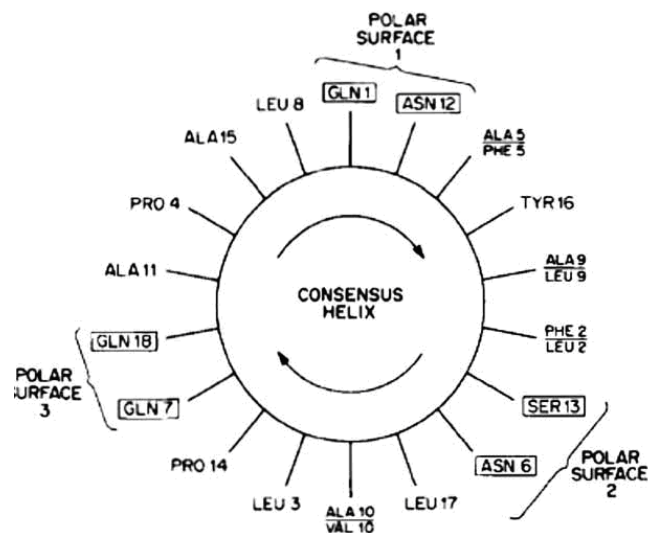


Figura 1 – Modelo estrutural da molécula de zeína: roda em hélice para a sequência de 18 repetições em Z19 e Z22

Fonte: Argos et al.(1982), com adaptações

Em razão de apresentar elevada proporção de aminoácidos hidrofóbicos, a zeína é insolúvel em água, mesmo em baixa concentração e assim, para torná-la solúvel, há necessidade de se preparar uma solução com 60 a 95% de etanol. Em álcool, acontece a

abertura parcial da estrutura em hélice da zeína proporcionando sua dissolução. A água, por ser uma molécula pequena, migra para a molécula de zeína fechada permitindo sua abertura e a molécula do solvente forma pontes de hidrogênio com o polímero (serina e treonina), tornando-a solúvel (BISWAS, 2009; TILLEKERATNE, EASTEAL, 2000).

Segundo Shukla e Cheryan (2001), a zeína pode ser utilizada para a produção ou composição de inúmeros produtos como adesivos, plásticos biodegradáveis, tintas, coberturas para alimentos, entre outros. Dentre esses possíveis usos, pesquisas têm sido feitas para a elaboração de filmes com o intuito de contribuir para a substituição dos tradicionais, feitos com petróleo, que além de serem provenientes de uma matéria prima não renovável, são grandes poluidores do meio ambiente.

3.2. Argilas

Bentonita é uma terminologia tecnológica aplicada a argilas com granulação muito fina composta essencialmente por minerais do grupo das esmectitas, dentre essas a montmorilonita é a mais comum (PAIVA et al., 2008). A montmorilonita é uma argila abundante entre as esmectitas, cuja fórmula química geral é $M_x(Al_{4-x}Mg_x)Si_8O_{20}(OH)_4$. Possui partículas de tamanhos que podem variar de 0,1µm a 2µm, com tamanho médio de ~0,5µm e formato de placas ou lâminas. Pertence ao grupo dos filossilicatos 2:1, cujas placas são caracterizadas por estruturas constituídas por duas folhas tetraédricas de sílica com uma folha central octaédrica de alumina, que são unidas entre si por átomos de oxigênio comuns a ambas as folhas (PAVLIDOU, PAPASPYRIDES, 2008). A Figura 2 mostra um esquema estrutural da montmorilonita.

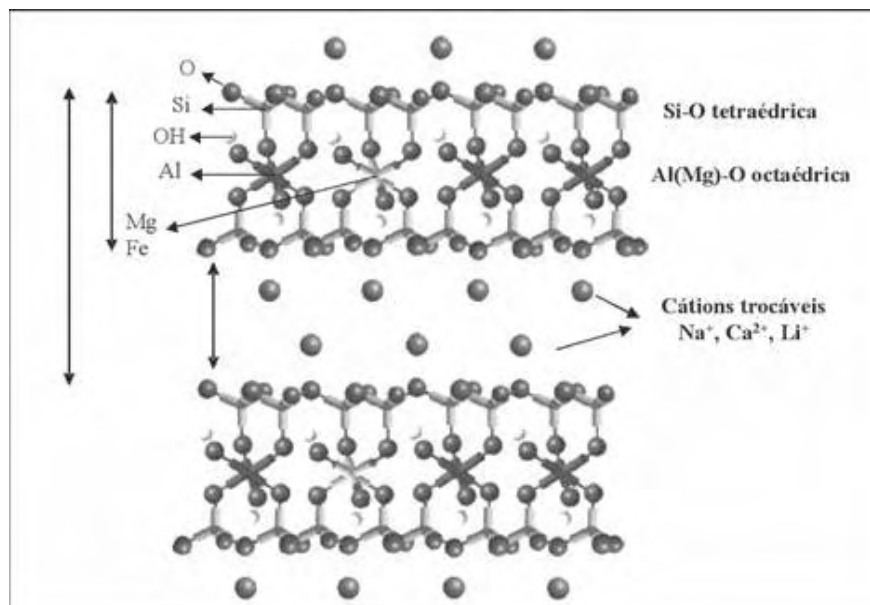


Figura 2 - Estrutura da Montmorilonita
Fonte: Paiva et al.(2008)

Segundo Rodolfo e Mei (2009), as argilas, sendo da família dos minerais, possuem uma constituição química que lhes permite a separação das camadas de silicato, a qual dará origem à formação de argilas organofílicas, com a finalidade de utilização em reforços para a produção de nanocompósitos poliméricos.

A síntese das argilas organofílicas é geralmente feita com a técnica de troca de íons. Nessa técnica, é feita a modificação superficial da argila com a substituição de cátions trocáveis presentes em suas galerias. Geralmente troca-se Na^+ por cátions orgânicos de sais quaternários de amônio (surfactantes catiônicos). Esses sais são produzidos a partir de aminas de cadeia longa usando ácidos graxos misturados com cadeias alquílicas de diferentes comprimentos. Esses compostos são extraídos de óleos e gorduras naturais como sebo, coco e dendê (PAIVA et al., 2008).

A partir das argilas organofílicas e de polímeros, são formados materiais híbridos nos quais as substâncias inorgânicas possuem dimensões nanométricas entre 1 e 100 nm e são denominados nanocompósitos (LEITE et al., 2006). As maiores vantagens desses nanocompósitos em relação aos polímeros convencionais são sua menor densidade, sua maior

rigidez, suas melhores propriedades de barreira a gases e líquidos, e sua baixa flamabilidade (COELHO et al., 2007).

Segundo Arora e Padua (2010) são três os tipos de formação polímero-argila que podem ser obtidos, denominados 1) tactóide – ocorre quando o espaço entre as galerias da argila não se expandem, geralmente devido à pobre afinidade com o polímero, ou seja, não há formação de um nanocompósito; 2) estrutura intercalada – são obtidas com moderada expansão entre as camadas de argila, assim os espaços entre as camadas de argila ligeiramente se expandem e a cadeia do polímero penetra no espaço basal da argila, ou seja, há moderada afinidade entre a argila e o polímero; 3) esfoliada – a argila perde a sua identidade de estrutura em camadas e apresentam-se separadas em folhas dentro da fase polimérica contínua, proporcionando melhores propriedades físicas e mecânicas do material. Esses tipos de interação entre as cadeias poliméricas e as partículas de argila são mostrados esquematicamente na Figura 3.

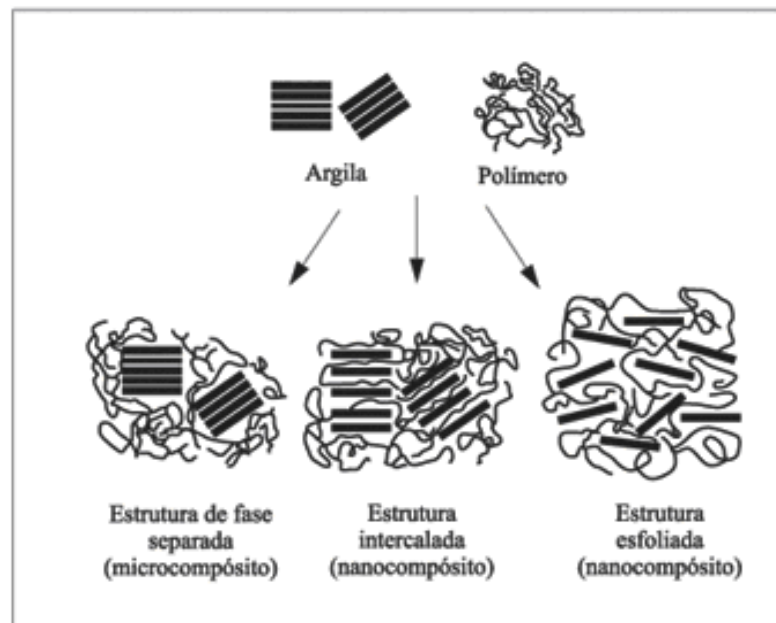


Figura 3 - Estruturas dos nanocompósitos

Fonte: Paiva et al. (2006)

3.3 Biofilmes

Biofilmes são constituídos por polímeros de fontes renováveis, que têm sido produzidos e estudados para substituir, em algumas condições, os filmes produzidos a base de produtos derivados do petróleo. Eles podem ser classificados em três grupos: 1) polímeros naturais, como amido, proteínas e celulose; 2) polímeros sintéticos de monômeros naturais, como o ácido polilático (PLA) e 3) polímeros da fermentação microbiana, como o poli-hidroxibutirato (PHB) (SORRENTINO et al., 2007). Para a elaboração desses filmes três componentes são necessários: um agente formador de filme, um solvente e um plasticizante. Yu et al. (2006) apresentam uma relação de polímeros utilizados para a elaboração de filmes, conforme ilustra a Tabela 1.

Tabela 1. Polímeros naturais usados na produção de filmes.

Polissacarídeos
• Planta/Alga: amido, celulose, pectina, alginato, carragena, gomas • Animal: ácido hialurônico • Fungo: pululana • Bactérias: quitina, quitosana, levana, xantana, poligalactosamina, gelana, dextrana
Proteínas
• Soja, zeína, glúten, caseína, albumina, colágeno/gelatina, polilisina, ácido de poliamino, poli(ácido γ-glutâmico), elastina.
Lipídeos
• Acetoglicerídeos, cera, surfactantes, emulsificantes
Polímeros especiais
Lignina, borracha natural

Fonte: Adaptada a partir de Yu et al. (2006)

Segundo Sobral (2000), para usar esses materiais em embalagens para alimentos algumas informações são imprescindíveis. Além dos parâmetros de custo e disponibilidade, devem ser conhecidas as propriedades funcionais: mecânicas, ópticas, de barreira ao vapor de água e gases, solubilidade em água e sensoriais. Essas características dependem do

biopolímero usado, das condições de fabricação (tratamento térmico da solução e uso de plastificantes) e por fim das condições ambientais (temperatura e umidade relativa). Em geral, os biopolímeros são de natureza higroscópica.

Osés et al. (2009) afirmam que as propriedades dos biofilmes comestíveis e coberturas variam grandemente devido às instabilidades intrínsecas da matéria-prima a partir da qual são produzidos. Nesse sentido, filmes a base de amido poderão ser utilizados como embalagens para frutas e vegetais, salgadinhos e produtos secos desde que sejam acrescidos de substâncias que assegurem uma redução na absorção de umidade do ambiente, uma vez que esse polímero é altamente higroscópico. Além disso, esse filme deverá possuir eficiência mecânica e proteção à umidade e oxigênio (YOSHINO et al., 2002).

As proteínas, apesar de apresentarem instabilidades intrínsecas, são muito utilizadas na elaboração de filmes. Seus biofilmes, geralmente, têm alta permeabilidade a substâncias polares, como vapor d'água e baixa permeabilidade a substâncias não polares, como oxigênio, aromas e óleos. Além disso, esses filmes apresentam características físicas indesejáveis como, dureza e fragilidade, as quais são decorrentes das fortes interações entre as cadeias de proteínas (ligação de hidrogênio, forças eletrostáticas, ligações hidrofóbicas, e/ou ligações dissulfídicas) (KROCHTA, 2002).

Embora as proteínas possuam algumas características parcialmente indesejáveis que inviabilizem seu uso para a elaboração de biofilmes, como as citadas anteriormente (alta higroscopicidade, dureza e fragilidade), essas podem ser minimizadas com o acréscimo de plasticizantes.

Os plasticizantes são definidos como substâncias com alto ponto de fusão e baixa volatilidade que, quando adicionados a outro material, provocam mudanças nas suas propriedades físicas, químicas e mecânicas (McHUGH, KROCHTA, 1994 (b)). Em biofilmes, eles competem pela ligação de hidrogênio e interações eletrostáticas entre as cadeias dos

polímeros, e, conseqüentemente, reduzem a interação entre as mesmas, tornando o filme mais flexível (KROCHTA, 2002).

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de verificar as modificações proporcionadas pela adição de diferentes plasticizantes em biofilmes (LAI, PADUA, 1997; LAI, PADUA, 1998; SANTOSA, PADUA, 1999; BATISTA et al., 2005; BERTAN et al., 2005). Dentre esses estudos, Lawton (2004) observou o comportamento de filmes elaborados à base de zeína adicionados de diferentes plasticizantes em diferentes umidades relativas (UR). Os plasticizantes investigados foram: dibutil-tartrato (DBT), trietileno glicol (TEG), polietileno glicol (PEG), ácido levulínico (LA), glicerol (GLI) e ácido oléico (OA). O tipo de plasticizante utilizado para a elaboração do filme exerceu grande efeito na adsorção de água, sendo os DBT e OA os mais hidrofóbicos e GLI e TEG mais higroscópicos, assim, filmes adicionados de plasticizantes higroscópicos apresentaram piores propriedades de tração em maiores umidades relativa.

Estudo semelhante realizado por Lai e Padua (1998) em filmes de zeína produzidos pela técnica “*casting*”, adicionados de ácido oléico, em diferentes condições de umidade relativa (50-98%), houve melhoria nas propriedades de força de tensão e alongação e diminuição do Módulo de Young para a faixa de umidade relativa entre 50 a 75%, em relação à amostra controle (sem ácido oléico). No entanto, em umidades relativas elevadas, houve piora nas propriedades de tração devido à hidratação do filme, que se tornou encharcado e enrolado.

Visando a obtenção de melhorias nas propriedades mecânicas e de barreira de filmes, não somente o uso de plasticizantes é efetivo. Polímeros produzidos com adição de nanopartículas, especialmente, argilas exibem frequentemente propriedades superiores aos compósitos convencionais viabilizando o uso dos mesmos em substituição aos sintéticos.

Vários estudos têm considerado a adição de diferentes argilas em matrizes de polímeros naturais para formar nanocompósitos com melhores propriedades funcionais.

Park et al. (2002) ao elaborarem filmes de amido termoplástico (TPS) acrescidos de diferentes tipos de argilas modificadas (Cloisite® 30B, 10A e 6A) e não modificada (Cloisite® Na⁺) verificaram que a melhor dispersão em nanoestrutura foi obtida com a Cloisite® Na⁺, uma vez que, segundo esses autores, a dispersão das argilas modificadas na matriz TPS depende da hidrofilicidade das argilas e especialmente da interação polar entre a camada da argila e o polímero. Além disso, acrescentam que a dispersão de apenas 5% de argila no amido foi suficiente para melhorar a resistência à tração e a propriedade de barreira.

Mangiacapra et al. (2005), ao produzirem biofilmes a base de pectina e montmorilonitas obtiveram a formação de uma estrutura esfoliada (nanocompósito), a qual possibilitou obter melhorias na propriedade funcional do biofilme, sendo uma delas, a redução da difusão de oxigênio. Esses autores afirmaram que a técnica utilizada para a mistura do polímero com a argila utilizando um moinho de bola foi fundamental para promover a dispersão desses constituintes. Essa técnica tem por finalidade reduzir o tamanho da partícula do polímero e da argila e facilitar interações entre eles resultando na melhor dispersão da argila na matriz polimérica. Outra melhoria foi observada nas propriedades físicas na presença de nanocompósitos em biofilmes preparados com quitosana e montmorilonita (DARDER et al., 2003).

Biofilmes a base de gelatina acrescido de 2% de montmorilonita, incorporados por meio da combinação de técnicas de agitação mecânica e ultrassom, foram suficientes para proporcionar uma intercalação e/ou parcial esfoliação entre os nanocompósitos. Consequentemente, inúmeros benefícios foram obtidos, como aumento da estabilidade térmica, decorrente da forte interação entre os compósitos, a qual retardou a decomposição

térmica da gelatina até certo grau. Assim, os autores afirmam que a nanodispersão da montmorilonita resultou em um excelente efeito de barreira (ZHENG et al., 2002).

Em trabalho recente, Luecha, et al. (2010) adicionaram argilas organofílicas à matriz polimérica de zeína utilizando duas técnicas para formar nanocompósitos: “*casting*” agitação mecânica em combinação com ultrassom e a extrusão. Apesar dessas técnicas promoverem alto cisalhamento, não foram suficientes para desagregar ou esfoliar a estrutura em “*clusters*” da argila, uma vez que por análise de Difração de Raios-X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) observou-se uma estrutura parcialmente esfoliada. Esses autores afirmam que mais estudos são necessários para compreender o rearranjo dos filmes de zeína/argila.

3.4. Características do Biomaterial

3.4.1 Microestrutura

As análises de microestrutura têm como objetivo investigar o arranjo estrutural de materiais e fornecer informações sobre o papel de componentes individuais que afetam as propriedades do produto final (GUO et al., 2005).

Inúmeras técnicas são utilizadas para avaliar microestruturas, como as Microscopias Eletrônica de Varredura, Eletrônica de Transmissão e de Força Atômica e a Técnica de Difração de Raios-X, as quais têm sido utilizadas para detectar o grau de intercalação/esfoliação de filamentos inorgânicos em polímeros (MANGIACAPRA et al., 2005).

O uso das técnicas de Difração de Raios-X e Microscopia Eletrônica de Transmissão, em filmes à base de gelatina acrescidos de argila (elaborado pela técnica de mistura com alto cisalhamento), proporcionou a visualização de uma estrutura bem esfoliada e dispersa. Assim, o uso dessa microscopia possibilitou verificar a orientação das nanopartículas no filme, que

ficaram paralelas a sua superfície (RAO, 2007). Esse autor afirma que a técnica utilizada para a elaboração dos materiais permite obter diferentes disposições das nanopartículas na matriz do filme e em biofilmes elaborados por fusão obtém-se geralmente uma estrutura heterogênea. Arora e Padua (2010) afirmam que a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) permite determinar a estrutura do polímero, distribuição dos componentes, forma e tamanho da argila, cristalinidade local e tamanho do cristal.

Fukushima et al. (2009) usando Difração de Raios X a altos ângulos (WAXS) para análises de filmes feitos a base de poli(ácido láctico) e argila organofílica (Cloisite® 30B), observaram uma boa interação entre ambos os constituintes, havendo diminuição da intensidade do pico (WAXS), o que representou a formação de uma estrutura desordenada. Correlacionado a isso, a Microscopia Eletrônica de Varredura revelou, também, bom grau de dispersão da argila sem a presença de agregados.

Sanchez-Garcia et al. (2010) elaboraram biofilmes a base de zeína, carragena e mica com o uso apenas de agitação dos componentes e da técnica “*casting*”. Esses caracterizaram a microestrutura do material por meio de uma combinação de técnicas, entre elas a Microscopia Eletrônica de Varredura. Esses autores observaram que o filme feito somente com zeína, glicerol (plasticizante) e mica, apresentou pouca dispersão da argila quando comparado com filmes da blenda carragena e zeína com adição de até 5% de mica. Assim, concluíram que a zeína tem pouca afinidade pela argila.

De Almeida et al. (2010) utilizando análise por FTIR-ATR em biofilmes, verificaram a microestrutura a base de zeína e goma xantana. Eles identificaram a presença de modos vibracionais dos grupos peptídicos característicos de proteínas definidos conforme Barth, (2007), cujas definições e suas características encontram-se no ANEXO A do presente trabalho. Devido à dificuldade de esclarecer qual grupamento químico era responsável por determinado número de onda (se a zeína ou a xantana) eles realizaram o espectro de

correlação bidimensional (2D), o qual identificou qual grupamento químico realizou a interação. Logo, a adição de xantana afetou primeiramente a ligação C=O do grupo amida I na região de 1650 cm^{-1} e então o grupo funcional N-H da amida II na região de 1540 cm^{-1} , ambos da zeína. Posteriormente houve fraca correlação entre as amidas I e II da zeína com os ácidos carboxílicos (1710 cm^{-1}), CH_3 (2850 cm^{-1}) e CH_2 (2920 cm^{-1}) a partir de compostos alifáticos.

Para analisar as microestruturas dos biofilmes elaborados nesse estudo foi feito o uso de uma combinação das técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Ótica (MO) e por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier - Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR).

3.4.2 Espessura

A técnica “*casting*” é útil em formar filmes não fixos em um objeto e é a técnica mais utilizada para analisar as propriedades filmogênicas dos biomateriais. Consiste na aplicação da solução em suportes adequados, seguida de secagem em condições controladas (MONTERREY-QUINTERO, SOBRAL, 2000).

A espessura é um importante parâmetro de medida, pois é a base para várias propriedades dos filmes, incluindo as mecânicas e as de permeabilidade (XIE et al., 2002). Segundo Gennadios et al. (1993) e Sobral (1999), o controle da espessura dos filmes é importante para manter sua uniformidade, permitindo a repetitividade das propriedades analisadas e assim validar as comparações entre suas propriedades.

3.4.3 Opacidade

A avaliação da opacidade de um material demonstra sua maior ou menor transparência. A baixa transparência é caracterizada pelo bloqueio da passagem de luz. Para a elaboração de biofilmes que visam utilização como embalagens ou ainda como coberturas para alimentos, uma maior transparência tende a ser melhor quando se deseja manter as características originais do produto, como a cor, por exemplo (YANG, 2000). O grau de opacidade depende do conteúdo e do tamanho das partículas de lipídio. A adição de lipídeos muda a aparência dos filmes que se torna mais opaca (BERTAN, 2005). Supõe-se também que a adição de nanopartículas na solução filmogênica possa modificar a transparência dos filmes.

3.4.4 Solubilidade

A solubilidade em água é uma propriedade importante dos filmes no que se refere ao seu emprego, pois algumas aplicações requerem insolubilidade em água para manterem a integridade do produto, como na formulação de pílulas farmacêuticas e sementes. Segundo Veiga-Santos (2004), a determinação da solubilidade em água de filmes biodegradáveis é importante, uma vez que a grande maioria dos filmes elaborados a partir de carboidratos e proteínas possuem grande afinidade com a água.

3.4.5 Permeabilidade ao vapor d'água

A permeabilidade ao vapor d'água é outro fator que interfere na qualidade e vida de prateleira dos alimentos embalados com esses filmes, pois a entrada do vapor d'água através da embalagem pode provocar danos na qualidade e conservação, permitindo o

desenvolvimento de microrganismos nocivos ou provocando alterações de aparência e peso do material embalado. A barreira à umidade em plásticos pode ser avaliada através da determinação da taxa de permeabilidade ao vapor de água (PVA), que é a quantidade de água que passa através de uma unidade de área, por unidade de tempo, a uma determinada temperatura e determinada umidade relativa (SCHNEIDER, TORRES, 2006).

Segundo Sobral (1999), a PVA é considerada uma das propriedades de barreira de materiais e o seu conhecimento é imprescindível para eventuais aplicações dos filmes em embalagens, porém não é uma propriedade restritiva. Um material muito permeável ao vapor d'água poderá ser indicado para embalagens de vegetais frescos, enquanto um filme pouco permeável poderá ser indicado, por exemplo, para produtos desidratados.

A grande redução da permeabilidade ao vapor de água em biofilmes é obtida por meio da adição de lipídeos ou cera na estrutura do mesmo. A proteína, nos filmes com esse tipo de matriz, proporciona a integridade estrutural do material, enquanto o lipídeo ou cera hidrofóbica sustentam uma barreira à umidade (KROCHTA, 2002).

Segundo Wolf (2007), a permeabilidade do vapor depende de vários fatores externos como temperatura, umidade relativa e pressão e do tipo de material usado na confecção do filme. Em filmes confeccionados em laboratório por Lai e Padua (1998) utilizando zeína industrial, a permeabilidade ao vapor d'água foi relativamente baixa ($0,06 \text{ g.mm/m}^2.\text{h.kPa}$ a 25°C) quando comparado à permeabilidade de polímeros hidrofílicos produzidos de glúten do trigo ($2,2 \text{ g.mm/m}^2.\text{h.kPa}$ a 21°C) (PARK, CHINNAN, 1995), mas com ordem de grandeza maior que os filmes de polietileno de baixa densidade (PEBD) ($0,003 \text{ g.mm/m}^2.\text{h.kPa}$ a 38°C) (SMITH, 1986). Segundo Lai e Padua (1998), a temperatura também afeta a permeabilidade ao vapor sendo menor a 25°C do que a 5, 15 ou 35°C .

Inúmeros autores se interessam pelo efeito dos plasticizantes sobre a PVA dos filmes, sabendo-se que a PVA tende a aumentar com o incremento dos mesmos (SOBRAL, 1999).

Segundo a literatura, os plasticizantes diminuem as forças intermoleculares entre as cadeias de macromoléculas adjacente dos polímeros, e consequentemente, aumentam a flexibilidade (diminuindo a resistência do material), afetando todas as propriedades funcionais dos biofilmes, inclusive a PVA (CUQ et al., 1997; SOBRAL, 1999; SANTOSA; PADUA, 1999).

Segundo Pavlidou e Papaspyrides (2008), o acréscimo de argilas na elaboração de filmes promove melhorias nas propriedades de barreiras, as quais podem ser explicadas pelo conceito do caminho tortuoso. Assim, quando nanopartículas impermeáveis são incorporadas em um polímero outras partículas ou substâncias são forçadas a passar feito um “zigue-zague”, por isso, devido à dificuldade em atravessar o filme, há redução da difusão de líquido e gases como representado pela Figura 4.

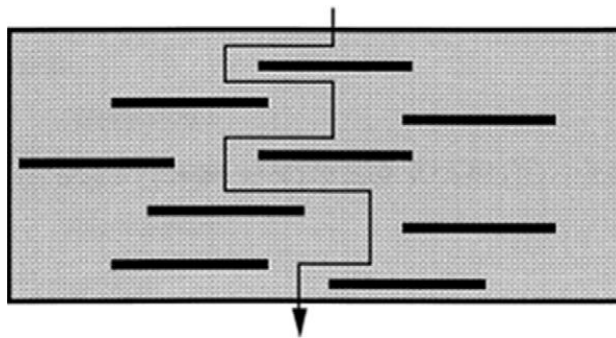


Figura 4 - Modelo proposto para o caminho de difusão em “zigue-zague” em um polímero esfoliado-argila.

Fonte: Pavlidou e Papaspyrides (2008)

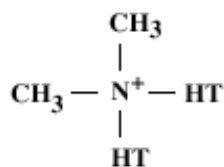
Com o intuito de reduzir a permeabilidade ao vapor de água em filmes a base de amido-argila, Tang et al. (2008) verificaram que o acréscimo de plasticizantes em diferentes concentrações pode afetar a formação da nanoestrutura e, consequentemente, alterar propriedades térmicas, de barreira e mecânica. O filme elaborado com glicerol a 5% proporcionou adequada barreira à permeabilidade de vapor de água e resistência a tração, porém a elongação do filme foi baixa, apresentando-se duro e frágil. Maiores concentrações do mesmo aumentaria a hidrofiliabilidade dos filmes de amido, pois sítios hidroxil ficariam expostos, podendo absorver água.

4. MATERIAIS e MÉTODOS

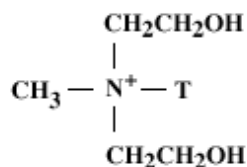
4.1 Material

A zeína (F-4000) foi obtida da indústria “Freeman Industries, Inc. NY, USA”. O ácido oléico (VETEC, Brasil), o glicerol (Merck, Brasil) e o emulsificante (EMUSTAB - Duas Rodas Industrial Ltda, Brasil) foram adquiridos no comércio local.

As argilas modificadas utilizadas foram a Cloisite® 15A e 30B, adquiridas da Southern Clay Minerals, Inc. (EUA). Tanto a Cloisite® 15A e 30B são montmorilonitas naturais, modificadas com um sal quartenário de amônio e também compostas por uma mesma mistura de alcanos constituindo aproximadamente 65% C₁₈, 30% C₁₆ e 5% C₁₄ (indicadas na Figura 5 pela letra “T”) e foram incorporadas na proporção de 1, 2 e 4% em relação à massa de zeína. A Cloisite® 15A é uma montmorilonita baseado em uma cadeia dimetil ligada a uma cadeia graxa, desengordurada, de origem animal (sebo). Ela possui como referência um valor de espaçamento interlamelar (d₀₀₁) igual a 31,5 Å e tamanho de partículas variando de 2 a 13 µm. A Cloisite® 30B é uma montmorilonita baseado em metil-2-hidroxietyl, aclopada a uma cadeia graxa de origem animal (sebo). Essa argila possui como referência um valor de espaçamento interlamelar (d₀₀₁) igual a 18,5 Å e tamanho de partículas variando de 2 a 13 µm.



Cloisite® 15A



Cloisite® 30B

Figura 5 - Estrutura molecular das argilas organicamente modificadas Cloisite® 15A e Cloisite® 30B

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação dos biofilmes de zeína

Para a formação dos filmes controle, a zeína (20 g/100 mL etanol) foi solubilizada em solução aquosa de etanol a 75% em agitador magnético por 5 minutos. Em seguida foram lentamente acrescentados: ácido oléico (70 g/100 g proteína) e glicerol (30 g/100 g proteína), como coadjuvante do agente plastificante e o emulsificante. Essa solução foi agitada a 250 rpm em temperatura de 63-65 °C durante 10 minutos, conforme Kleen et al. (2002). A solução foi então despejada sobre folhas de polietileno com espessura de 0,380 mm, aproximadamente, e o material mantido à temperatura ambiente (25 °C) sobre superfície nivelada durante 24 horas para secagem seguindo procedimento de Lai e Padua (1998). Após a secagem, os filmes foram retirados e armazenados para análises posteriores em dessecadores com umidade relativa de 58% durante 72 horas.

Três testes experimentais preliminares foram realizados visando obter a melhor técnica de dispersão das argilas Cloisite® 15A e 30B. No primeiro teste, o filme foi elaborado conforme o descrito para a amostra controle, sendo a argila adicionada em pó após a adição do emulsificante. Como resultado, obteve-se um filme visualmente não homogêneo, com diferentes colorações e presença de partículas dispersas.

A segunda tentativa de dispersão da argila no filme foi adicioná-la em pó durante a solubilização da zeína na solução alcoólica a 75%. Em seguida, acrescentaram-se os plasticizantes e emulsificante enquanto a solução era homogeneizada a 250 rpm por 10 minutos a 63-65 °C. O filme obtido também teve baixa homogeneidade, além de apresentar-se duro e quebradiço.

Para melhorar a dispersão da argila na solução filmogênica e no filme foram utilizadas as seguintes proporções argila/zeína: 1:100, 2:100, 4:100 (g de argila por 100 g de zeína) correspondendo às concentrações de 1, 2 e 4%, respectivamente. A argila foi previamente

dispersa em 15 mL de água sob agitação mecânica por 10 minutos. Essa mistura foi lentamente acrescentada à solução de zeína já contendo ácido oléico (70 g/100 g proteína), glicerol (30 g/100 g proteína) e emulsificante (5 g/100 g proteína). Toda a solução resultante foi agitada por 10 minutos a 250 rpm em temperatura de 63-65 °C e colocada em superfície plana para secagem.

4.2.2 Caracterização dos biofilmes

Aspecto visual

Após a secagem dos filmes foram realizadas análises visuais e táteis visando separar somente aqueles com boa homogeneidade. Os parâmetros considerados nessa verificação foram: coloração, espessura, presença de partículas insolúveis, continuidade dos filmes, isto é, sem apresentar rupturas ou zonas quebradiças, a facilidade na sua retirada da superfície, filmes com boa manuseabilidade quando retirado do suporte. Os filmes e formulações que não apresentaram essas características foram descartados uma vez que poderiam comprometer os resultados.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microestrutura superficial dos filmes foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Departamento de Biologia Animal da UNESP, *campus* de São José do Rio Preto. A sequência para a preparação do espécime incluiu montagem sobre os *stubs* e *sputtering* (metalização). Amostras dos filmes foram fixadas em suportes de alumínio (*stubs*) de cerca de 12 mm de diâmetro, em duplicata, com fita condutiva face dupla de cobre. Essas amostras foram recobertas com ouro na espessura de 35 nm (EMITECH K550) por aproximadamente 2-3 minutos e, em seguida, observadas em microscópio eletrônico de

varredura (LEO 435 VP) a 15 kV em sala climatizada. As observações foram realizadas com aumentos médio de 500 vezes.

Microscopia Óptica

A microscopia óptica foi realizada no Laboratório de Microscopia da UNESP, *campus* de São José do Rio Preto. Foi utilizada a técnica de coloração *Xylidine Ponceau* pH 2,5 onde após a coloração, as lâminas foram secas em estufa (Odontobras ECB 1.2 Digital) por 24 horas a aproximadamente 37 °C. Após este período, foram pingadas 4 gotas de Bálsamo de Canadá sobre a lâmina e a lamínula colocada na superfície. Por 24 horas as lâminas secaram em temperatura ambiente (25 °C) para então serem analisadas em microscópio Olympus BX60 com captador de imagens (Olympus DP-71, U-CMAD-2, U-TV1X) em aumento de 10 vezes. Os diâmetros de 20 glóbulos de lipídeos de cada amostra foram mensurados em triplicata com o auxílio do *software* Image-Pro Plus© Media Cybernetics versão 4.5 para Windows MD, USA.

Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier - Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

A análise FTIR-ATR dos sete tipos de filmes foi realizada no Departamento de Física da UNESP, *campus* de São José do Rio Preto. Amostras de aproximadamente 7x70 mm foram analisadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada (FTIR-ATR) no espectrofotômetro Nexus 670 FT-IR (Nicole, USA). Os espectros foram obtidos utilizando 128 “*scans*”, na região de 4000 a 1200 cm^{-1} com resolução 4 cm^{-1} . Esta é a faixa do infravermelho médio onde se encontram os espectros das proteínas.

Para melhor visualização do espectro de uma dimensão e visando eliminar a sobreposição de bandas que o compõem, foi realizada a Espectroscopia de Correlação

Bidimensional, a qual é de extrema utilidade no estudo de macromoléculas biológicas, cujos detalhes da análise são esclarecidos no ANEXO B, conforme Noda e Ozaki (2004).

Espessura

A espessura foi obtida pela média aritmética dos valores de seis pontos aleatórios em diferentes segmentos dos filmes, utilizando-se um micrômetro digital com resolução 0,001 mm (modelo Digimess).

Opacidade/Transparência

A opacidade das amostras foi determinada, em triplicata, em um espectrofotômetro (Biospectro, SP-220) como proposto por Gounga et al. (2007) e Cao et al. (2007). Os filmes foram cortados em retângulos e aderidos à parede interna da cubeta do espectrofotômetro. Nessas condições, foi varrida a faixa do comprimento de onda da luz visível de 200 a 800 nm. As medidas foram feitas seis vezes para cada biofilme e uma média foi levada como resultado. A transparência dos filmes foi calculada através da Equação 01.

$$Transpar. = \frac{A_{600}}{X} \quad (01)$$

onde:

A 600 = absorbância à 600 nm

X = espessura dos filmes

Solubilidade em água (SOL)

A determinação da solubilidade (SOL) em água dos filmes foi realizada conforme Davanço (2006) e Veiga-Santos (2004). Inicialmente, três discos de cada amostra de filme com 20 mm de diâmetro, foram cortados e submetidos à secagem por 24 horas a 105 °C, sendo posteriormente pesados. As amostras foram imersas em 50 mL de água destilada,

mantidos sob agitação lenta e constante (72 rpm) por 24 horas à temperatura de 25 °C em shaker (Marconi, MA-410). Os fragmentos de filme restante foram então retirados do shaker e secos em estufa a 105 °C por 24 horas para determinação da massa seca final dos mesmos. A solubilidade foi calculada como a relação entre a matéria seca final e a matéria seca inicial dividida pela matéria seca inicial.

Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada gravimetricamente a 25 °C utilizando-se o método padrão E-96-95 da American Society for Testing and Material (ASTM, 2002), conforme esquema da Figura 6.

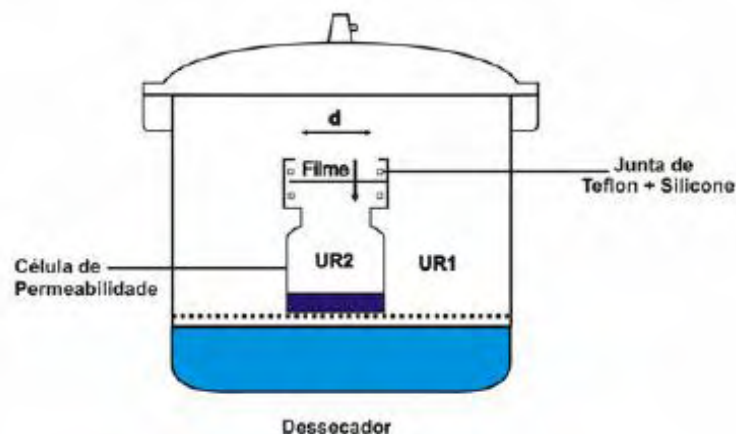


Figura 6 - Esquema do dispositivo para determinação da permeabilidade ao vapor d'água.

A difusão de umidade através do biofilme levou ao aumento de peso da célula devido a absorção de umidade pela sílica gel, que foi registrado em balança analítica (0,0001 g) em intervalos de 24 horas durante 8 dias (estado estacionário). A condição de estado estacionário foi considerada quando atingiu peso constante da célula. As determinações foram realizadas em triplicata.

O cálculo dos valores de PVA foi obtido utilizando-se a Equação 02.

$$PVA = \frac{m.e}{t.A.\Delta p} \quad (02)$$

onde,

PVA: permeabilidade ao vapor de água (g.mm/h.m².kPa)

m: diferença de peso (quantidade de permeante que atravessa o filme) (g)

e: espessura do filme (mm)

t: tempo no qual ocorre ganho de massa (horas)

A: área exposta do filme (m²)

Δp : diferença de pressão parcial de vapor de água a 100% UR e 0% UR, ambos a 25 °C (KPa)

4.2.3 Análise Estatística

Análises de variância (ANOVA) dos dados foram realizadas considerando-se um planejamento experimental casualizado e teste de Tukey com 5% de probabilidade foi aplicado para comparar as médias. Utilizou-se o programa computacional – Statistica 7.0 *software* (Statsoft).

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1 Aspecto visual

Os filmes utilizados para as análises foram previamente classificados visualmente em relação à homogeneidade das amostras (livre de partículas insolúveis – não interação com a matriz), espessura uniforme e boa maleabilidade. Dentre as sete amostras desse estudo apenas a com 4% de Cloisite® 15A não apresentou essas características, proporcionando a visualização de finas partículas insolúveis após a secagem. Assim, outros lotes dessa amostra foram feitos, mas a mesma aparência foi observada, sugerindo não ter ocorrido incorporação da argila na matriz protéica do filme.

Pelo tato notou-se que as amostras acrescentadas de Cloisite® 15A e 30B eram, em sua maioria, mais espessas e resistentes do que o controle produzido somente com zeína e plasticizante. Isso pode ser devido à maior fluidez da solução filmogênica observada para a amostra controle e também a algum tipo de interação entre os Cloisites e a matriz.

As espessuras para a amostra controle variaram de 0,14 a 0,20 mm e para as amostras adicionadas de argila 0,22 a 0,28 mm.

5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As Figuras 7 e 8 apresentam as micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), respectivamente, para as amostras controle e adicionadas com 1, 2 e 4% de Cloisite® 15A e com 1, 2 e 4% de Cloisite® 30B. Repetiu-se a foto do controle (a) nas duas Figuras para facilitar a comparação dos diferentes tratamentos.

Padua e Wang (2002) afirmaram que os filmes quando produzidos pela técnica “*casting*” apresentam formas distintas decorrentes do processo de secagem proporcionando

diferenças morfológicas entre os dois lados: o superior em contato com o ar e o inferior em contato com a superfície. Durante a secagem o lado que fica na superfície de contato é mais homogêneo e brilhante resultando numa microestrutura mais lisa sem uma característica definida, enquanto o lado em contato com o ar apresenta-se irregular e opaco, com uma microestrutura mostrando depósitos globulares. Assim, ao observar as Figuras 7 e 8, conclui-se que o lado das amostras utilizados para a visualização das imagens foi o que estava em contato com o ar, uma vez que a estrutura era bem definida e havia a presença de depósitos globulares.

Em relação à natureza desses depósitos globulares, Monterrey-Quintero e Sobral (2000) sugeriram que esses pontos pretos fossem micro-bolhas incrustadas na matriz ou espaços ocupados pelo glicerol antes do processo de secagem. No entanto, Corradini (2004) afirmou que há possibilidade dessas serem decorrentes da separação de fase entre a zeína e o glicerol devido à baixa interação entre esses dois componentes.

De Almeida et al. (2010), ao realizarem análise de Microscopia Eletrônica de Varredura em filmes a base de zeína elaborados com ácido oléico e glicerol, observaram também a formação de pontos negros e redondos. Visando identificar se a presença de depósitos globulares se tratava de glóbulos de lipídeos, esses autores realizaram análise de Microscopia Ótica e concluíram que as observações previamente consideradas como poros na (MEV) eram de fato glóbulos de lipídeos dispersos na matriz filmogênica.

A partir dessas informações da literatura está indicado com setas de diferentes cores, nas Figuras 7 e 8, os componentes do filme. Assim, a cor verde mostra a presença de poros; a vermelha de glóbulos de lipídeos; a amarela da suposta incorporação da argila à matriz e a de cor azul a argila dispersa, ou seja, não incorporada à matriz protéica.

Ao comparar a imagem do controle (a) com as demais imagens das Figuras 7 e 8, adicionadas de argila, observa-se uma maior predominância de poros no controle e também

nítidos glóbulos de lipídeos, indicando uma estrutura mais uniforme. Porém, os filmes com argilas apresentaram estrutura heterogênea em função da má dispersão dessas na matriz. Quanto maior foi a concentração da argila na formulação do filme, menor a dispersão na matriz, formando zonas incrustadas. A não dispersão de argila na matriz foi claramente perceptível para todas as amostras, exceto no tratamento da Figura 7(b) provavelmente em razão da menor qualidade da imagem.

Conforme descrito anteriormente, houve maior dificuldade no preparo da solução filmogênica dos filmes elaborados com a Cloisite® 15A do que com a Cloisite® 30B devido à natureza hidrofóbica da mesma, assim, quanto maior a proporção da mesma (4% de Cloisite® 15A) maior foi a proporção de finas partículas insolúveis. Por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e da imagem da Figura 7(d), confirma-se que quanto maior a proporção dessa argila adicionada ao filme, maior foi a predominância de partículas insolúveis de argila, quando comparado com a imagem 7(c), ou seja, o acréscimo dessa argila em biofilmes de zeína resultou na formação de uma microestrutura heterogênea (tactóide) com a presença de pequenas quantidades de partículas dispersas na matriz e a grande maioria de não dispersas. Isso é uma característica de formação de tactóides onde há pouca interação com a matriz.

Em trabalho recente, Arora e Padua (2010) verificaram que a dispersão de argilas em matrizes poliméricas é afetada pela característica hidrofóbica/ hidrofílica dos polímeros e das argilas. Os polímeros são tipicamente hidrofóbicos enquanto as argilas hidrofílicas. As modificações das argilas tornam suas superfícies mais hidrofóbicas melhorando a sua compatibilidade com os polímeros. Segundo esses autores, as nanopartículas são capazes de se dispersarem na matriz polimérica se os seus tamanhos forem menores que o raio de giro do polímero.

Embora a Cloisite® 30B seja uma argila modificada com a adição de sal quartenário de amônio, ela contém a presença de grupamento –OH, sendo mais hidrofílica que a outra argila utilizada no presente estudo, portanto a solubilização da Cloisite® 30B na solução filmogênica foi obtida mais facilmente. No entanto, com o uso de uma matriz predominantemente hidrofóbica (a zeína) observou-se uma baixa incorporação das nanopartículas. As Figuras 8 (e-g) mostram as estruturas de tactóides e aglomerações de partículas não dispersas.

Verifica-se pelos resultados do presente estudo uma concordância com as observações de Arora e Padua (2010), pois as argilas utilizadas aqui, Cloisite® 15A e Cloisite® 30B, são modificadas com a adição de sal quartenário de amônio e não foram capazes de se intercalarem na matriz da proteína. No caso presente, o espaço interlamelar das Cloisite® 15A e Cloisite® 30B são, respectivamente, 31,5 Å e 18,5 Å. Esses valores são superiores ao encontrado para filmes de zeína-ácido oleico apresentados por Wang et al. (2005) usando análise por Difração de Raios-X de altos ângulos (WAXS). Esses autores obtiveram picos entre 4,5 Å e 10 Å. Assim, verifica-se que o tamanho das nanopartículas é superior ao espaçamento interno da matriz de zeína, não sendo possível sua intercalação ou ocupação do espaço interlamelar.

McAdam et al. (2008) afirmaram que para promover a intercalação de argilas em matrizes poliméricas é necessário que se faça uso de técnicas com alta força de cisalhamento ou ultrassom para desagregar os “*clusters*” do produto (formato de pilhas das argilas) e assim resultar em uma maior área da superfície exposta para intercalar-se ao polímero.

Entretanto, em recente estudo realizado por Sanchez-Garcia et al. (2010), sobre o desenvolvimento de blendas entre carragena e zeína com adição de até 5% de mica feito pela técnica de agitação e “*casting*”, foi possível obter uma morfologia dispersa em relação a mica. Esses autores observaram por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) que

filmes feito somente com zeína, glicerol (plasticizante) e mica, apresentaram muito pouca dispersão da argila quando comparado com filmes da blenda carragena e zeína com adição de até 5% de mica. Assim concluíram que a zeína tem pouca afinidade pela argila.

A análise de MEV do presente estudo sugere que vários fatores podem ter contribuído para a formação de um filme heterogêneo quando da adição das argilas. Um deles é que a técnica de agitação e o método “*casting*” foram incapazes de promover uma melhor dispersão da argila em razão da baixa energia de interação (cisalhamento) entre os componentes, o que ocorre quando se usa outros métodos como extrusão ou ultrassom. A homogeneização da argila em água também pode ter sido insuficiente; outra possível causa para a baixa interação entre os componentes pode ter sido a elevada quantidade de plastificante que pode ter dificultado a interação entre a argila e o filme; e por último, o tipo de argilas utilizadas que possuem espaçamento interlamelar maior que o da matriz. Além disso, ressalta-se a baixa afinidade da zeína com a argila, nas condições consideradas neste estudo.

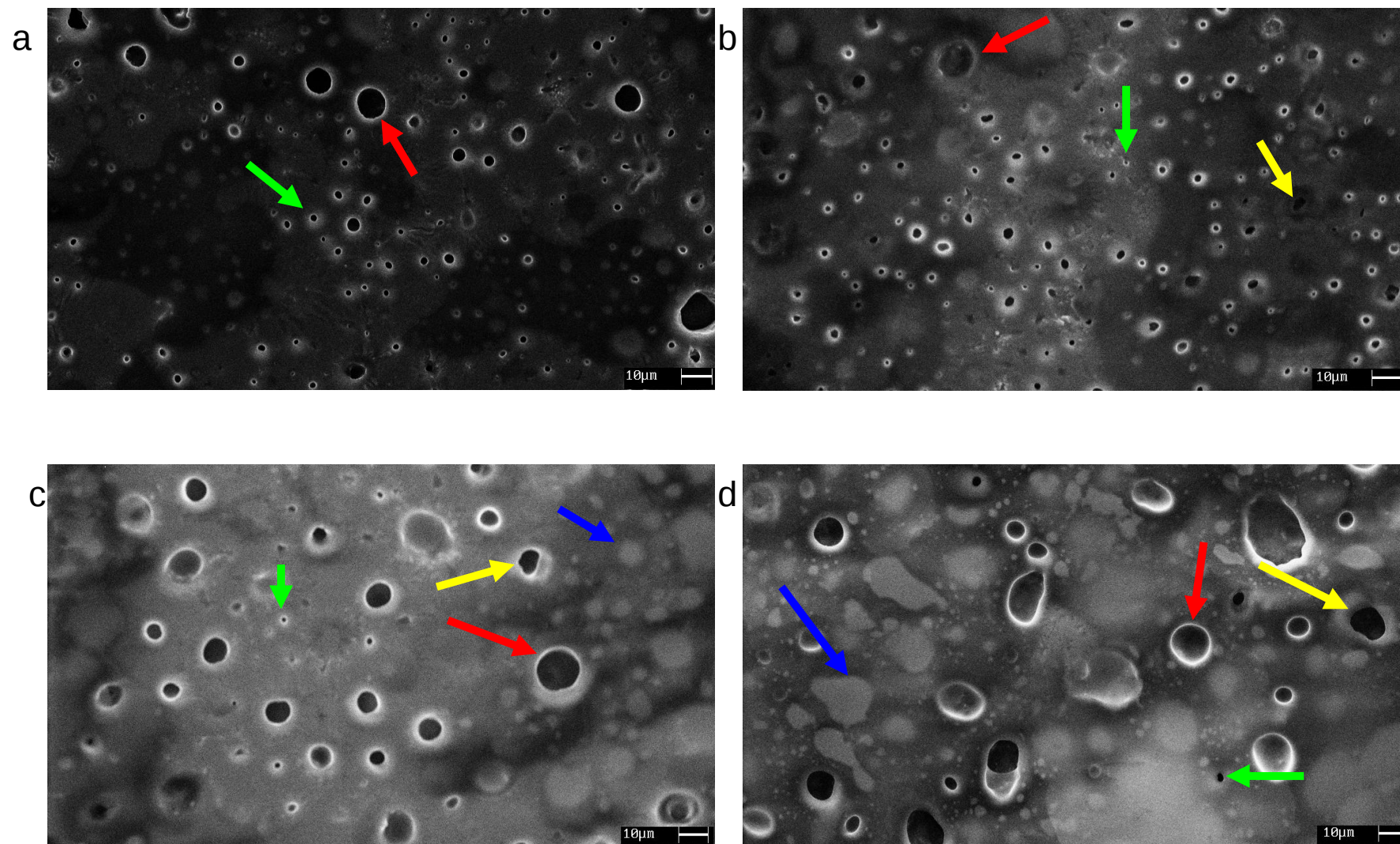


Figura 7 – Micrografias obtidas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos filmes: (a) controle, (b) 1% Cloisite® 15A, (c) 2% Cloisite® 15A e (d) 4% Cloisite® 15A

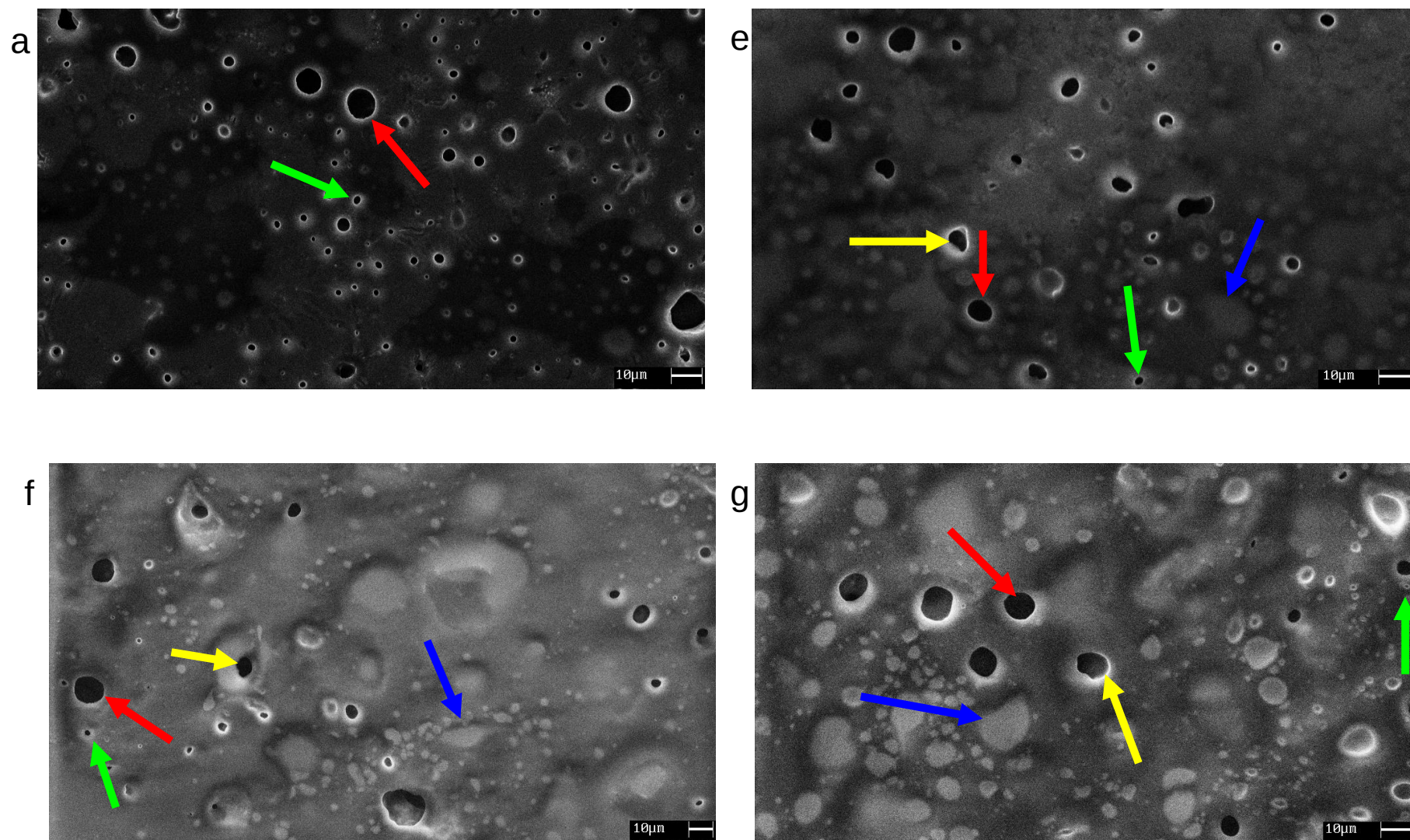


Figura 8 – Micrografias obtidas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos filmes: (a) controle, (e) 1% Cloisite® 30B, (f) 2% Cloisite® 30B e (g) 4% Cloisite® 30B

5.3 Microscopia Ótica

As Figuras 9 e 10 apresentam as imagens de Microscopia Ótica (MO) obtidas, respectivamente, para as amostras controle e adicionadas com 1, 2 e 4% de Cloisite® 15A e com 1, 2 e 4% de Cloisite® 30B. Em ambas as Figuras, houve repetição da imagem referente à amostra controle (a) para facilitar a comparação entre os diferentes tratamentos.

Essas Figuras apresentam as imagens dos filmes obtidas por meio da técnica de *Xylidine Ponceau*, a qual confere dois tipos de coloração. A coloração vermelha representa a fração protéica (zeína) e os pontos brancos, indicados pelas setas, os glóbulos de lipídeos. Em princípio, observando as imagens das Figuras 9 e 10, supunha-se que o aumento da concentração da argila causasse a diminuição do tamanho dos glóbulos. Mas, para comprovar se a quantidade adicionada de argila influenciava na diminuição do tamanho, foram selecionados 20 glóbulos de tamanho similar, em triplicata, de cada amostra. Usando o *software* Image-Pro Plus© Media Cybernetics versão 4.5 mediu-se os diâmetros de cada um deles e realizou-se análises estatísticas de seus valores para posteriores comparações. A Tabela 2 apresenta esses resultados. Observa-se que o controle e as amostras com 2 e 4% de Cloisite® 15A não diferiram entre si indicando que a adição dessa argila nas concentrações maiores não resultou na diminuição dos glóbulos de lipídeos, como imaginado inicialmente.

Tabela 2. Média do diâmetro dos glóbulos de lipídeos dos biofilmes de zeína

Amostras	Diâmetro (µm)
Controle (Zeína)	88,35 ± 15,63 ^a
Zeína + Cloisite® 15A (1%)	74,59 ± 15,59 ^c
Zeína + Cloisite® 15A (2%)	88,57 ± 17,30 ^a
Zeína + Cloisite® 15A (4%)	94,03 ± 23,02 ^a
Zeína + Cloisite® 30B (1%)	63,35 ± 16,71 ^b
Zeína + Cloisite® 30B (2%)	70,38 ± 16,93 ^{bc}
Zeína + Cloisite® 30B (4%)	68,28 ± 15,09 ^{bc}

^{a,b,c} - Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

A amostra com 1% de Cloisite® 15A diferiu estatisticamente dos outros filmes apresentando um tamanho de glóbulos de lipídeos intermediário com média de 74,59 μm .

As amostras com 1% de Cloisite® 30B, 2% de Cloisite® 30B e 4% de Cloisite® 30B não diferiram entre si, porém os tamanhos de seus glóbulos de lipídeos foram estatisticamente menores que os da amostra controle e das adicionadas com 2 e 4% de Cloisite® 15A. Não há, portanto uma evidência que mostre alguma tendência das partículas das argilas interferir no tamanho dos glóbulos. Pode-se supor, entretanto, que a forma da incorporação da argila na solução filmogênica, que incluiu a dissolução em água e depois a adição na mistura sob agitação à temperatura em torno de 60°C, pode ter sido um dos principais fatores que afetou a maior ou menor dispersão da argila no filme.

Recentemente, De Almeida et al. (2010) usando também a Microscopia Ótica com a técnica de *Xylidine Ponceau*, verificaram que o acréscimo de goma xantana em maiores concentrações provocava diminuição do tamanho dos glóbulos de lipídeos em biofilmes produzidos com zeína, quando comparado com o controle, sem goma xantana. Eles concluíram que essa diminuição no tamanho dos glóbulos foi decorrente da melhor homogeneização do óleo (ácido graxo), quando a goma xantana era adicionada visto que, ela apresentou uma boa dispersão na matriz da zeína, fato que não foi verificado no presente estudo conforme o observado pela análise de MEV. Ao contrário do observado por esses autores, os dados da Tabela 2 mostram que houve diminuição dos glóbulos de lipídeos para todas as amostras adicionadas de Cloisite® 30B e de 1% de Cloisite® 15A. No entanto, observa-se nas Figuras 9 e 10 que houve uma uniforme distribuição dos glóbulos de lipídeos e de proteínas em todos os filmes analisados adicionados com argila.

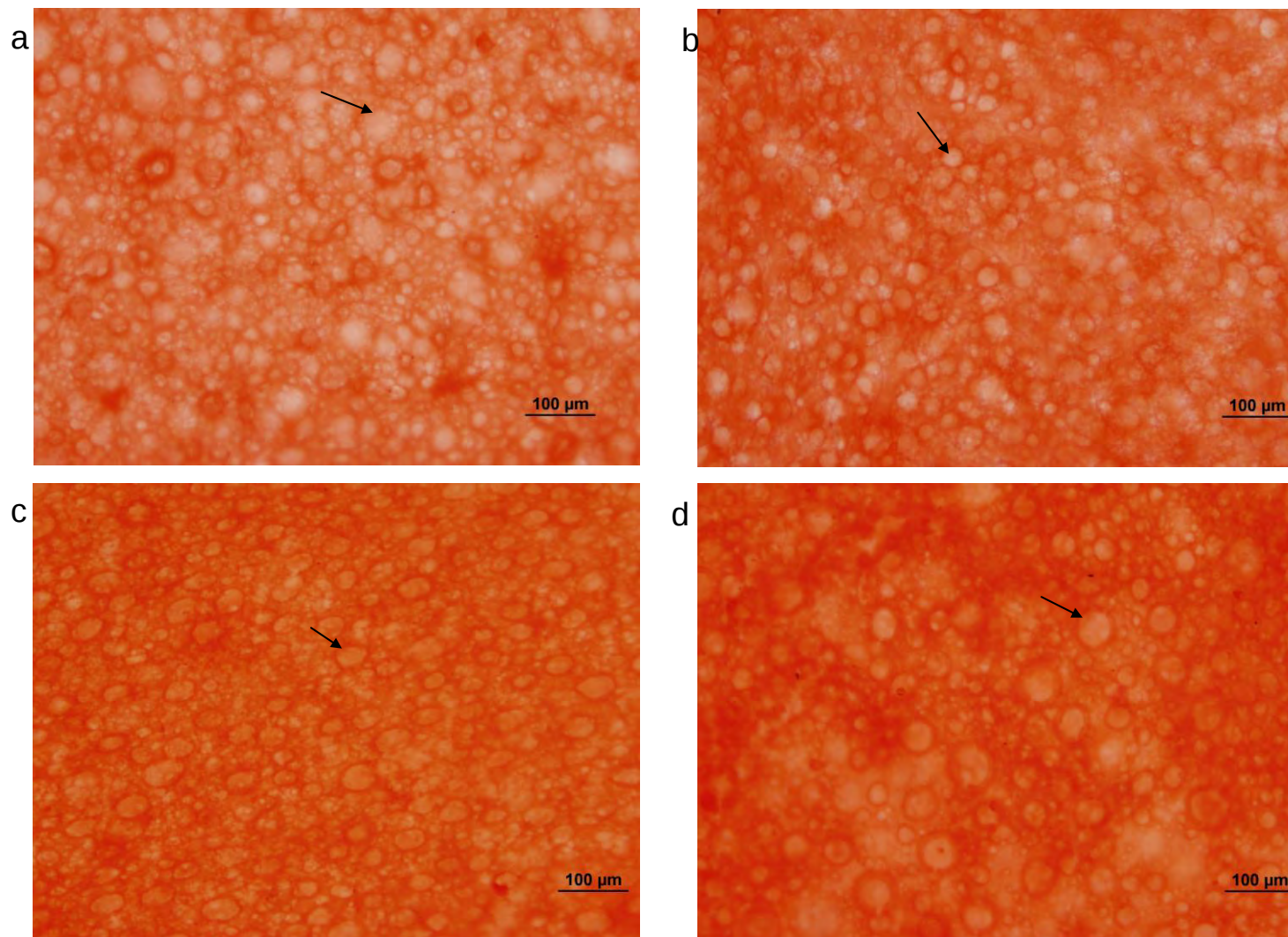


Figura 9 – Imagem de Microscopia Ótica com fixação por *Xylidine Ponceau* para biofilmes: (a) controle; (b) 1% de Cloisite® 15A; (c) 2% de Cloisite® 15A e (d) 4% de Cloisite® 15A

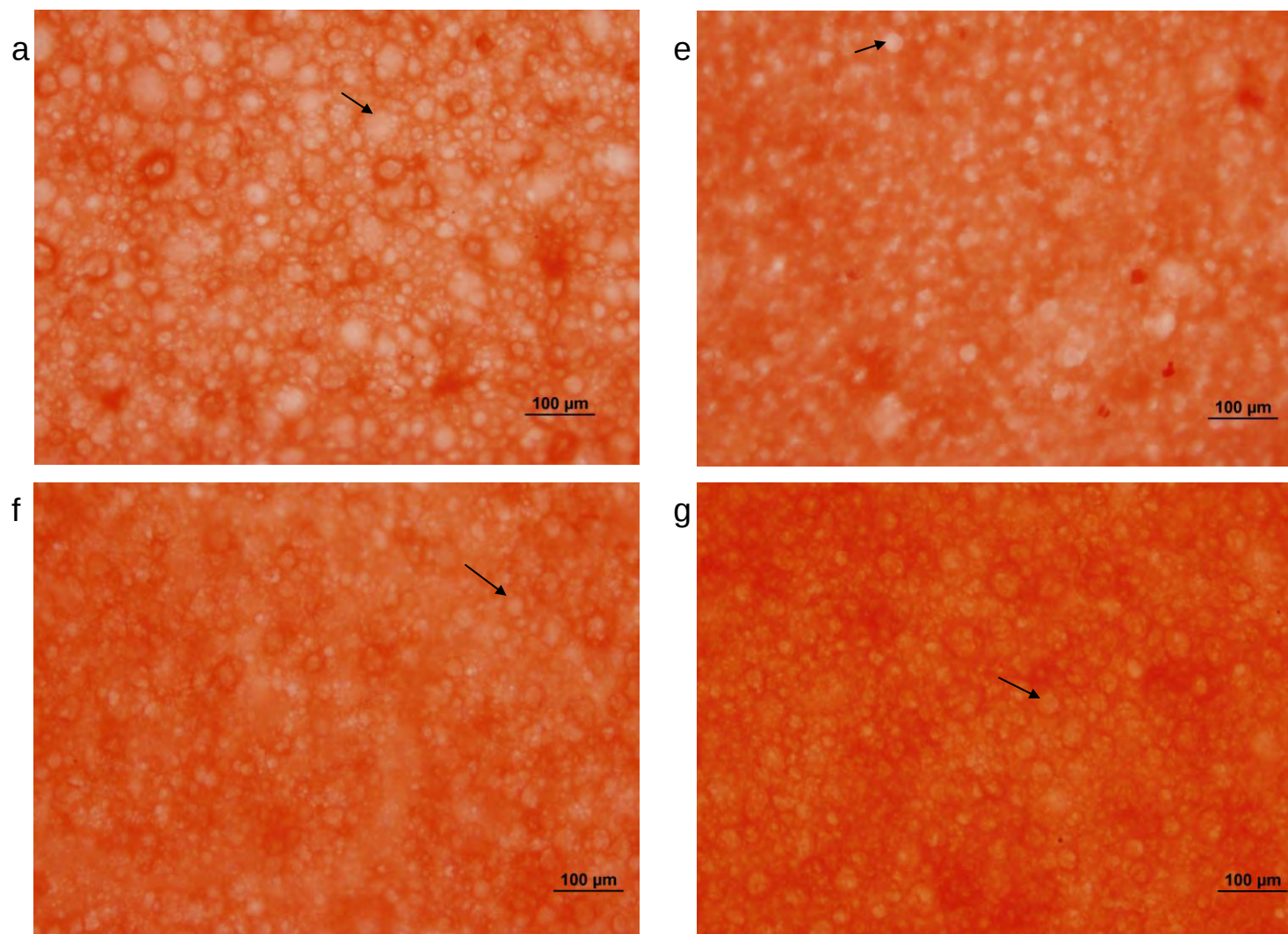


Figura 10 - Imagem de Microscopia Ótica com fixação por *Xylidine Ponceau* para biofilmes: (a) controle; (e) 1% de Cloisite® 30B; (f) 2% de Cloisite® 30B e (g) 4% de Cloisite® 30B

5.4 Espectroscopia de Correlação Bidimensional com FTIR-ATR

O espectro de FTIR-ATR obtido para o filme de zeína-ácido oleico (controle) é mostrado na Figura 11. De acordo com o espectro, pode-se perceber uma série de bandas que estão definidas e caracterizadas no ANEXO A. Essas bandas estão associadas a um modo vibracional que caracteriza especificamente alguns grupos químicos. As bandas presentes na Figura 11 indicam a presença de modos vibracionais atribuídos à amida III em torno de 1400 cm^{-1} , à amida I em 1650 cm^{-1} , ao ácido oléico em 1747 , 2850 e 2956 cm^{-1} e à amida A em 3300 cm^{-1} caracterizando assim a composição de formação do filme com base protéica.

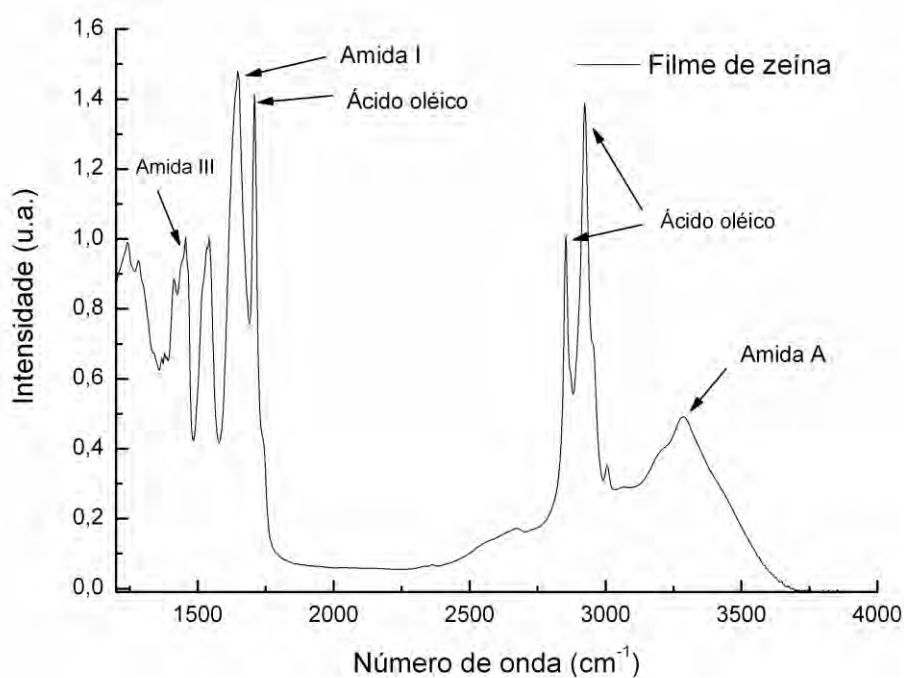


Figura 11 - Espectro FTIR-ATR do biofilme de zeína (controle)

Este resultado embora importante do ponto de vista físico-químico, ainda não esclarece possíveis interações que estejam ocorrendo entre os compósitos na formação do biofilme. Para tanto, foi necessário uma análise mais detalhada das possíveis correlações que pudessem existir entre os grupos funcionais. A técnica de análise complementar que foi usada é denominada de Análise de Correlação Bidimensional. Esta técnica está descrita no ANEXO B e visa basicamente evidenciar que modos vibracionais quando submetidos a algum tipo de perturbação, podem dar início a alguma interação que é identificada através da correlação vibracional. Os espectros na região do infravermelho são comumente congestionados pela contribuição de vários modos vibracionais, esta é uma das razões da presença de bandas largas como visto na Figura 11 entre 3000 e 3500 cm^{-1} . Com o intuito de detalhar estas superposições a análise bidimensional faz com que o espectro seja espalhado em um mapa bidimensional melhorando significativamente a resolução espectral.

A Figura 12 mostra o mapa bidimensional síncrono para o biofilme adicionado de Cloisite® 15A. Observam-se nessa figura duas regiões ao longo da diagonal principal, em torno de 1640 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo C=O, assinalando a estrutura secundária de folha- β e em 2930 cm^{-1} devido ao estiramento do grupo CH proveniente possivelmente de grupos CH_3 -, CH_2 - e CH-.

Ainda nessa Figura, observam-se picos cruzados positivos são encontrados entre 2923 $\times$ 1657, 2923 $\times$ 1528, 2884 $\times$ 1585 cm^{-1} , estes resultados implicam na suscetibilidade de alguns modos vibracionais cujas mudanças da intensidade espectral demonstram que todos ocorrem simultaneamente. Subtende-se que nessas regiões estejam presentes mais de dois componentes do filme, ou seja, existe algum tipo de interação entre a zeína e o ácido oléico ou glicerol. Mas não é possível afirmar essa mesma interação com a argila, pois não aparecem picos característicos de argilas em regiões próximas de 3620 cm^{-1} , conforme afirmado em estudo realizado por Madejová (2003).

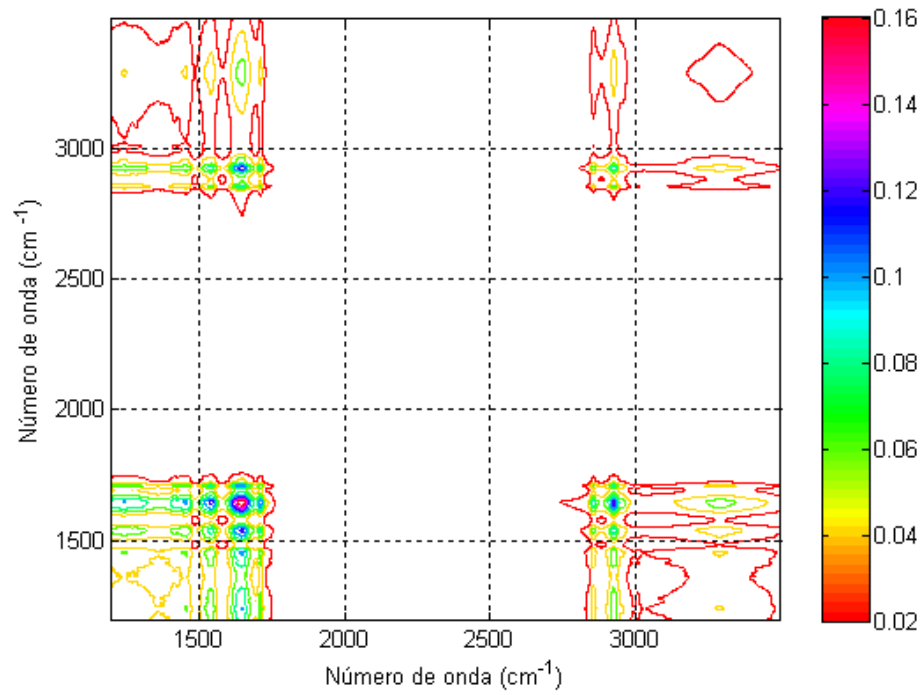


Figura 12 – Espectro síncrono dos grupos funcionais dos filmes de zeína adicionados de 1, 2 e 4% de Cloisite® 15A

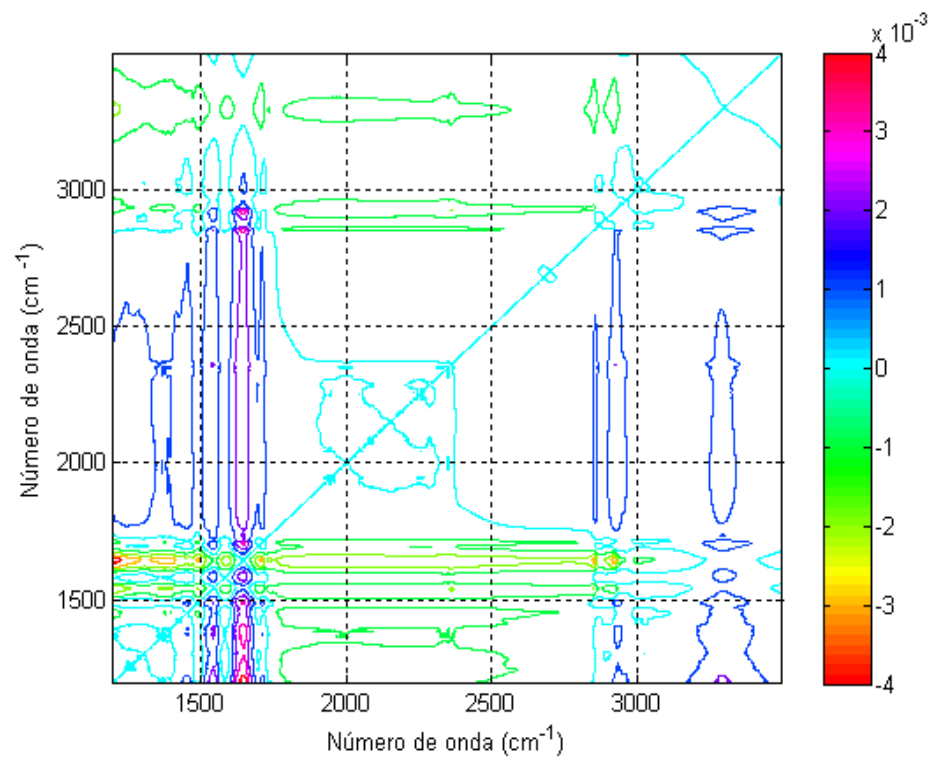


Figura 13 - Espectro assíncrono dos grupos funcionais dos filmes de zeína adicionados de 1, 2 e 4% de Cloisite® 15A

O mapa da Figura 13 é referente ao espectro assíncrono dos filmes elaborados com Cloisite® 15A, cujos picos na diagonal principal foram suprimidos do espectro e apenas os picos fora da diagonal são assinalados. Tem-se um conjunto de picos positivos em 1640×1590 , 1646×1500 e $1646 \times 1374 \text{ cm}^{-1}$, os quais são picos cruzados e sugerem que as estruturas secundárias mais sensíveis devido ao aumento percentual de argila são a hélice- α e parte da folha- β . O conjunto de picos cruzados negativos 2913×1650 , 1702×1642 e $2851 \times 1636 \text{ cm}^{-1}$ assinalam frequências que coincidem com os modos vibracionais obtidos nos picos positivos, com um pequeno deslocamento para a região em 1636 cm^{-1} . Portanto, deste conjunto de mapas bidimensionais podemos inferir que a presença da argila exerceu alguma influência sobre a estrutura secundária da proteína, indicando um impedimento estérico, ou seja, a argila passou a ocupar algum espaço antes ocupado somente pela zeína.

A Figura 14 corresponde ao mapa bidimensional síncrono do filme de zeína composto com 1, 2 e 4% de Cloisite® 30B. De acordo com os picos que estão presentes na diagonal principal, temos duas regiões com intensidades mais expressivas em torno de 3000 cm^{-1} , devido ao estiramento do grupo CH proveniente possivelmente de grupos CH_3 -, CH_2 - e CH- do ácido oléico ou glicerol de acordo com afirmação de Lee e Condrate (1999) e entre 1700 e 1600 cm^{-1} , referente à Amida I. Conforme se observa na Figura, nota-se que os picos cruzados correspondentes são todos positivos, indicando que as variações de intensidade espectral ocorrem no mesmo sentido de variação.

Ainda na Figura 14, há uma terceira banda bastante larga em 3287 cm^{-1} referente à presença da Amida A, proveniente do estiramento do grupo NH da proteína.

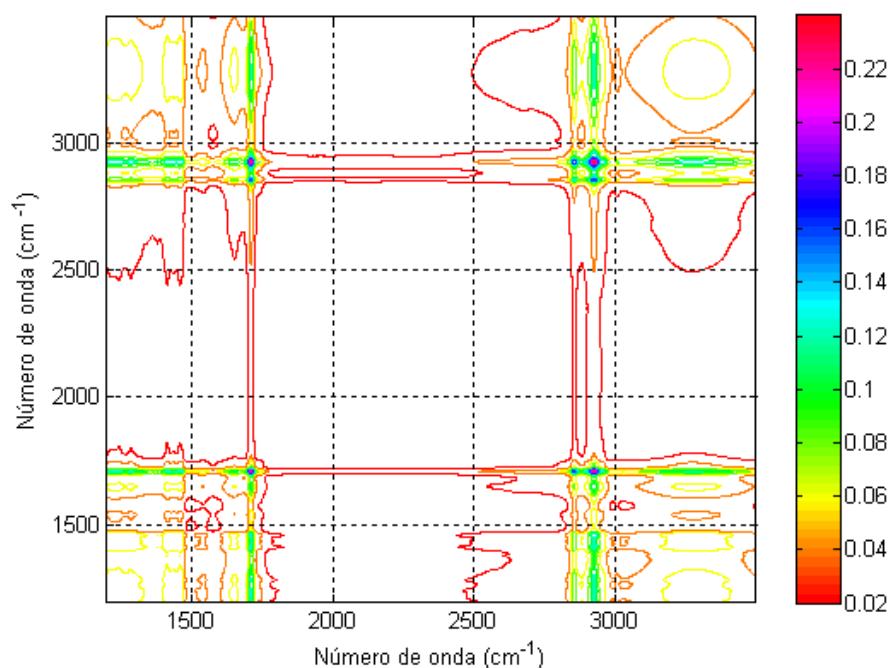


Figura 14 - Espectro síncrono dos grupos funcionais dos filmes de zeína adicionados de 1, 2 e 4% de Cloisite® 30B

Um segundo pico cruzado bastante largo na região de número de onda maior em $3276 \times 2932 \text{ cm}^{-1}$ é decorrente da contribuição da banda de amida A, mas devido à presença de outro pico cruzado em $2923 \times 2853 \text{ cm}^{-1}$, que é provavelmente referente ao estiramento do grupo C-H, há dificuldade em determinar quais componentes vibracionais estão se correlacionando. No pico cruzado em $1708 \times 1652 \text{ cm}^{-1}$ identifica-se a correlação entre os modos vibracionais atribuídos ao ácido oléico e estrutura secundária da proteína (hélice- α). Além disso, um conjunto de quatro picos cruzados é identificado e correlacionado aos modos vibracionais provenientes do estiramento C-H das bandas amidas, 2923×1648 , 2850×1656 , 2853×1716 e $2927 \times 1708 \text{ cm}^{-1}$, sendo que, os dois primeiros demonstram que ocorre correlação entre modos vibracionais do ácido oléico com estruturas secundárias da zeína e os dois últimos mostram que há correlação entre modos oriundos do ácido oléico com os modos vibracionais do C=O com interação de hidrogênio.

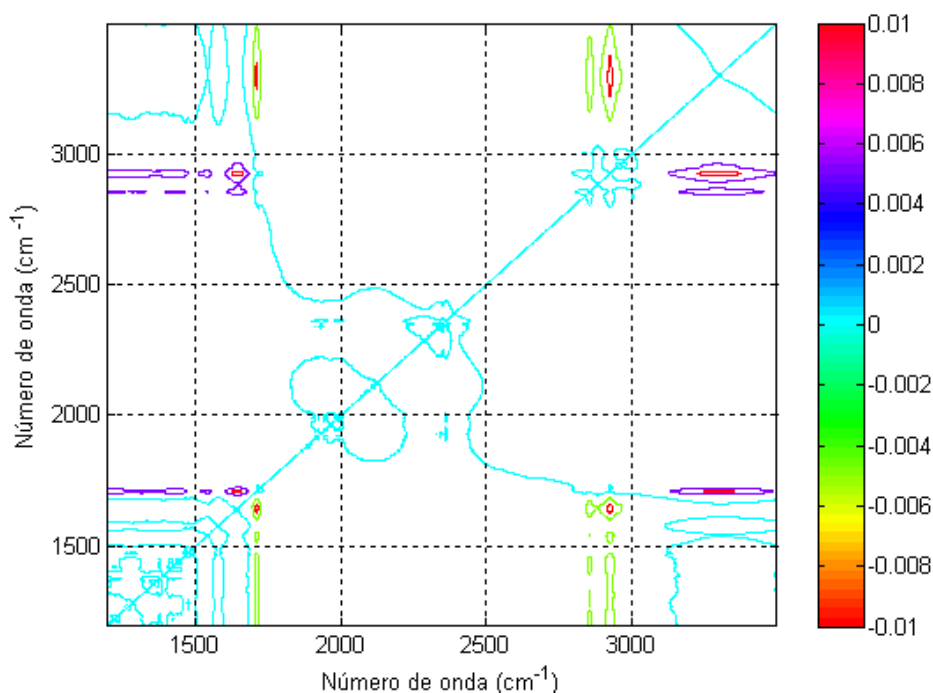


Figura 15- Espectro assíncrono dos grupos funcionais dos filmes de zeína adicionados de 1, 2 e 4% de Cloisite®30B

A Figura 15 apresenta o assíncrono obtido a partir da inclusão da argila Cloisite® 30B no filme de zeína mostrando duas regiões de picos cruzados negativos em $2927 \times 1648 \text{ cm}^{-1}$ e em $1708 \times 1648 \text{ cm}^{-1}$. Nessas duas regiões de picos o modo vibracional correspondente a folha- β está em 1648 cm^{-1} e na região de 2927 cm^{-1} o modo vibracional corresponde ao estiramento C-H. A segunda região de pico cruzado citada ($1708 \times 1648 \text{ cm}^{-1}$) é proveniente do ácido oléico e a folha- β .

De acordo com Madejová (2003) o número de onda referente à montmorilonita é de 3620 cm^{-1} . No entanto, no presente estudo, para ambas argilas não foi verificado número de onda correspondente a esse identificado por esse autor. Isso sugere que a presença da argila na formação do biofilme não apresenta interações de estruturação com a zeína. Além disso, o glicerol não pode ser identificado, pois seus modos vibracionais estão sobrepostos pelas várias bandas provenientes da zeína e do ácido oléico.

5.5 Opacidade

Na Tabela 3 são apresentados os valores de opacidade para os filmes de polietileno, o filme controle (elaborado somente com zeína e plasticizantes) e os produzidos adicionados de Cloisite® 15A e Cloisite® 30B na proporção de 1, 2 e 4% em relação à massa de zeína.

Tabela 3. Opacidade dos biofilmes de zeína

Amostras	Espessura	Absorbância a 600nm	Opacidade
Polietileno	0,05 ± 0,00	0,01 ± 0,00	2,12 ± 0,09 ^e
Controle (Zeína)	0,19 ± 0,01	1,13 ± 0,04	5,81 ± 0,20 ^{bc}
Zeína + Cloisite® 15A (1%)	0,23 ± 0,02	1,31 ± 0,02	5,69 ± 0,21 ^c
Zeína + Cloisite® 15A (2%)	0,22 ± 0,02	1,32 ± 0,03	6,05 ± 0,13 ^{ab}
Zeína + Cloisite® 15A (4%)	0,24 ± 0,02	1,42 ± 0,03	6,08 ± 0,16 ^a
Zeína + Cloisite® 30B (1%)	0,26 ± 0,02	1,37 ± 0,02	5,18 ± 0,07 ^d
Zeína + Cloisite® 30B (2%)	0,25 ± 0,03	1,24 ± 0,03	5,05 ± 0,14 ^d
Zeína + Cloisite® 30B (4%)	0,23 ± 0,02	1,28 ± 0,02	5,64 ± 0,10 ^c

a,b,c,d,e - Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Os resultados de opacidade mostram que o filme de polietileno, por ser translúcido, apresentou menor opacidade em relação aos feitos à base de zeína, mais opacos. Esse resultado está coerente, pois segundo Sessa et al. (2003), a zeína apresenta coloração amarelada, característica dos pigmentos carotenóides naturais do milho: β -caroteno, zeaxantina e luteína. Apesar de o filme controle ter menor espessura, que os demais adicionados de argila (0,19 mm contra 0,22mm), não houve diferença estatística entre este e filmes com Cloisite® 15A (1 e 2%) e Cloisite® 30B (4%). Esperava-se que a maior espessura e a presença da argila pudessem influenciar na opacidade da amostra, já que uma menor espessura facilitaria a passagem da luz polarizada e a argila dificultaria essa. Assim, entende-se que as pequenas diferenças observadas para espessura entre as amostras e os níveis de argilas adicionadas não foram relevantes para influenciar a opacidade, exceto para as amostras com 4% de Cloisite® 15A e com 1 e 2% de Cloisite® 30B.

A maior ou menor opacidade depende, não só de pigmentos de coloração da matriz polimérica, mas também da presença de ácidos graxos. Bertan et al. (2005) verificaram que

quanto maior a adição de ácidos graxos em filmes a base de gelatina, maior foi a opacidade do filme. Yang e Paulson (2000) também observaram aumento na opacidade dos filmes à base de gelatina proporcional à concentração da mistura entre ácido esteárico/palmítico, revelando que a adição de lipídio a um filme o torna mais opaco. Como nesse estudo a quantidade de lipídeos entre as amostras era constante, não se pode verificar a influência desses constituintes nos filmes.

A presença de partículas dispersas no filme com Cloisite® 15A (4%), relatadas anteriormente, sugere que a técnica “*casting*” foi inadequada para garantir uma eficiente dispersão dessas partículas. Embora a amostra com Cloisite® 15A (2%) fosse, aparentemente, homogênea e partículas de argilas não tenham sido observadas a olho-nu, essa não diferiu estatisticamente das amostras controle e aquelas com 4% de Cloisite® 15A.

Conforme indicam as imagens fotográficas da MEV (Figuras 7 e 8) grande parte das argilas não se dispersou na matriz polimérica, independente da concentração e do grau de hidrofobicidade da argila adicionada, indicando que a técnica utilizada para a produção desses filmes foi inadequada para boa homogeneização e interação dos componentes. Isto também pode influenciar facilitando a passagem da luz em pontos do filme onde as aglomerações das partículas de argila são menores.

A menor opacidade dentre as amostras estudadas foi observada para aquelas com 1 e 2% de Cloisite® 30B. Acredita-se ser decorrente do menor diâmetro dos glóbulos de lipídeos, demonstrado pelas imagens (e) e (f) da Figura 10 na análise de Microscopia Ótica, os quais facilitaram a passagem da luz polarizada.

Ainda não há dados na literatura que correlacionem a adição de argila com aumento ou diminuição da opacidade em biofilmes. Recentemente, Luecha et al. (2010) elaboraram filmes a base de zeína acrescidos de glicerol, polietileno glicol (PEG) e Nanomer® 1.34TCN (argila modificada), nas proporções de 0, 1, 3, 5 e 10% em relação à zeína e não verificaram

mudança de translucência dos filmes elaborados, com e sem argila nessas concentrações. No entanto, a metodologia aplicada por esses autores, foi qualitativa, pois utilizou somente imagens fotográficas, sendo tais observações passíveis de erro.

O método utilizado no presente estudo fez uso da mensuração do comprimento de onda (600nm)/espessura, sendo, portanto, uma medida quantitativa, com maior capacidade de detectar diferenças entre a opacidade dos filmes e correlacioná-las às imagens obtidas pela MEV e MO.

5.6 Solubilidade

A Tabela 4 apresenta os valores de solubilidade dos filmes elaborados com zeína e adicionados de argilas modificadas.

Tabela 4. Solubilidade dos biofilmes de zeína

Amostras	Espessura	Solubilidade
Controle (Zeína)	0,14 ± 0,00	6,81 ± 0,79 ^{ac}
Zeína + Cloisite® 15A (1%)	0,26 ± 0,01	5,02 ± 0,06 ^{ab}
Zeína + Cloisite® 15A (2%)	0,27 ± 0,01	4,62 ± 0,62 ^b
Zeína + Cloisite® 15A (4%)	0,26 ± 0,01	7,92 ± 0,57 ^c
Zeína + Cloisite® 30B (1%)	0,28 ± 0,02	5,76 ± 0,90 ^{ab}
Zeína + Cloisite® 30B (2%)	0,27 ± 0,02	5,26 ± 0,98 ^{ab}
Zeína + Cloisite® 30B (4%)	0,24 ± 0,03	5,11 ± 0,23 ^{ab}

^{a,b,c} - Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Os resultados das médias de solubilidade das amostras demonstram que não houve diferença estatística entre os filmes controle e daqueles adicionados de Cloisite® 15A (1 e 4%) e 30B (1, 2 e 4%). A adição da argila Cloisite® 30B, em diferentes concentrações, não foi suficiente para reduzir a solubilidade da amostra, a qual possui características hidrofílicas. A semelhança desses resultados com a amostra controle indica mais uma vez não ter ocorrido intercalação da argila na matriz, reforçando a idéia de que houve a formação de um microcompósito ou tactóide (modelo apresentado na Figura 3). No entanto, a amostra com 1%

de Cloisite® 15A, por ser hidrofóbica, deveria apresentar diferença entre as amostras com Cloisite® 30B e o controle, porém isto não foi observado, também devido a não incorporação da argila na matriz de zeína, conforme mostrado na análise de MEV nas Figuras 7 e 8.

Conforme já citado anteriormente, a amostra com 4% de Cloisite®15A apresentou características visualmente não homogêneas (partículas dispersas), as quais resultaram em maior solubilidade, porém não diferindo da amostra controle, indicando que grande parte das partículas da argila não se incorporou na matriz filmogênica facilitando a permeação da água. Assim, a falta dessa incorporação dos componentes na matriz, contribuiu para a maior solubilidade da amostra. Batista et al. (2005) observaram que o acréscimo de ácidos graxos em filmes a base de pectina tenderam a diminuir a sua solubilidade. Contudo, a não incorporação dos mesmos na matriz filmogênica contribuiu para a maior exposição da matriz hidrocolóide, promovendo a solubilização do filme.

Com os resultados dessa análise, confirma-se que a não dispersão da argila na matriz polimérica, resulta em uma estrutura de fase separada (tactóide) a qual não é eficaz para promover a redução da solubilidade. Ainda não há informações na literatura que correlacionem à adição de argila em aumento ou diminuição da solubilidade de biofilmes.

5.7 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A Tabela 5 apresenta os valores de permeabilidade do vapor de água nos filmes elaborados com zeína e adicionados de argilas modificadas.

Embora haja diferenças estatísticas em relação à permeabilidade do vapor d'água (PVA) entre algumas amostras analisadas, essas não foram menores que a obtida para o controle, permitindo reforçar novamente, junto com as demais análises de microestrutura, que não houve a intercalação entre o polímero e a argila formando, portanto, uma estrutura do tipo tactóide. Caso houvesse a formação de uma estrutura do tipo nanocompósito, haveria a

formação de um “caminho tortuoso”, conforme demonstra a Figura 4, dificultando a difusão de água e de gases do vapor de água através do filme, obtendo-se uma excelente barreira a esses elementos (PARK et al., 2003).

Tabela 5. Permeabilidade do vapor de água nos biofilmes de zeína

Amostras	Espessura	PVA (g.mm/h.m ² .kPa)
Controle (Zeína)	0,20 ± 0,02	0,47 ± 0,02 ^a
Zeína + Cloisite® 15A (1%)	0,23 ± 0,02	0,58 ± 0,03 ^{ac}
Zeína + Cloisite® 15A (2%)	0,20 ± 0,02	0,46 ± 0,03 ^a
Zeína + Cloisite® 15A (4%)	0,25 ± 0,00	0,55 ± 0,01 ^{ad}
Zeína + Cloisite® 30B (1%)	0,25 ± 0,02	0,84 ± 0,07 ^b
Zeína + Cloisite® 30B (2%)	0,19 ± 0,01	0,52 ± 0,10 ^{ae}
Zeína + Cloisite® 30B (4%)	0,22 ± 0,02	0,63 ± 0,03 ^{cde}

^{a,b,c,d,e} - Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Durante a realização do experimento, observou-se acontecer deposição de água sobre a amostra do filme. Essa deposição e/ou condensação de água, foi maior para as amostras adicionadas com Cloisite® 30B do que para o controle e aquelas com Cloisite® 15A. Essa maior deposição de água pode ser decorrente de uma maior afinidade do tipo de argila pela água, pois argila hidrofílica possui pontes de hidrogênio que facilitam a sua interação com a água. A deposição de água na superfície do filme pode também estar relacionada com a característica de permeação observada por McHugh e Krochta (1994 (a)). Eles afirmam que a permeabilidade consiste em um processo de solução e difusão onde o vapor se dissolve em um lado do filme e então se difunde para o outro lado, neste caso a permeação não ocorre através da passagem de vapor de água pelos poros dos filmes.

Ainda segundo Krochta (2002), inúmeros fatores contribuem para o aumento da PVA, como o tipo e quantidade de plasticizantes e condições do teste (temperatura e umidade relativa). Em relação a esse último fator, Lai e Padua (1998), afirmam que uma menor PVA é obtida quando a temperatura encontra-se por volta de 25°C do que a 5, 15 ou 35 °C. Gontard et al. (1993) e Cherian et al. (1995) afirmam que os plasticizantes atuam entre as cadeias dos

polímeros reduzindo as forças intermoleculares, resultando num aumento do volume livre entre as cadeias e que, geralmente, promove o aumento da permeabilidade do vapor de água.

Luecha et al. (2010) elaboraram filmes de zeína adicionados de PEG (polietileno glicol) e GLY (glicerol) pelo método *casting* sob agitação em combinação com ultrassom. Por análises de Difração de Raio-X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) observaram que houve uma parcial esfoliação dos componentes. Consequentemente, verificaram uma diminuição da PVA em relação ao controle (0% de argila) até o nível de acréscimo de 3% de argila modificada (Nanomer® I.34 TCN) de $11,58 \pm 1,59$ para $4,56 \pm 1,02$ g mm/dias m² kPa, respectivamente. Esses autores afirmam que não só o tipo de estrutura formada (intercalada, esfoliada ou tactóide) contribui para a redução da difusão do vapor de água, mas grandemente a orientação relativa da argila na matriz, as quais deverão se rearranjar perpendicularmente em direção ao sentido da difusão do vapor de água. Qualquer desvio desses arranjos poderá resultar em inferior propriedade de barreira.

Cabe ressaltar que a PVA obtida para o controle produzido no presente estudo foi inferior ao encontrada pelos autores de semelhante trabalho recém-publicado Luecha et al. (2010). Esses obtiveram valor de PVA de $11,58 \pm 1,59$ g mm/dias m² kPa para a biofilme a base de zeína sem adição de argila (controle), enquanto o valor médio de PVA do presente estudo foi de $0,47 \pm 0,02$ g mm/h m² kPa para a amostra controle. Tal diferença de permeabilidade está relacionada ao uso de diferentes plasticizantes, o que demonstra que a escolha dos plasticizantes exerce grandes diferenças nas propriedades funcionais dos biofilmes.

Assim, verifica-se que inúmeros fatores podem contribuir para a redução da PVA. Contudo, para se obter uma melhor propriedade de barreira ao vapor de água, é necessário escolher uma técnica de processamento capaz de promover uma boa intercalação da argila na

matriz polimérica, como por exemplo, a técnica de extrusão ou “*casting*” em combinação com elevada agitação e ultrassom.

6. CONCLUSÕES

Visualmente, todos os filmes apresentaram-se homogêneos, exceto o adicionado com 4% de Cloisite® 15A. A aparência dos materiais foi similar ao controle, entretanto, pelo tato notou-se uma menor fragilidade dos materiais adicionados com argila.

Por meio das imagens obtidas na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), observou-se que os acréscimos de argilas nos filmes resultaram na formação de uma microestrutura heterogênea, ou seja, estrutura de fase separada chamada de microcompósito ou tactóide. Houve formação de zonas de argilas não dispersas tanto para os filmes elaborados com Cloisite® 15A quanto com Cloisite® 30B nas concentrações de 1, 2 e 4%, comprovando a estrutura de um tactóide. As imagens da MEV sugerem que vários fatores podem ter contribuído para a formação de um tactóide, sendo o principal deles o método de agitação e incorporação da argila na solução filmogênica. Nas imagens obtidas da Microscopia Ótica observou-se uma distribuição uniforme dos glóbulos de lipídeos e de proteínas em todos os filmes, mas não foi possível verificar uma influência da adição da argila na tendência de diminuir os tamanhos dos glóbulos.

Das análises de Espectroscopia no Infravermelho e Correlação Bidimensional, juntamente com a Microscopia Eletrônica de Varredura, concluiu-se que a argila não estabeleceu estruturação com a proteína, devido à ausência de picos nos números de onda referentes às argilas.

A opacidade de todos os filmes foi maior quando comparada com o polietileno. Pequenas diferenças na espessura entre as amostras e a quantidade de argila adicionada não foram relevantes para influenciar a opacidade entre os tratamentos.

As propriedades funcionais de solubilidade e permeabilidade do vapor d'água (PVA) dos filmes adicionados com argilas não foram menores que as obtidas para o controle,

confirmando não haver intercalação dos constituintes dos filmes conforme demonstrado nas análises de microestrutura.

Conclui-se, desta maneira, que foi possível produzir filme a partir da técnica “*casting*” obtendo-se uma estrutura tipo tactóide, onde a argila ficou dispersa na matriz protéica. Sugere-se que, para promover uma estrutura esfoliada e/ou intercalada, é necessário combinar o uso de argilas com espaçamento interlamelar menor com outra técnica de preparação do biofilme como a extrusão e/ou agitação com ultrassom. Outra possibilidade seria adicionar um novo componente na matriz que facilitaria uma maior interação entre a zeína e a argila.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIMILHO. Associação Brasileira das Indústrias Moageiras de milho. Estatísticas. Disponível em: < <http://www.abimilho.com.br>>. Acesso em: novembro de 2009.
- ARGOS, P.; PEDERSON, K.; MARKS, M.D.; LARKINS, B.A. Structure model for maize zein proteins. **Journal Biological Chemistry**, v. 257, n. 17, p. 9984-9990, 1982.
- ARORA, A.; PADUA, G.W. Review: Nanocomposites in food packaging. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, p. 43-49, 2010.
- ASTM. Annual Book of American Society for Test and Material Standards, Standard test methods for tensile strength of plastic sheets. D882-91. The Society: Philadelphia, PA., v. 08.01, 2002.
- BARTH, A. Review: Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1767, n. 9, p. 1073-1101, 2007.
- BATISTA, J.A.; TANADA-PALMU, P.S.; GROSSO, C.R.F. Efeito da adição de ácidos graxos em filmes à base de pectina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 781-788, 2005.
- BERTAN, L.C.; TANADA-PALMU, P.S.; SIANI, A.C.; GROSSO, C.R.F. Effect of fatty acids and “Brazilian elemi” on composite films base don gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 1, p. 73-82, 2005.
- BISWAS, A.; SELLING, G.; WOODS, K.K.; EVANS, K. Surface modification of zein films. **Industrial Crops and Products**, v. 20, n. 1, p.168-171, 2009.
- CAO, N.; FU, Y.; HE, J. Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 7, p. 1153-1162, 2007.
- CHERIAN, G.; GENNADIOS, A.; WELLER, C.; CHINACHOTI. Thermochemical behaviour of wheat gluten films: Effect of sucrose, glycerin and sorbitol. **Cereal Chemistry**, v. 72, p. 1-6, 1995.
- COELHO, A.C.V.; SANTOS, P.S.; SANTOS, H.S. Argilas especiais: argilas quimicamente modificadas – uma revisão. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1282-1294, 2007.
- CORRADINI, E. **Desenvolvimento de blendas poliméricas de zeína e amido de milho**. 132f. Tese (Doutorado em Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
- CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Select functional properties of fish myofibrilra proetin-based films as affect by hydrophilic plasticizers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 622-626, 1997.

DARDER, M.; COLILLA, M.; RUIZ-HITZKY, E. Biopolymer-clay nanocomposites based on chitosan intercalated in montmorillonite. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 20; p. 3774-3780, 2003.

DAVANÇO, T. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes à base de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou ácido capróico e surfactantes**. 130f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

DE ALMEIDA, C.B.; CATELAM, K.T.; CORNÉLIO, M.L.; LOPES-FILHO, J.F. Morphological and structural characteristics of zein biofilms with added xanthan gum. **Food Technology Biotechnology**, v. 48, n. 1, p. 19-27, 2010.

FORATO, L.A. **Estudos das estruturas das zeínas por RMN, FTIR e MFA**. 125f. Tese (Doutorado em Físico-Química), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

FUKUSHIMA, K.; TABUANI, D.; CAMINO, G. Nanocomposites of PLA and PCL based on montmorillonite and sepiolite. **Materials Science and Engineering C.**, v.29, n. 4, p. 1433-1441, 2009.

GENNADIOS, A., WELLER, C.L., TESTIN, R.F. Property modification of edible wheat, gluten-based films. **Transactions of ASAE**, v. 36, n. 2, p. 465-470, 1993.

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

GOUNGA, M.E.; XU, S.Y.; WANG, Z. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. **Journal of Food Engineering**, v. 83, n. 4, p. 521-530, 2007.

GUO, Y.; LIU, Z.; AN, H.; LI, M.; HU, J. Nano-structure and properties of maize zein studied by atomic force microscopy. **Journal of Cereal Science**, v. 41, n. 3, p. 277-281, 2005.

KLEEN, D.; PADUA, G.W.; ENGESETH, N. Stabilization of lipids in a biodegradable zein-oleate film by incorporation of antioxidants. **Cereal Chemistry**, v. 79, n. 5, p. 687-694, 2002.

KROCHTA, J.M. Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. In: Gennadios, A. **Protein-based films and coatings**. Boca Raton: CRC Press, 2002. p. 1-41.

LAI H-M; PADUA GW. Properties and microstructure of plasticized zein films. **Cereal Chemistry**, v. 74, n. 6, p. 771-775, 1997.

LAI H-M; PADUA GW. Water vapor barrier properties of zein films plasticized with oleic acid. **Cereal Chemistry**, v. 75, n. 2, p. 194-199, 1998.

LAWTON, J.W. Zein: A history of processing and use. **Cereal Chemistry**, v. 79, n.1, p. 1-5, 2002.

LAWTON, J.W. Plasticizers for zein: their effect on tensile properties and water absorption of zein filmes. **Cereal Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 1-5, 2004.

LEE, D. H.; CONDRATE, R.A. FTIR spectral characterization of thin film coatings of oleic acid on glasses: I. Coatings on glasses from ethyl alcohol. **Journal of Materials Science**, v. 34, n. 1, p. 139-146, 1999.

LEITE, I.F.; RAPOSO, C.M.O.; CARVALHO, L.H.; SILVA, S.M.L. Efeitos de diferentes argilas organofílicas nas propriedades de compósitos PET/Bentonita. **Revista Matéria**, v. 11, n.3, p. 260-266, 2006.

LUECHA, J.; SOZER, N.; KOKINI, J.F. Synthesis and properties of corn zein/montmorillonite nanocomposite films. **Journal Material Science**, v. 45, n. 3, p.3529-3537, 2010.

MADEJOVÁ, J. Review: FTIR techniques in clay mineral studies. **Vibrational Spectroscopy**, v. 31, n. 1, p. 1-10, 2003.

MANGIACAPRA, P.; GORRASI, G.; SORRENTINO, A.; VITTORIA, V. Biodegradable nanocomposites obtained by ball milling of pectin and montmorillonites. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 4, p. 516-523, 2005.

McADAM, C.P.; HUDSON, N.E.; PETHRICK, R.A. Synthesis and characterization of nylon 6/ clay nanocomposites prepared by ultrasonication and *in situ* polymerization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 108, n. 4, p. 2242-2251, 2008.

McHUGH, I.H.; KROCHTA, J.M. Permeability properties of edible films. **Edible coatings and films to improve food quality**. Pennsylvania: Technomic Publishing Company, 1994, p. 139-183 (a).

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 (b).

MONTERREY-QUINTERO, E.S.; SOBRAL, P.J.A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo para elaboração de biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n. 1, p.179-189, 2000.

NODA, I.; OZAKI, Y. **Two-dimensional correlation spectroscopy: Applications in Vibrational Optical Spectroscopy**. England: Wiley and Sons, 2004.

OSÉS, J.; FERNÁNDEZ-PAN, I.; MENDOZA, M.; MATÉ, J.I. Stability of the mechanical properties of edible films based on whey protein isolate during storage at different relative humidity. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 1, p. 125-131, 2009.

PADUA, G.W.; WANG, Q. Formation and properties of corn zein films and coatings. In: Gennadios, A. **Protein-based films and coatings**. Boca Raton: CRC Press, 2002, p. 43-67.

PAIVA, L.B.; MORALES, A.R.; GUIMARÃES, T.R. Propriedades mecânicas de nanocompósitos de polipropileno e montmorilonita organofílica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 2, p. 136-140, 2006.

PAIVA, L.B.; MORALES, A.R.; DÍAZ, F.R. Argilas organofílicas: características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. **Cerâmica**, v. 54, n. 330, p. 213-226, 2008.

PARK, H.J.; CHINANN, M.S. Gas and Water Vapor Barrier Properties of Edible Films from Protein and Cellulosic Materials. **Journal of food Engineering**, v. 25, n. 4, p. 497-507, 1995.

PARK, H.M.; LI, X.; JIN, C.Z.; PARK, C.Y.; CHO, W.J.; HA, C.S. Preparation and properties of biodegradable thermoplastic starch/clay hybrids. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 287, n. 8, p. 553-558, 2002.

PARK, H.W.; LEE, V.K.; PARK, C.Y.; CHO, W.J, HA, C.S. Environmentally friendly polymer hybrids: Part I. Mechanical, thermal, and barrier properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites. **Journal of Materials Science**, v. 38, n. 5, p. 909-915, 2003.

PAVLIDOU, S.; PAPASPYRIDES, C.D. A review on polymer-layered silicate nanocomposites. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 12, p. 1119-1198, 2008.

RAO, Y.Q. Gelatin-clay nanocomposites of improved properties. **Polymer**, v. 48, n. 18, p. 5369-5375, 2007.

RODOLFO J.R.A.; MEI, L.H.I. Nanocompósitos de PVC com argila organicamente modificada: efeitos do processamento e do método de incorporação da argila. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2009.

SANCHEZ-GARCIA, M.D.; HILLIOU, L.; LAGARON, J.M. Nanobiocomposites of carrageenan, zein, and mica of interest in food packaging and coating applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 3529-3537, n. 11, 2010.

SANTOSA, F.X.B.; PADUA, G.W. Tensile properties and water absorption of zein sheets plasticized with oleic and linoleic acids. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 2070-2074, 1999.

SCHNEIDER, F.; TORRES, F.J.S. Resposta Técnica produzida pelo Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas / SBRT - SENAI-RS. Disponível em <http://www.sbrt.ibict.br>. Acesso em julho de 2009.

SESSA, D.J.; ELLER, F.J.; PALMQUIST, D.E. LAWTON, J.W. Improved methods for decolorizing corn zein. **Industrial Crops and Products**, v. 18, n. 1, p. 55-65, 2003.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial crops and products**, v. 13, n. 3, p. 171-192, 2001.

SINGH, N.; ECKHOFF, S.R. Wet milling of corn – A review of laboratory – scale and pilot plant- scale procedures. **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 6, p. 659-67, 1996.

SMITH, S. A. Modelling of gas and vapour transport through hydrophilic films. In: **The wiley encyclopedia of packaging technology**. Bakker, M. New York: John Wiley & Sons, p. 514-523, 1986.

SOBRAL, P.J.A. Propriedades funcionais de biofilmes de gelatina em função da espessura. **Ciência & Engenharia**, v. 8, n. 1, p. 60-67, 1999.

SOBRAL, P.J.A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 6, p. 1251-1259, 2000.

SORRENTINO, A.; GORRASI, G.; VITTORIA, V. Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 2, p. 84-95, 2007.

SOZER, N.; KOKINI, J.L. Review: Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 82-89, 2009.

TANG, X.; ALAVI, S.; HERALD, T.J. Effects of plasticizers on the structure and properties of starch-clay nanocomposite films, v. 74, n. 3, p. 552-558, 2008.

TILLEKERATNE, M.; EASTEAL, A.J. Modification of zein films by incorporation of poly(ethylene glycol)s. **Polymer International**, v. 49, n. 1, p.127-134, 2000.

VEIGA-SANTOS, P. **Elaboração, aditivação e caracterização de biofilmes à base de fécula de mandioca**. 252 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

WANG, Y.; LOPES-FILHO, J.F.; GEIL, P.; PADUA, G.W. Effects of processing on the structure of zein/oleic acid films investigated by X-ray diffraction. **Macromolecular Bioscience**, v. 5, n. 12, p. 1200-1208, 2005.

WOLF, K.L. **Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra e pó de colágeno**. 101f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2007.

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

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

YOSHINO, T.; ISOBE, S.; MAEKAWA, T. Influence of preparation conditions on the physical properties of zein films. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, n. 4, p. 345-349, 2002.

YU, L.; DEAN, K.; LI, L. Polymer blends and composites from renewable resources. **Progress in Polymer Science**. v. 31, n. 6, p.576-602, 2006.

ZHENG, J.P.; LI, P.; MA, Y.L.; YAO, K.D. Gelatine/montmorillonite hybrid nanocomposite. I. Preparation and properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 86, n. 5, p. 1189-1194, 2002.

8. ANEXOS

ANEXO A - Modos vibracionais dos grupos peptídicos característicos das proteínas

(BARTH, 2007).

1. Modos normais de vibração – Amida I

A vibração da banda de amida I, por volta de 1650 cm^{-1} , origina-se principalmente do estiramento vibracional C=O, tendo uma menor contribuição de outros modos vibracionais, tais como o estiramento fora de fase de CN. Além disso, a vibração da amida I é dificilmente afetada pela natureza da cadeia lateral das proteínas. Ela depende, no entanto, da estrutura secundária da cadeia protéica e, portanto, a vibração da banda de amida I é mais comumente usada para analisar a estrutura secundária de proteínas.

1.2 Modos normais de vibração – Amida III

A banda de amida III é uma combinação do dobramento NH em fase e da vibração do estiramento CN, com pequena contribuição de outros modos vibracionais. Em polipeptídeos, a composição desse modo é mais complexa, uma vez que depende da estrutura lateral da cadeia e o dobramento NH contribui para muitos modos na região de 1400 a 1200 cm^{-1} .

1.3 Modos normais de vibração Amida A

O estiramento vibracional NH origina a banda de amida A entre 3310 e 3270 cm^{-1} . É exclusivamente localizada no grupo NH é, portanto, em proteínas indiferentes para a conformação da cadeia polipeptídica. Sua frequência depende do estiramento da ligação hidrogênio. A banda de amida A é geralmente parte da ressonância de Fermi com o segundo componente absorvendo fracamente entre 3100 e 3030 cm^{-1} .

ANEXO B - Espectroscopia de Correlação Bidimensional Generalizada (NODA, OZAKI, 2004)

Uma descrição esquemática de um experimento de espectroscopia de correlação 2D baseada em uma perturbação externa é mostrada na Figura B1. Em uma medida espectroscópica normal, algum tipo de sonda eletromagnética, por exemplo, um feixe de infravermelho, é aplicado ao sistema de interesse. A interação característica entre o feixe e os constituintes do sistema é representada em forma de um espectro e então analisada para elucidar a informação detalhada sobre o sistema. Em espectroscopia de correlação 2D, uma perturbação externa adicional é aplicada ao sistema durante a medida espectroscópica, nesse estudo, diferentes níveis de concentração de argila. A resposta completa do sistema estimulado para a perturbação externa aplicada conduz a mudanças diferentes no espectro medido. Esta variação induzida por uma perturbação externa aplicada é referida como um espectro dinâmico em correlação 2D.

No esquema de espectroscopia de correlação 2D generalizada, uma série de espectros dinâmicos induzidos por perturbações são coletados de uma maneira sistemática, isto é, em uma ordem seqüencial durante o processo. Desta forma, um conjunto de espectros dinâmicos é então transformado para um conjunto de espectros de correlação 2D pela análise de correlação cruzada. Verifica-se que muitas vezes um espectro de correlação 2D fornece informação útil a qual não é facilmente disponível ou não aparente em um conjunto de espectro 1D.

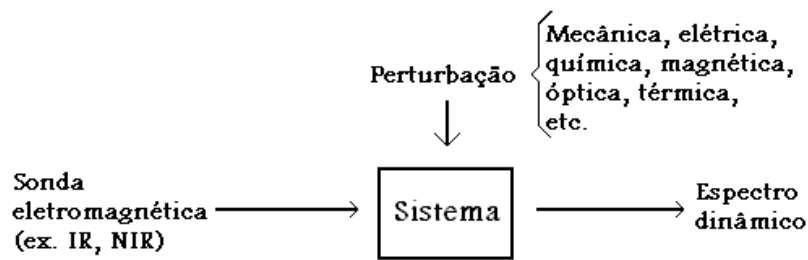


Figura B1 - Exemplo esquemático de um experimento de espectroscopia de correlação 2D baseada em uma perturbação externa.

O conceito fundamental que governa a espectroscopia de correlação é a comparação quantitativa de padrões de variações de intensidades espectrais, observada em duas variáveis espectrais diferentes, ao longo da variável externa durante o intervalo de observação fixo. O espectro de correlação generalizado é composto pelo espectro de correlação síncrono e assíncrono.

2.1 Espectro de correlação 2D síncrono

A Figura B2 é um exemplo do espectro de correlação 2D síncrono, o qual representa as simultâneas ou coincidentes mudanças de duas variações de intensidades espectrais medidas em variáveis espectrais independentes, durante o intervalo fixo da variável externa.

O espectro síncrono é simétrico com relação à diagonal principal do mapa de contorno 2D. Neste tipo de mapa 2D aparecem picos tanto na diagonal quanto fora dela (picos cruzados). Os picos que surgem na diagonal principal são sempre picos positivos, sendo chamados de auto-picos, enquanto que os picos cruzados podem ser tanto positivos quanto negativos.

Para a interpretação do mapa de contorno síncrono é muito útil construir quadros de correlação unindo um par de picos cruzados localizados em lados opostos a linha diagonal. No espectro de exemplo da Figura B2, as bandas A e C são correlacionadas sincronicamente

tão bem quanto às bandas B e D, dessa forma dois quadros de correlação podem ser desenhados.

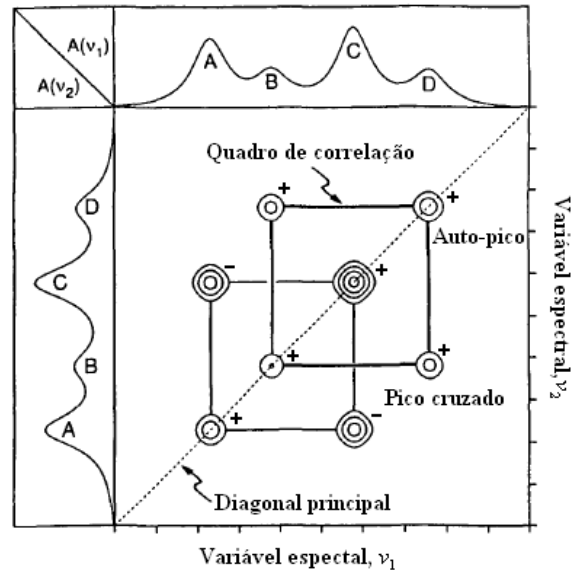


Figura B2 - Exemplo de um espectro de correlação 2D síncrono.

Se os sinais dos picos cruzados de um mapa de correlação forem positivos isso significa que as variações de intensidades das bandas correspondentes aos auto-picos estão aumentando ou diminuindo juntas, ou seja, as variações de intensidades espectrais mudam seguindo a mesma tendência. Por outro lado, se os picos cruzados forem negativos, isso significa que enquanto a intensidade de uma banda está aumentando a outra esta diminuindo, ou vice e versa. Dessa forma, de acordo com a Figura B2, as variações de intensidades dos picos nas coordenadas espectrais A e C estão mudando em tendências opostas, ou seja, enquanto uma está aumentando à outra está diminuindo. Já as intensidades em B e C diminuem ou aumentam juntas.

2.2 Espectro de correlação 2D assíncrono

A Figura B3 representa um exemplo de mapa de contorno assíncrono. O espectro de correlação 2D assíncrono das variações de intensidades espectrais de espectros dinâmicos

representa as mudanças sequenciais ou dessincronizadas medidas em duas variáveis espectrais, durante o intervalo fixo da variável externa.

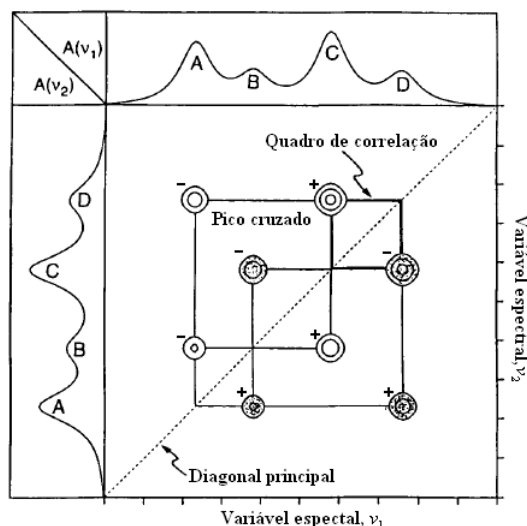


Figura B3 - Exemplo de um espectro de correlação 2D assíncrono.

Diferentemente de um espectro 2D síncrono, um espectro assíncrono não é assimétrico em relação a diagonal principal. Neste espectro não há auto-picos, sendo constituído exclusivamente de picos cruzados, os quais podem ser tanto positivos quanto negativos.

Assim como para o espectro 2D síncrono, quadros de correlação também podem ser construídos. O sinal de um pico cruzado se torna positivo, se a mudança de intensidade em v_1 ocorrer predominantemente antes que em v_2 , na ordem sequencial da perturbação externa. Por outro lado, o sinal se torna negativo se a mudança de intensidade em v_1 ocorrer predominantemente depois da mudança em v_2 . Entretanto, esta regra é invertida se a intensidade de correlação síncrona na mesma coordenada for negativa.

O espectro 2D assíncrono da Figura B3 indica que as variações de intensidades espectrais (aumentam ou diminuem) nas bandas A e C ocorrem depois das mudanças de intensidades em B e D.