



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

CRISLENE BARBOSA DE ALMEIDA

**CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DE
BIOFILMES PRODUZIDOS COM ZEÍNA E ÓLEOS VEGETAIS
COMESTÍVEIS**

São José do Rio Preto - SP

2010

CRISLENE BARBOSA DE ALMEIDA

**Características estruturais e funcionais de biofilmes
produzidos com zeína e óleos vegetais comestíveis**

Tese apresentada para obtenção do título de **Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos**, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Lopes Filho
(UNESP, São José do Rio Preto)

Co-Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi
(UNESP, Araraquara)

São José do Rio Preto

2010

Almeida, Crislene Barbosa de.

Características estruturais e funcionais de biofilmes de zeína e óleos vegetais comestíveis / Crislene Barbosa de Almeida. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.

124 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: José Francisco Lopes Filho

Co- Orientador: Antonio Carlos Guastaldi

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biofilme. 2. Biomateriais. 3. Zeína. 4. Ácido oléico. I. Lopes Filho, José Francisco. II. Guastaldi, Antonio Carlos. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. VI. Título.

CDU – 547.962.7

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

CRISLENE BARBOSA DE ALMEIDA

**Características estruturais e funcionais de biofilmes
produzidos com zeína e óleos vegetais comestíveis**

Tese apresentada para obtenção do título de **Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos**, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

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
EMBRAPA – São Carlos

Prof. Dr. Douglas de Brito
Professor Doutor
EMBRAPA – São Carlos

Prof^a. Dr^a. Vânia Regina Nicoletti Telis
Professora Assistente Doutora
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 15 de dezembro de 2010.

DADOS CURRICULARES

CRISLENE BARBOSA DE ALMEIDA

NASCIMENTO	23.07.1980 - São Paulo, SP
FILIAÇÃO	Ubirádson Dias de Almeida Leonice Barbosa de Almeida
1998/2002	Curso de Graduação Zootecnia UNESP - Jaboticabal, SP
2003/2005	Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, nível Mestrado UNESP - São José do Rio Preto, SP
2006/2010	Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, nível Doutorado UNESP - São José do Rio Preto, SP

Dedico

À minha família, com todo amor...

*Em especial aos meus pais **Leonice** e **Ubirádson**. Obrigada pela confiança, orgulho, incentivo e por todo amor que recebi durante todos os minutos de minha vida. Pela educação que vocês me deram, pela perseverança que me ensinaram a ter diante às dificuldades. Meus pais, meus tesouros... Vocês serão sempre meu maior exemplo de dignidade. A vocês dedico esta vitória!*

AGRADECIMENTOS

Obrigada Senhor Jesus por sempre me levar em Suas mãos conduzindo meus passos.

Ao Prof. Dr. José Francisco Lopes Filho pela orientação, confiança e amizade que me proporcionaram crescimento profissional e pessoal.

Aos integrantes da banca examinadora de qualificação: Prof^a. Dr^a. Vânia Regina Nicoletti Telis e Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio pelas críticas e sugestões que muito contribuíram para o enriquecimento desta pesquisa.

Aos funcionários Suely, Luiz, Ginaldo, Tânia, Luiz Roberto, Rosana, Silvinha, Rosemar, Sr. Narciso, Pinceli e em especial ao Jesuíno e Newton por toda atenção, presteza e colaboração.

À Prof^a. Dr^a. Lucimara Forato (EMBRAPA-CNPDIA, São Carlos), Prof^a. Dr^a. Elisângela Corradini (EMBRAPA-CNPDIA, São Carlos), Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio (Depto. Física – UNESP, São José do Rio Preto), Claire Sarantópoulos (ITAL, Campinas) e ao Prof. Dr. Fernando Gomes de Souza Júnior (UFRJ). Agradeço pela colaboração na execução das análises de molhabilidade, análises térmicas (DSC e TGA), análises de infravermelho (FTIR da zeína em pó e FTIR-ATR dos filmes de zeína, permeabilidade ao oxigênio e difração de raios-X.

À Juliana Aparecida Scramim (EMBRAPA-CNPDIA, São Carlos) pela ajuda nos testes (extração da zeína, molhabilidade e FTIR). Agradeço, também, pelos ensinamentos e troca de conhecimentos.

Aos amigos da Pós-Graduação: Renata, Beatriz (Bia), Luciana, Camila, Catharina, Maria Angélica, Patrícia Damy, Tatiana (Xuxu), Fernanda Carnielo, Thaís, Ellen, Luiz Gustavo (LG), Kelly, Molina e, em especial, à Janaína, Fernanda Seixas e Gisele. Aos amigos de fora da universidade: Livinha, Rita, Heloísa, Fabiana Madrid, Fernanda Chaboli e Joyce Borsato “in memoriam”. Obrigada pelos sorrisos, lágrimas, companheirismo, incentivo, amizade, enfim, sem vocês teria sido muito mais difícil.

Aos queridos amigos e professores deste Instituto, especialmente ao Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi, Prof^a. Dr^a. Mieko Kimura e Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Barreto Penna pela grande amizade. Saibam que os admiro muito.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do Auxílio-Pesquisa.

A todos que, de alguma maneira, participaram da minha vida para que eu pudesse conquistar mais este título.

Muito Obrigada!

“O que acontecer com a terra, acontecerá com os filhos da terra. O homem não teceu a teia da vida, ele é apenas um fio. O que ele fizer à teia estará fazendo a si mesmo.”

(Ted Perry)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS.

LISTA DE EQUAÇÕES

LISTA DE ABREVIACÕES

1- INTRODUÇÃO.....	1
2 - OBJETIVOS.....	3
3 - REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 - O milho (<i>Zea mays</i>).....	4
3.2 - Zeína.....	6
3.3 - Biofilmes.....	10
3.4 - Propriedades Gerais dos Biofilmes.....	12
3.4.1 - Espessura.....	12
3.4.2 - Textura / Aparência.....	13
3.5 - Caracterização Estrutural dos Biofilmes.....	13
3.5.1 - Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	14
3.5.2 - Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier acoplada à Técnica de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR).....	15
3.5.3 – Microestrutura.....	17
3.5.4 - Difração de Raios-X	17
3.6 - Propriedades Funcionais dos Biofilmes.....	19
3.6.1 - Opacidade / Transparência.....	19

3.6.2 - Permeabilidade ao Vapor d'Água (PVA).....	20
3.6.3 - Isotermas de Sorção.....	21
3.6.4 - Solubilidade em Água.....	25
3.6.5 - Molhabilidade.....	25
3.6.6 - Propriedades Térmicas.....	26
3.6.6.1 - Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	26
3.6.6.2 - Análise Termogravimétrica (TGA).....	28
3.6.7 - Propriedades Mecânicas: Tensão de Ruptura (σ_r), Percentagem de Elongação na Ruptura (ϵ_r) e Módulo de Young (E).....	28
3.6.8 - Permeabilidade a Gases.....	30
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 - Materiais.....	32
4.2 - Métodos.....	33
4.2.1 - Composição em Ácidos Graxos dos Plasticizantes utilizados.....	33
4.2.2 - Caracterização da Zeína em Pó por Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	33
4.2.3 - Preparação dos Biofilmes de Zeína.....	33
4.2.4 - Caracterização Geral dos Biofilmes.....	34
4.2.4.1 - Aspecto Visual.....	34
4.2.4.2 - Espessura.....	34
4.2.5 - Caracterização Estrutural dos Biofilmes.....	34
4.2.5.1 - Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier acoplada à Técnica de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR).....	34

4.2.5.2 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	35
4.2.5.3 - Microscopia Óptica (MO).....	35
4.2.5.4 - Análise de Difração de Raios-X em Ângulo Alto (WAXS).....	36
4.2.6 - Caracterização Funcional dos Biofilmes.....	37
4.2.6.1 - Opacidade / Transparência.....	37
4.2.6.2 - Permeabilidade ao Vapor d'Água (PVA).....	37
4.2.6.3 - Isotermas de Sorção.....	39
4.2.6.4 - Solubilidade em Água.....	40
4.2.6.5 - Molhabilidade.....	40
4.2.6.6- Propriedades Térmicas.....	41
4.2.6.6.1 - Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)...	41
4.2.6.6.2 - Análise Termogravimétrica (TGA).....	41
4.2.6.7 - Propriedades Mecânicas.....	42
4.2.6.8 - Permeabilidade ao Oxigênio (PO ₂).....	43
4.3 - Análise Estatística.....	43
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 - Processos de Formação e Secagem dos Filmes.....	45
5.2 - Caracterização da Zeína em Pó.....	46
5.2.1 - Espectroscopia no Infravermelho.....	46
5.3 - Caracterização dos Plasticizantes.....	47
5.4 - Caracterização Estrutural dos Biofilmes.....	47

5.4.1 - Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier acoplada à Técnica de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR).....	47
5.4.2 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	49
5.4.3 - Microscopia Óptica (MO).....	50
5.4.4 - Difração de Raios-X: Análise de WAXS.....	52
5.5 - Caracterização Funcional dos Biofilmes.....	53
5.5.1 - Opacidade / Transparência.....	53
5.5.2 - Permeabilidade ao vapor d'Água (PVA).....	55
5.5.3 - Isotermas de Sorção.....	57
5.5.4 - Solubilidade em Água.....	60
5.5.5 - Molhabilidade.....	61
5.5.6- Propriedades Térmicas.....	63
5.5.6.1 - Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	63
5.5.6.2 - Análise Termogravimétrica (TGA).....	65
5.5.7 - Propriedades Mecânicas.....	67
5.5.8 - Permeabilidade ao Oxigênio (PO ₂).....	68
CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXO.....	92

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram produzir biofilmes de zeína adicionados de ácido oléico puro e óleos vegetais comestíveis com alto teor deste ácido graxo e determinar as propriedades estruturais e funcionais dos biomateriais produzidos. A análise da composição da zeína em pó utilizada indicou uma possível contaminação residual de lipídeos proveniente do glúten do milho. Os óleos comestíveis usados foram o óleo de buriti, que apresentou um menor teor de ácido oléico (35,1 %), comparado com os óleos de oliva e macadâmia (acima de 61 %). Para caracterizar a microestrutura dos biofilms, análises de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-ATR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia Óptica (MO) e difração de Raios-X (WAXS) foram realizadas. As propriedades funcionais avaliadas foram opacidade, Permeabilidade ao Vapor d'Água (PVA), solubilidade em água, molhabilidade, isothermas de sorção, propriedades térmicas, mecânicas e permeabilidade a gases. As análises de FTIR-ATR sugeriram que os diferentes plasticizantes não afetaram a estrutura química e molecular da matriz de zeína. A MEV e a MO mostraram que o biofilme controle (zeína-ácido oléico) foi o mais homogêneo, em que, aparentemente, os ácidos graxos foram capazes de formar uma matriz mais coesa e contínua. Os poros observados na MEV foram posteriormente identificados, pela MO, como glóbulos de lipídeos. As análises de Difração de Raios-X (WAXS) mostraram que a estrutura da α -hélice da zeína não foi modificada com a adição dos diferentes plasticizantes. A opacidade dos filmes aumentou com o aumento da concentração do ácido oléico. Os biofilmes elaborados com ácido oléico puro apresentaram os menores valores para PVA, solubilidade e molhabilidade, sendo, portanto, mais hidrofóbicos que os demais. Entretanto, as isothermas de umidade de equilíbrio mostraram não haver influência dos tipos de plasticizantes na atividade de água. Os dados de umidade de equilíbrio obtidos para 5, 15, 25, 35 e 45 °C foram ajustados por diferentes modelos matemáticos, sendo o modelo de Peleg o que apresentou os melhores resultados ($R^2 > 0,97$). Em todos os materiais estudados, as temperaturas de transição vítrea (T_g) encontraram-se na mesma faixa, entre 48 e 50 °C, mostrando que os diferentes óleos não afetaram os valores de T_g . Nos termogramas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) além da T_g , também foram verificados picos de cristalização da água residual contida na matriz protéica e picos correspondentes aos pontos de

fusão dos óleos. A principal etapa de degradação térmica, para a zeína em pó e para o filme sem plasticizantes, ocorreu na faixa de 270 a 415 °C e para os filmes plasticizados na faixa de 250 a 405 °C. As curvas termogravimétricas (TG) dos filmes adicionados de ácidos graxos apresentaram uma perda de massa entre 50 e 120 °C devida à evaporação da água. A 120 °C a perda de massa foi de 3 a 5 % e acima desta temperatura ocorreram sucessivas perdas de massa em todos os materiais, provavelmente devido à evaporação dos ácidos graxos ou do glicerol. Uma perda de massa em menores temperaturas ocorreu para o filme adicionado de ácido oléico. Na análise mecânica, os filmes com ácido oléico apresentaram a maior percentagem de alongação na ruptura (ϵ_r), devido à maior homogeneidade da matriz protéica e maior teor de ácido oléico. Esta observação foi confirmada com os menores valores apresentados por este material para os módulos de Young (E) e para a resistência à tração (σ_r). Foram realizadas análises de permeabilidade ao oxigênio (PO_2) somente no filme controle, pois os demais apresentaram fissuras durante o teste. A taxa de PO_2 do filme analisado foi inferior aos valores encontrados na literatura para outros materiais poliméricos, sugerindo tratar-se de um filme bastante homogêneo, com obstáculos à passagem de moléculas de oxigênio.

Palavras-chave: biofilmes, zeína, biomaterial, biodegradável, ácido oléico.

ABSTRACT

The aim of this work was to produce biofilms of zein added with oleic acid and others edible vegetable oils containing high level of this fatty acid, and determine the structural and functional properties of the biomaterials produced. The composition analyses of zein powder indicated a possible residual contamination of lipids from the corn. Fatty acid composition of edible oils used show that buriti oil had the lowest content of oleic acid (35.1 %) while the others oils (olive and macadamia) had above 61 %. To characterize the microstructure of the biofilms, analyses of Infrared Spectroscopy (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM), Optical Microscopy (MO) and X-ray diffraction (WAXS) were performed. The functional properties were also evaluated through opacity, Water Vapor Permeability (WVP), solubility in water, wettability, sorption isotherms, Differential Scanning Calorimetric (DSC), thermogravimetry (TGA), mechanical behavior and gas permeability. FTIR-ATR spectra suggested that different plasticizers did not affect the chemical and molecular structure of zein matrix. The SEM and OM images showed that control biofilm (zein-oleic acid) was the most homogeneous, where apparently the fatty acids were able to form a more continuous matrix. The pores first observed in SEM were later identified by optical microscopy as lipids. Analyses of WAXS showed that α -helix structure of the zein was not modified by the addition of different plasticizers. The opacity increased according to oleic acid concentration. Biofilms with oleic fatty acid showed the lowest values for WVP, solubility and wettability and were more hydrophobic than the others. However, the equilibrium moisture contents showed by the isotherms were not different for all types of plasticizers, in the same water activity. The equilibrium moisture data obtained for 5, 15, 25, 35 and 45 °C were adjusted by different mathematical models, and Peleg's model presented the best results ($R^2 > 0.97$). Glass transition temperature (T_g) for all materials were found in the same range, between 48 and 50 °C, showing that different oils did not interfere on the values. Besides T_g , it was also observed in DSC thermograms, crystallization peaks of residual water contained in the protein matrix, and melting points peaks of the oils. The main stage of thermal degradation for the zein powder and the film with no plasticizers occurred in the range between 270 to 415 °C and in the range of 250 to 405 °C for films with plasticizers. Curves of TG showed a weight loss between 50 to

120 °C due to water evaporation for films added with fatty acids. The weight loss accounted for 3 - 5 % at 120 °C and successive weight losses were observed for higher temperatures in all materials. The greatest weight loss occurred for the biomaterial added with oleic acid. Mechanical analysis showed highest percentage of elongation at break for film with oleic acid due to the greater homogeneity of the protein matrix in this material. This observation was confirmed with the lowest values shown by Young's modulus and tensile strength. Oxygen permeability (TPO_2) for the control film was minor to those found in the literature for other polymeric materials, suggesting that this is a very homogeneous film with obstacles to the passage of oxygen molecules.

Keywords: biofilms, zein, biomaterial, biodegradable, oleic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fluxograma simplificado da moagem úmida do milho.....	5
Figura 2 -	O grão de milho, quando cortado na vertical, revela seus componentes básicos.....	5
Figura 3 -	Fluxograma simplificado da extração da zeína do glúten de milho.....	8
Figura 4 -	Esquema do modelo da α -zeína: uma das hélices mostra as partes polares e apolares.....	9
Figura 5 -	Modelo de Matsushima para as α -zeínas. Os cilindros representam as hélices e as voltas são ricas em glutaminas.....	10
Figura 6 -	Espectro IV para a zeína, na região da amida I (1800 a 1600 cm^{-1}).....	15
Figura 7 -	Esquema da análise de Espectroscopia de Refletância Total Atenuada (ATR).....	16
Figura 8 -	Ângulo de contato entre o líquido e a superfície. γ_s é a energia de superfície do sólido; γ_{LV} a tensão superficial do líquido em equilíbrio com o vapor; e γ_{SL} é a energia da interface sólido-líquido.....	25
Figura 9 -	Ângulo de contato: a) $\theta = 0$, a água é absorvida pelo material); b) $30^\circ < \theta < 90^\circ$, a água é parcialmente absorvida; c) $\theta > 90^\circ$, a água não é absorvida.....	26
Figura 10 -	Ensaio de tração demonstrando o comprimento da parte central do material (L_0), a área transversal (S_0), a força aplicada (F), a deformação do material (ΔL) e ruptura total,	

sendo: (a)- condição inicial, (b)- deformação e (c)- ruptura.....	29
Figura 11 - Ilustração do funcionamento do equipamento OX-TRAN 2/20 utilizado para análise de permeabilidade ao oxigênio.....	31
Figura 12 - Técnica de coloração <i>Xylidine ponceau</i>	35
Figura 13 - Secagem das lâminas em estufa.....	36
Figura 14 - Microscópio utilizado para análise de microscopia óptica.....	36
Figura 15 - Esquema do dispositivo para determinação da permeabilidade ao vapor d'água.....	38
Figura 16 - Equipamentos utilizados para a análise do ângulo de contato....	41
Figura 17 - Análise das propriedades mecânicas em tração do biofilme zeína-ácido oléico.....	42
Figura 18 - Aspecto visual homogêneo de um biofilme de zeína-óleo de macadâmia.....	45
Figura 19 - Espectro de FTIR obtido para zeína para zeína na forma de pó.	46
Figura 20 - Espectro de FTIR-ATR obtido para os biofilmes de zeína.....	48
Figura 21 - Eletromicrografias dos biofilmes, obtidas por MEV, sendo a) zeína-óleo de buriti; b) zeína-óleo de macadâmia; c) zeína-ácido oléico e d) zeína-azeite de oliva. A barra indicativa de aumento corresponde a 10 µm.....	50
Figura 22 - Micrografias dos biofilmes, obtidas por MO, sendo a-b: zeína-óleo de buriti e c-d: zeína- óleo de macadâmia.....	51
Figura 23 - Micrografias dos biofilmes, obtidas por MO, sendo a-b: zeína-azeite de oliva; c-d: zeína-ácido oléico.....	51
Figura 24 - Espectrogramas de WAXS para os biofilmes de zeína.....	52

Figura 25 -	Isotermas de sorção de biofilmes de zeína, de acordo com o modelo de Peleg, em diferentes temperaturas com os diferentes plasticizantes. a) ácido-oléico; b) óleo de macadâmia; c) óleo de buriti; d) azeite de oliva.....	57
Figura 26 -	Isotermas de sorção dos biofilmes com: zeína-ácido oléico, zeína-óleo de macadâmia, zeína-óleo de buriti e zeína-azeite de oliva a 25 °C.....	59
Figura 27 -	Ilustração da gota d'água sobre os biofilmes para medidas de ângulo de contato no tempo zero. a) biofilme de buriti e b) biofilme de macadâmia.....	61
Figura 28 -	Ilustração da gota d'água sobre o biofilme com ácido oléico para medidas de ângulo de contato nos tempos 0, 30, 60, 120 e 300 segundos.....	62
Figura 29 -	Ilustração da gota d'água sobre o biofilme com azeite de oliva para medidas de ângulo de contato nos tempos 0, 30, 60, 120 e 300 segundos.....	62
Figura 30 -	Termogramas DSC dos quatro biofilmes estudados na temperatura de -90 a 90 °C.....	63
Figura 31 -	Termogramas DSC apresentando a Tg dos biofilmes de zeína..	64
Figura 32 -	a) Curvas de TG para a zeína na forma nativa (pó) e para o filme de zeína preparado sem plasticizante e b) Curvas da primeira derivada (DTG) da Figura 32a.....	65
Figura 33 -	a) Curvas TG e b) Curva DTG para os filmes adicionados de plasticizantes.....	66
Figura 34 -	Amostra de filmes de zeína-óleo de macadâmia que não resistiram ao ensaio de PO ₂	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Aminoácidos constituintes da zeína destacados em vermelho os grupos apolares e polares.....	7
Tabela 2 -	Principais vantagens da utilização da FTIR-ATR sobre outras técnicas de análise de proteínas.....	16
Tabela 3 -	Atividade de água das soluções salinas.....	39
Tabela 4 -	Composição em ácidos graxos dos óleos plasticizantes utilizados na formulação dos biofilmes.....	47
Tabela 5 -	Opacidade dos biofilmes de zeína e do polietileno comercial....	54
Tabela 6 -	Espessura, PVA e permeância dos biofilmes a 25 °C.....	55
Tabela 7 -	Constantes e médias dos desvios percentuais obtidos para o modelo de Peleg no ajuste dos dados de umidade de equilíbrio higroscópico.....	58
Tabela 8 -	Espessura, solubilidade em água e umidade dos biofilmes a 25 °C.....	60
Tabela 9 -	Valores de tensão de ruptura, elongação na ruptura e módulo de Young para os filmes adicionados de plasticizantes.....	67

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 -	Relação de Bragg.....	18
Equação 2 -	Modelo de BET (Brunauer, Emmet e Teller).....	23
Equação 3 -	Modelo de GAB (Guggenheim, Anderson e de Boer).....	23
Equação 4 -	Modelo de Oswin.....	23
Equação 5 -	Modelo de Peleg.....	24
Equação 6 -	Modelo de Halsey.....	24
Equação 7 -	Modelo de Henderson.....	24
Equação 8 -	Opacidade dos filmes.....	37
Equação 9 -	Permeabilidade ao vapor d'água dos filmes.....	38
Equação 10-	Coeficiente de permeabilidade ao oxigênio dos filmes.....	43

LISTA DE ABREVIações

- ATR: Refletância Total Atenuada
- a_w : Atividade de Água
- CGM: "Corn Gluten Meal"
- CGF: "Corn Gluten Feed"
- DIC: Delineamento Inteiramente Casualizado
- DSC: Calorimetria Exploratória Diferencial (°C)
- DTG: Termogravimetria Derivativa (% / °C)
- E: Módulo de Young (MPaP)
- EVOH: Copolímero de Etileno e Álcool Vinílico
- FT: Transformada de Fourier
- FTIR: Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier
- FTIR-ATR: Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier acoplada à técnica de Refletância Total Atenuada
- IRE: Elemento de Reflexão Interna (cristal)
- IV: Infravermelho
- MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
- MO: Microscopia Óptica
- P: Coeficiente de Permeabilidade ao Oxigênio ($\text{cm}^3 \cdot \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{atm}$)
- PA: Poliamida
- PEBD: Polietileno de Baixa Densidade
- PO_2 : Permeabilidade ao Oxigênio
- PVA: Permeabilidade ao Vapor d'Água ($\text{g} \cdot \text{mm} / \text{m}^2 \cdot \text{h} \cdot \text{KPa}$)
- TG: Termogravimetria (% / °C)
- TGA: Análise Termogravimétrica

- T_c: Temperatura de Cristalização (°C)
- T_m: Temperatura de Fusão (°C)
- T_g: Temperatura de Transição Vítrea (°C)
- TPO₂: Taxa de Permeabilidade ao Oxigênio (cm³ (CNTP).m⁻².dia⁻¹)
- SAXS: *Small-Angle X-ray Scattering* - difração de raios X em ângulos baixos
- WAXS: *Wide-Angle X-ray Scattering* - difração de raios X em altos ângulos
- UR: Umidade Relativa (%)
- σ_r: Resistência à Tração (MPa)
- ε_r: Percentagem de Elongação na Ruptura (%)
- O₂: Oxigênio
- CO₂: Dióxido de Carbono
- KBr: Brometo de Potássio

1 - INTRODUÇÃO

A produção mundial de milho é de aproximadamente 720 milhões de toneladas, sendo os Estados Unidos os maiores produtores. O Brasil ocupa o terceiro lugar com uma produção estimada em 51 milhões de toneladas e deste total produzido, aproximadamente 12 % é destinado ao consumo industrial nos processos de moagem seca e moagem úmida (ABRAMILHO, 2010).

Inúmeras pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de aperfeiçoar o processo de moagem úmida, sempre visando à otimização e obtenção de melhor rendimento e qualidade do amido, germe, glúten e fibra. A maioria delas envolve variações dos parâmetros na etapa de maceração como tempo, temperatura, concentração de ácido láctico, dióxido de enxofre, etc. O uso de diferentes tipos de grão também pode influenciar nos rendimentos e qualidade dos co-produtos da moagem. Desses co-produtos o amido tem o maior valor agregado, no entanto, as frações de fibra e glúten por possuírem o menor valor, são comumente usadas em formulações de ração animal. Para um melhor aproveitamento dessas frações é necessário buscar alternativas de uso por meio da elaboração de novos produtos. Dentre inúmeras possibilidades, o amido e o glúten são interessantes matérias-primas para formação da matriz polimérica em biocompósitos devido às suas propriedades de polimerização, além de serem biodegradáveis. Ambos podem ser processados com a adição de plasticizantes similarmente aos polímeros sintéticos convencionais.

A zeína é uma proteína do glúten do milho de grande potencial polimérico oferece vantagens como matéria prima para a produção de filmes, coberturas e aplicações plásticas; além de ser biodegradável e renovável. Seu processamento com ácido oléico, substância encontrada em diferentes tipos de óleos vegetais, produz filmes plásticos flexíveis e transparentes, com propriedades que permitem seu uso tanto no setor agrícola quanto no de alimentos (LAWTON, 2002).

A utilização destes óleos na confecção de biofilmes é vantajosa pelo fato de serem biodegradáveis, além de comestíveis. Enquanto os plásticos comuns, derivados de petróleo, levam de 200 a 450 anos para se decomporem, os

biodegradáveis podem ser degradados em tempos muito menores, contribuindo para a redução do acúmulo de lixo.

Nestas circunstâncias, o desenvolvimento de biofilmes a partir da zeína tem um grande potencial de diversificação do mercado para a utilização dessa fração do milho. Para um melhor entendimento das características estruturais e funcionais deste material este trabalho teve como objetivos produzir biofilmes de zeína adicionados de ácido oléico puro ou óleos vegetais comestíveis, com alta concentração desse ácido graxo, e verificar a interação destes componentes na matriz protéica.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Produzir e caracterizar filmes comestíveis e biodegradáveis produzidos com zeína e óleos vegetais.

2.2 - Objetivos Específicos

- Produzir filmes de zeína adicionados de ácido oléico puro e óleos vegetais de buriti, macadâmia e oliva com elevado teor de ácido oléico;
- Identificar a estrutura básica dos biomateriais;
- Determinar propriedades dos materiais quanto à resistência mecânica, térmica, de permeabilidade ao vapor d'água e oxigênio e de sorção de umidade.

3 - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 - O Milho (*Zea mays*)

A cadeia produtiva do milho é um dos segmentos econômicos mais importantes do agronegócio brasileiro. A produção mundial é de cerca de 720 milhões de toneladas, sendo os Estados Unidos os maiores produtores, com 42 % da produção mundial, seguido pela China (19 %) e o Brasil (6,4 %) com 51 milhões de toneladas (ABRAMILHO, 2010). Da produção brasileira, aproximadamente 12 % é destinado ao consumo industrial nos processos de moagem seca e moagem úmida, sendo que o Paraná responde por quase metade da capacidade nacional (ABIMILHO, 2010; PINAZZA, 2007).

Os principais processos industriais do milho são a moagem seca e a moagem úmida. Os produtos obtidos na moagem a seco são o fubá comum, a canjica, o fubá de mimoso, a quirera e os farelos para ração. Neste processo, após limpeza e secagem, o milho é desgerminado e separado em endosperma e germe. O endosperma é moído, podendo ser classificado em tamanho das partículas e usado como produto final ou extrusado na obtenção de farinhas pré-cozidas e flocos de milho. O germe é a matéria prima para extração do óleo de milho (MUSSOLINI, 2009).

No processo industrial de moagem via úmida (Figura 1), após limpeza e secagem, o milho é macerado e, por meio de transformações químicas, bioquímicas e operações mecânicas, obtêm-se frações relativamente puras de germe (com alto teor de óleo), fibra (proveniente do pericarpo dos grãos), amido e glúten de alto teor protéico (> 60 %). A fração de glúten é constituída pelas proteínas glutelina, globulina, albumina e zeína (SINGH; ECKHOFF, 1996; ABIMILHO, 2010).

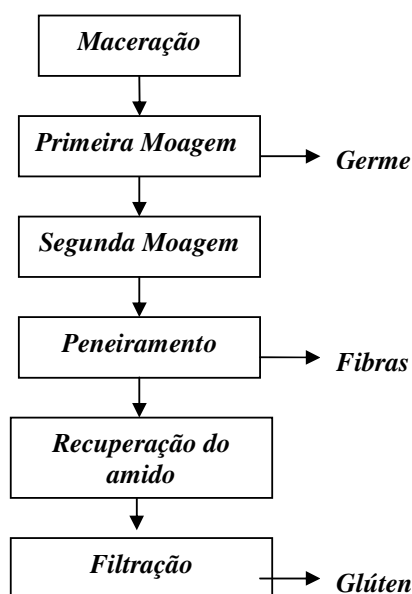


Figura 1 - Fluxograma simplificado da moagem úmida do milho.

Segundo Jackson; Shandera (1995), o grão de milho (Figura 2) possui aproximadamente 70 a 73 % de amido, 9 a 10 % de proteínas, 4 a 5 % de óleo, 1 a 2 % de cinzas, 2 % de açúcares e 9 a 10 % de fibras. Em função de sua composição química e valor nutritivo, ele se destaca como um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos em todo o mundo, seja na alimentação humana ou animal (NUSSIO, 1990).

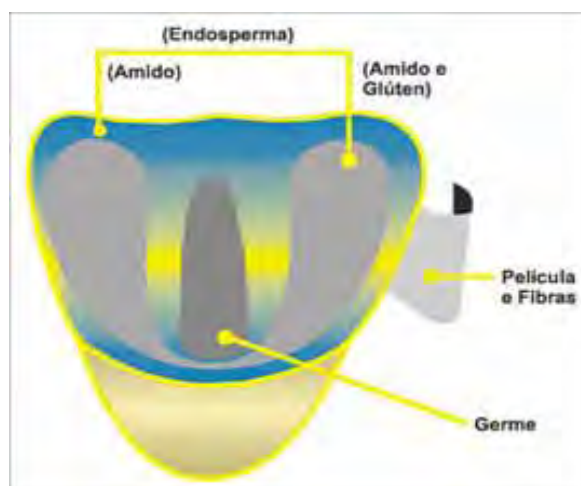


Figura 2 - O grão de milho, quando cortado na vertical, revela seus componentes básicos.

Fonte: ABIMILHO (2010).

No início do processo industrial, em torno de 1880, a indústria de moagem do milho descartava a fibra, o germe e o glúten. A industrialização tornou-se mais rentável quando esses produtos foram destinados para a alimentação animal e extração de óleo do germe (RAMIREZ et al., 2008). As indústrias denominam os produtos como amido, “corn gluten meal” (“CGM”), “corn gluten feed” (“CGF”) e germe (BLANCHARD, 1992). Novas tecnologias e utilizações das frações do grão têm sido desenvolvidas para maior agregação de valor desses componentes. Entre inúmeras novas possibilidades, a produção de material biodegradável tem posição de destaque.

3.2 - Zeína

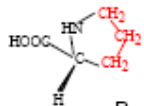
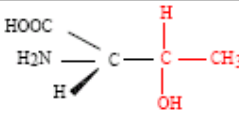
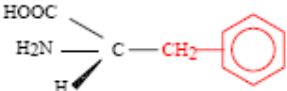
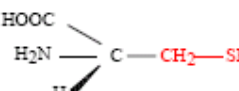
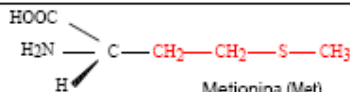
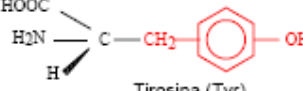
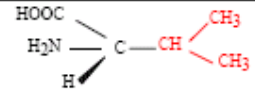
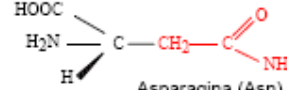
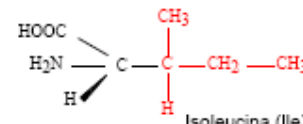
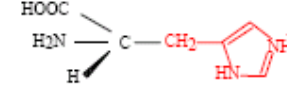
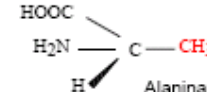
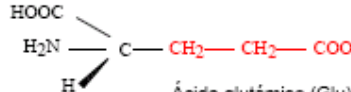
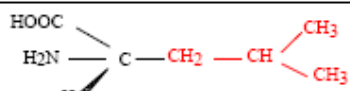
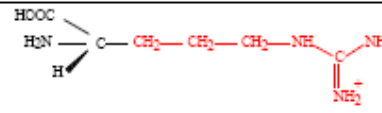
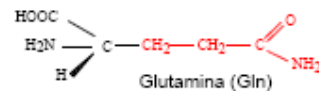
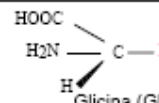
No milho, as proteínas correspondem a aproximadamente 10 % da massa seca dos grãos, o amido corresponde de 70 a 80 %, os açúcares solúveis de 1 a 4 % e o óleo de 3 a 6 % (TORRES-GINER; GIMENEZ; LAGARON, 2008). As proteínas do milho são constituídas de aproximadamente 20 % de globulinas e albuminas (proteínas solúveis em água e solução salina), 40 % prolaminas (proteínas solúveis em álcool) e 40 % de glutelinas (proteínas insolúveis em água e álcool) (SHEWRY; TATHAM, 1990).

As proteínas desses dois últimos grupos são também conhecidas como proteínas de reserva. As prolaminas são comuns a todos os cereais e são ricas em prolina e glutamina. No milho, as prolaminas são denominadas zeínas. A maioria das glutelinas torna-se solúvel em álcool após redução das ligações dissulfeto, e também têm sido classificadas como prolaminas (zeínas) por várias semelhanças de seqüência e composição de aminoácidos. Assim, as zeínas representam cerca de 80% das proteínas do milho (FORATO, 2000). Ela é obtida como um co-produto proveniente da moagem úmida do grão de milho e pode ser usada em diferentes aplicações, incluindo a fabricação de filmes poliméricos em razão do seu alto grau de polimerização (LAWTON, 2002). Além disso, é também um componente importante na manufatura de papéis, adesivos, fabricação de cápsulas na indústria farmacêutica, entre outras (SHUKLA; CHERYAN, 2001).

A zeína é constituída por 17 aminoácidos, sendo a maioria aminoácidos apolares (hidrofóbicos) como fenilalanina, leucina, alanina e prolina. Dos resíduos

polares, a glutamina é a mais abundante (MATSUSHIMA et al., 1997; WANG; PADUA, 2004). Possui reduzido valor biológico em decorrência do desequilíbrio provocado pelo alto teor de leucina e deficiências de lisina e triptofano, necessitando de suplementação ao ser usada em rações animais (REGINA; SOLFERINI, 2002; McGOWAN; LEE, 2006). Na Tabela 1 são apresentados os aminoácidos que compõem a zeína e suas respectivas estruturas químicas.

Tabela 1 - Aminoácidos constituintes da zeína destacados em vermelho os grupos apolares e polares.

Aminoácidos com grupos R apolares	Aminoácidos com grupos R polares
 Prolina (Pro)	 Treonina (Thr)
 Fenilalanina (Phe)	 Cisteína (Cys)
 Metionina (Met)	 Tirosina (Tyr)
 Valina (Val)	 Asparagina (Asn)
 Isoleucina (Ile)	 Histidina (His)
 Alanina (Ala)	 Ácido glutâmico (Glu)
 Leucina (Leu)	 Arginina (Arg)
	 Glutamina (Gln)
	 Glicina (Gly)

Fonte: Lehninger (1980) *Apud* Corradini (2004).

A zeína é um polímero de maior custo quando comparado com amido e polietileno comum, apesar de ser extraída do glúten que tem baixo valor comercial. Este custo da zeína é devido ao seu processo de extração (Figura 3), o qual é feito por solução aquosa de álcool que deve ser removido ao final por evaporação, obtendo-se a fração protéica mais ou menos pura, dependendo da eficiência de remoção do solvente (CARTER; RECK, 1970; REINERS; WALL; INGLET, 1973). Estudos mostram que o custo para extração pode ser reduzido de forma a permitir maior competição com outros materiais para a produção de polímeros industriais (WU; MYERS; JOHNSON, 1997; PARRIS et al., 1997; DICKEY et al., 1998; SHUKLA, 2000).

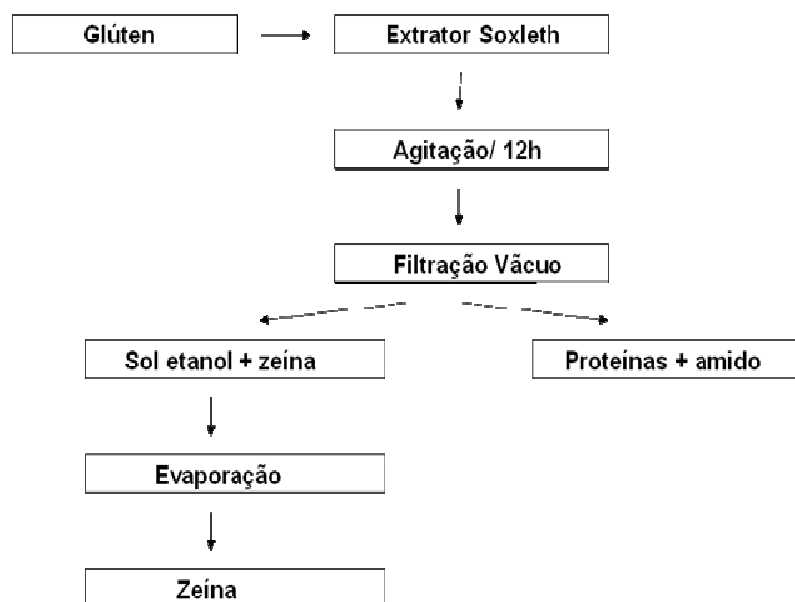


Figura 3 - Fluxograma simplificado da extração da zeína do glúten de milho.

A zeína, segundo Gaspar (1996), é uma família de proteínas altamente hidrofóbicas, sendo solúvel em álcool, ácido acético, fenol, detergentes, cetonas, cloreto de sódio, brometo de potássio, ésteres e glicol. Entre as soluções alcoólicas, as mais utilizadas são etanol 60 - 90 % ou isopropanol 55 %, sendo que o aumento da temperatura aumenta a curva da sua solubilidade em solução de etanol (ESEN, 1987; SHUKLA; CHERYAN, 2001). As zeínas podem ser separadas em diferentes

classes: α -zeínas, β -zeínas e γ -zeínas, conforme sua solubilidade em 40 - 85 %, 30 - 80 % e 0 - 80 % de isopropanol, respectivamente (ARGOS et al., 1982; ESEN, 1987; GASPAR, 1996). Essa classificação é também relacionada com os pesos moleculares de cada uma.

A α -zeína (Figura 4) corresponde de 75 a 85 % do total e é dominada por dois grupos de proteínas, Z19 e Z22 correspondendo aos pesos moleculares de 19 KDa e 22 KDa, respectivamente, de acordo com determinação feita por eletroforese (ARGOS et al., 1982).

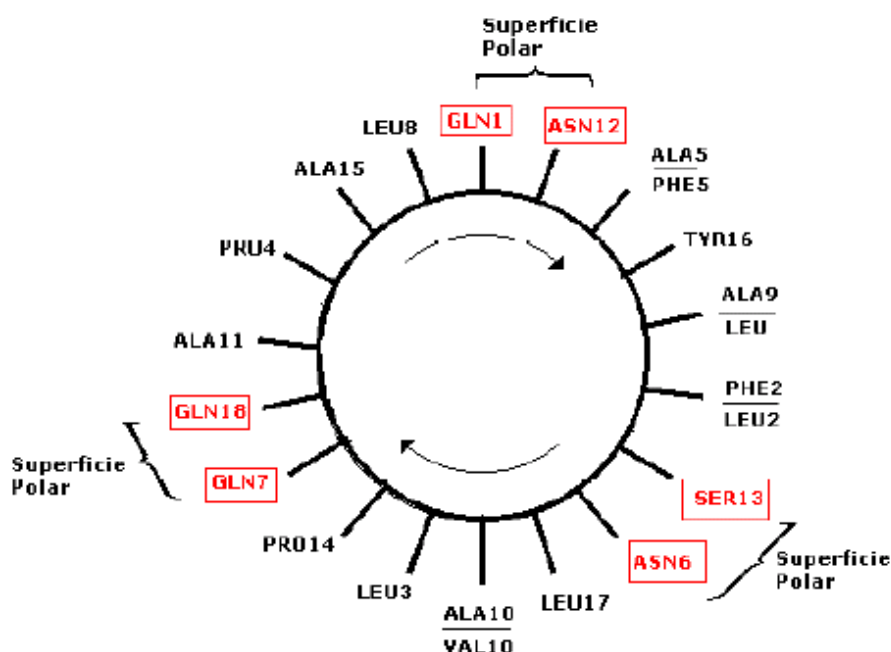


Figura 4 - Esquema do modelo da α -zeína: uma das hélices mostra as partes polares e apolares.

Fonte: Forato (2000).

As frações β e γ -zeína constituem de 10 - 15 % e 5 - 10 % do total com pesos moleculares de 17 KDa e 21,8 KDa, respectivamente (CHANVRIER et al., 2005). Segundo Pedersen et al. (1982); Heidecker, Chaudhuri (1991), a seqüência de aminoácidos obtida por cromatografia mostrou que a Z19 contém 210 aminoácidos e a Z22 possui 245. Estas zeínas (Z19 e Z22) possuem composição de aminoácidos similar, sendo que os mais abundantes são a glutamina (20 %), leucina (20 %),

alanina (14 %) e prolina (9 %), em que os apolares e hidrofóbicos são os responsáveis pela baixa solubilidade da zeína em água (MATSUSHIMA et al., 1997; LAWTON, 2002; CARVALHO FILHO, 2000; CORRADINI et al., 2007).

Tatham et al. (1993) reportaram que o modelo estrutural assimétrico de conformação da α -zeína pode explicar sua habilidade na formação de filmes. Moléculas em formato de longos bastões se orientam em camadas bi ou tridimensionais estabilizadas por pontes de hidrogênio entre os anéis dos resíduos polares formando o filme.

Outros estudos, realizados por Matsushima et al. (1997); Tatham et al. (1993); Argos et al. (1982), apresentam modelos para a representação estrutural de filmes produzidos com resinas de zeína, onde todos assumem que as moléculas de zeína formam fitas dobradas e agregadas em tetrâmeros, sendo que dois ou três tetrâmeros de espessura intercalados com camadas de outros componentes do filme, como o ácido graxo oléico, formam a estrutura básica do filme (Figura 5). De acordo com Dong, Sun, Wang (2004), pesquisas demonstram que os filmes de zeína são compostos por partículas cujos diâmetros podem ser alterados conforme o método de preparação do material.

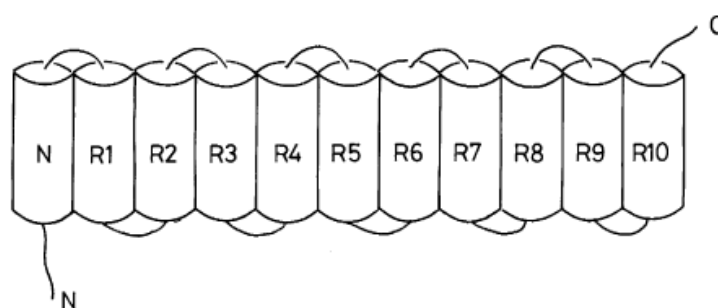


Figura 5 - Modelo de Matsushima para as α -zeínas. Os cilindros representam as hélices e as voltas são ricas em glutaminas.

Fonte: Matsushima et al. (1997).

3.3 - Biofilmes

Devido à poluição ambiental causada pelo uso de polímeros petroquímicos, o uso de materiais não poluentes ou biodegradáveis tem impulsionado muitos estudos e desde o final de 1980, filmes biodegradáveis têm atraído muita atenção nas indústrias de alimentos e de embalagem. Isto tem ocorrido pelo fato dos filmes

plásticos tradicionais, cuja maioria é não-biodegradável, poderem ser substituídos por biofilmes em algumas aplicações (CAO; FU; HE, 2006).

Os biofilmes podem ser filmes flexíveis que minimizam a permeação de umidade, oxigênio, dióxido de carbono, aromas e a migração de lipídios. Podem também carregar compostos antimicrobianos, antioxidantes e aditivos além de conferir proteção mecânica e auxiliar no aumento da vida de prateleira dos alimentos (McHUGH; KROCHTA, 1994(a); CHEN; NUSSINOVITCH, 2000).

A solução filmogênica quando aplicada e formada diretamente na superfície de um produto alimentício (frutas, por exemplo) recebe a denominação de cobertura ou revestimento, enquanto a denominação filmes é dada a materiais de proteção utilizados em embalagens e outros fins, após serem formados separadamente (THARANATHAN, 2003). Quando são completamente degradados por microorganismos são considerados biodegradáveis, sendo chamados de biofilmes. Em alguns casos, também podem ser comestíveis. A técnica “casting” é útil em formar filmes não fixos em um objeto suporte e é o procedimento mais usado para analisar as propriedades filmogênicas dos materiais. Nessa técnica, a solução filmogênica é colocada em superfícies planas e deixada para evaporação do solvente. Após secos, os filmes são retirados e armazenados para análises estruturais e de comportamento (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000).

Para a elaboração de uma solução filmogênica biodegradável são necessários constituintes básicos como agentes de alta massa molar, denominados formadores de matriz (lipídios, proteínas e polissacarídeos), solventes (água e etanol), agentes plastificante/plasticizante (glicerol, sorbitol, triacetina e ácidos graxos) e quando necessário um ajustador de pH. Cada um desses componentes é utilizado em diferentes combinações buscando oferecer características distintas para o biofilme (BATISTA, 2004).

Os plasticizantes são compostos orgânicos de baixo peso molecular que são utilizados para reduzir as forças de ligação entre moléculas, conferindo alta mobilidade molecular e flexibilidade ao filme (McHUGH; KROCHTA, 1994(a); LAWTON, 2004). Entretanto, o excesso de plasticizantes pode resultar na redução das propriedades mecânicas dos filmes, e em alguns casos, redução da barreira ao vapor d'água (WEI; BAIANU, 1999; COUPLAND et al., 2000; MALI et al., 2006;

SESSA et al., 2003). Dentre os plasticizantes mais usados em filmes com matriz protéica como a zeína do milho, incluem-se o glicerol, polietilenoglicol, trietilenoglicol e polipropilenoglicol (YOSHINO; ISOBE; MAEKAWA, 2002; HA; PADUA, 2001; MECITOGLU, 2006). O glicerol é o mais utilizado, embora possua uma natureza hidrofílica (CORRADINI et al., 2006). Muitas formulações também incluem o uso de ácidos graxos como o oléico, linoléico, esteárico e palmítico. Segundo Ha, Padua (2001) esses ácidos graxos insaturados fornecem maior flexibilidade aos filmes. Na literatura encontram-se inúmeros trabalhos usando o ácido oléico (LAI; PADUA, 1997; LAI; GEIL; PADUA, 1999; SANTOSA; PADUA, 1999; WANG; CROFTS; PADUA, 2003; LAWTON, 2004).

Alguns óleos vegetais comestíveis apresentam alto teor de ácido oléico e podem ser usados, potencialmente, como plasticizantes na produção de biomateriais com zeína. Entre os óleos com alto teor de ácido oléico destacam-se o óleo de buriti, o de macadâmia e o de oliva, todos com teores do ácido superiores a 60 %.

O óleo de buriti e o de macadâmia, produzidos no Brasil, possuem elevado valor comercial e são de fácil aquisição. O óleo de buriti contém 73 a 76 % de ácido oléico é rico em beta-caroteno e quando misturado a polímeros, produz um plástico capaz de assimilar radiação solar devido às suas propriedades ópticas (ERENO, 2005; MANHÃES, 2007). O óleo de macadâmia contém 61,5 % de ácido oléico e é rico em vitamina E (VITALATMAN, 2010). O azeite de oliva é um óleo altamente comercializado e consumido no Brasil e tem grande importância pelas suas propriedades nutricionais, contém 72,5 % de ácido oléico (MANHÃES, 2007).

3.4 - Propriedades Gerais dos Biofilmes

3.4.1 - Espessura

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). Devido ao processo de fabricação utilizado, alguns defeitos podem ocorrer nos filmes, o que, conseqüentemente, pode afetar o desempenho da embalagem confeccionada com este material. Um dos mais graves defeitos de fabricação dos filmes biodegradáveis por moldagem é a heterogeneidade de sua espessura.

Segundo Gennadios, Weller, Testin (1993); Sobral (1999), o controle da espessura dos filmes é importante para manter sua uniformidade, permitindo a repetitividade dos resultados de análises, podendo-se assim realizar comparações entre as propriedades dos filmes. Quando a solução filmogênica é depositada no suporte para secagem, é importante controlar o nível da superfície em que o mesmo é mantido, para evitar diferenças na espessura dos filmes.

3.4.2 - Textura / Aparência

De uma forma geral, a textura está relacionada com a aparência do filme e pode ser avaliada por observações visuais e táteis. O filme deve apresentar uma superfície contínua e homogênea, ou seja, não deve apresentar rupturas após o processo de secagem, nem partículas insolúveis, poros abertos, zonas de opacidade ou diferenças de coloração (CARVALHO FILHO, 2000).

Filmes biodegradáveis produzidos apenas com proteína tendem a ser quebradiços e difíceis de manusear, porém essas características 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 (a)).

Em biofilmes, os plasticizantes competem pela ligação de hidrogênio e interações eletrostáticas entre as cadeias dos polímeros, reduzindo a interação entre as mesmas, assim, o material torna-se mais flexível e há uma diminuição das possíveis discontinuidades e zonas quebradiças (SCHROOYEN et al., 2001; KROCHTA, 2002).

3.5 - Caracterização Estrutural dos Biofilmes

O conhecimento da conformação estrutural dos biofilmes por meio da identificação da incorporação dos materiais, formando uma estrutura homogênea ou ainda, a separação dos mesmos, auxilia no entendimento de suas propriedades funcionais. Os tópicos seguintes apresentam as técnicas mais usadas nas caracterizações desse tipo de material.

3.5.1 - Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR permite visualizar mudanças tanto na sua superfície quanto no seu interior (JAWHARI; QUINTANILLA; PASTOR, 1994; EVORA et al., 2002). Esta análise é capaz de fornecer informações sobre as estruturas secundárias das proteínas por meio de movimentos vibracionais ou rotacionais, que resultam em uma alteração do momento dipolar. A absorção no infravermelho (IV) ocorre com o acoplamento entre o campo elétrico oscilante da vibração molecular e o da radiação incidente. O espectro de IV de uma proteína é decorrente das absorções do grupo peptídico, que são conhecidos como bandas de amida I, II, III, sendo que a banda de amida I é a responsável pela maior quantidade de informação sobre as estruturas secundárias das proteínas (SCRAMIM, 2007(b)).

A faixa de radiação de maior interesse para a espectroscopia se encontra na região de 4000 a 400 cm^{-1} (infravermelho médio). Nos espectros de IV a intensidade das bandas de absorção é dada em termos de transmitância ou absorbância, e a posição em números de onda (cm^{-1}), que é o inverso do comprimento de onda (FORATO, 2000).

Segundo Vanin (2003), o estudo de adsorção de proteínas é feito por intermédio do grupo amida das proteínas. Este grupo exhibe bandas características em 1650 cm^{-1} (amida I), 1550 cm^{-1} (amida II) e em 1300 cm^{-1} (amida III). O estudo das estruturas secundárias de proteínas com IV utiliza geralmente a absorção da amida I pois a posição dessa absorção (1600 - 1700 cm^{-1}) depende do tipo de estrutura secundária predominante (FORATO; YUSHMANOV; COLNAGO, 2004). A banda de amida I é devida principalmente ao estiramento C=O dos grupos peptídicos enquanto a amida II refere-se ao estiramento da ligação CN e dobramento da ligação NH. A amida A, de banda intensa e larga, é caracterizada principalmente devido ao estiramento do grupo NH e OH dos aminoácidos das proteínas (OSIRO, 2004; CORRADINI, 2004; BARTH, 2007; SILVA, 2009).

Na Figura 6 é apresentado um espectro no infravermelho da proteína zeína, onde se indica as absorções de amida I.

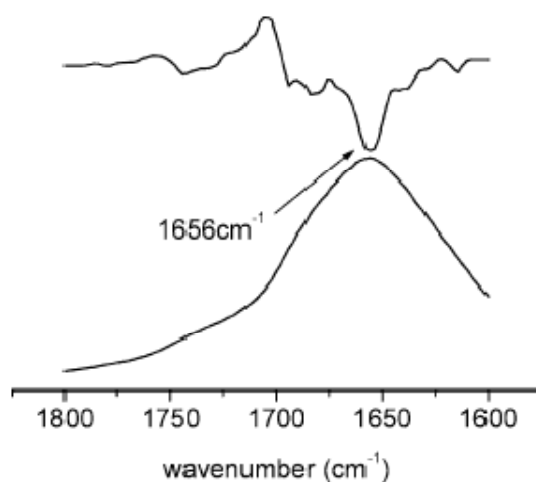


Figura 6 - Espectro IV para a zeína, na região da amida I (1800 a 1600 cm^{-1}).

Fonte: Forato, Bicudo, Colnago (2003).

3.5.2 - Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier acoplada à Técnica de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

Vários grupos de pesquisadores vêm empregando a técnica de FTIR-ATR a fim de estudar a adsorção quantitativa de proteínas na superfície de materiais poliméricos, bem como mudanças conformacionais sofridas pelas moléculas de proteínas, com o objetivo de obter informações a respeito do processo de adsorção, de grande interesse em sistemas biológicos (FINK et al., 1987; PITT; COOPER, 1988; STRAATEN; PEPPAS, 1991; JEON; SPERLINE; RAGHAVANS, 1992; FU; FULLER; SINGH, 1993). Apesar das vantagens da utilização da técnica FTIR-ATR, a mesma requer um contato perfeito entre a amostra e o elemento de reflexão interna (IRE) devendo a superfície do filme ser lisa, homogênea e regular para a obtenção de resultados satisfatórios (VANIN, 2003). A Tabela 2 apresenta algumas vantagens da utilização da FTIR-ATR.

Tabela 2 - Principais vantagens da utilização da FTIR-ATR sobre outras técnicas de análise de proteínas.

-
- 1- Rápida aquisição de dados: até 10 espectros por segundo. Os dados podem ser obtidos quase que continuamente e possibilidade de apresentar resultados em tempo real.
 - 2- Capacidade de obtenção de dados de sistemas fisiológicos intactos em ambientes aquosos por meio da subtração do “background”.
 - 3- Potencial para análise de multicomponentes de espectros complexos.
 - 4- Observação da conformação macromolecular por meio da deconvolução de bandas espectrais.
 - 5- Não requer preparação destrutiva da amostra.
 - 6- Sensibilidade à superfície.
-
- 7- Simplicidade no procedimento de medida.
-

Fonte: Fink, Chittur (1986).

Para Vanin (2003), uma das técnicas de infravermelho mais popular, a Espectroscopia de Refletância Total Atenuada (ATR), tornou-se mais amplamente utilizada após a sua combinação com a transformada de Fourier (FT). Na ATR, a amostra é colocada em contato com um cristal denominado “elemento de reflexão interna” (IRE), conforme ilustra a Figura 7.

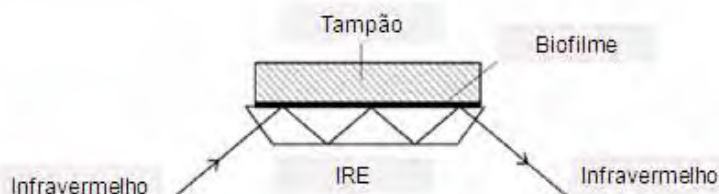


Figura 7. Esquema da análise de Espectroscopia de Refletância Total Atenuada (ATR).

Fonte: Barth (2007).

3.5.3 - Microestrutura

A microscopia eletrônica vem sendo usada há algumas décadas para estudar a estrutura global de proteínas, principalmente estruturas quaternárias (FORATO, 2000). A análise mais utilizada para avaliar a microestrutura de filmes biodegradáveis é a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Entretanto, se o filme é diretamente submetido ao feixe de luz será degradado. Uma alternativa é utilizar um feixe de luz de intensidade baixa, 5 a 15 kV. Segundo Batista (2004), a visualização a partir da microscopia eletrônica de varredura permite a identificação da incorporação dos materiais formando uma estrutura homogênea ou, ainda, a separação dos mesmos observando uma estrutura heterogênea.

Outra técnica muito importante para complementar a MEV sobre a homogeneidade da matriz dos biofilmes é a Microscopia Óptica (MO), pois permite a sua caracterização pela observação da cor e forma dos componentes da matriz filmogênica. Segundo Santos (2004), trata-se de uma ferramenta bastante útil, rápida e de baixo custo.

3.5.4. Difração de Raios-X

O método de espalhamento de raios-X é uma das técnicas mais antigas e mais usadas no estudo da estrutura dos polímeros. Um feixe de raios-X incidente em um material é parcialmente absorvido, outra parte é espalhada e o restante é transmitido sem modificação. O espalhamento dos raios-X ocorre como um resultado da interação com os elétrons no material. Os raios-X espalhados sofrem interferência entre si e produzem um padrão de difração que varia com o ângulo de espalhamento. A variação da intensidade espalhada e difratada com o ângulo dá informações sobre a distribuição de densidade eletrônica e, portanto, das posições atômicas dentro do material (ROE, 1985).

As técnicas de espalhamento de raios-X mais comuns são a difração de raios X em altos ângulos (WAXS - *Wide-Angle X-ray Scattering*) e difração de raios X em ângulos baixos (SAXS - *Small-Angle X-ray Scattering*). Em termos gerais, WAXS é usado para obter informações na escala de 1 nm ou menor e SAXS na escala de 1 a 1000 nm.

Segundo Roe (1985), o padrão de espalhamento de um polímero amorfo

consiste somente de picos amorfos alargados (halos) que, entretanto oferecem muitas informações úteis sobre o estado de empacotamento das moléculas no interior do polímero amorfo. A relação de Bragg (Equação 1) pode ser usada como uma boa regra prática para estimar a escala de tamanho d (espaço d) da estrutura responsável pelo espalhamento. Em WAXS, o menor ângulo 2θ no qual a intensidade pode ser medida convenientemente está em torno de 6° .

$$d = \frac{\lambda}{2} \cdot \sin \theta \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo:

d : espaço d

λ : comprimento de onda da radiação

θ : o ângulo de máxima intensidade de espalhamento

Um feixe de raios-X monocromático incidindo em um cristal, em ângulos variáveis, produz um gráfico chamado de difratograma. As intensidades são colocadas em função do ângulo de espalhamento 2θ , que é o ângulo entre a onda incidente e a onda espalhada. (CASTRO, 2006).

A difração de raios-X encontra aplicação na determinação do grau de cristalinidade do polímero. O difratograma pode ser dividido e ajustado matematicamente em duas partes: uma amorfa e a outra cristalina. A quantificação destas áreas permite avaliar o grau de cristalinidade de um polímero. O estado cristalino é caracterizado pelo arranjo tridimensional ordenado das moléculas, sendo por isso um estado de alta estabilidade. O estado vítreo ou amorfo caracteriza-se pelo arranjo desordenado das moléculas apresentando uma configuração metaestável. As estruturas cristalinas podem ser determinadas mediante análise de difração de raios-X. A presença de picos difusos e largos para materiais amorfos deve-se ao fato de que neste estado, as moléculas estão arranjadas desordenadamente produzindo bandas dispersas. Ao passo que materiais cristalinos

por estarem em um estado altamente ordenado produzem picos afiados e definidos (BARBOSA et al., 2009).

3.6 - Propriedades Funcionais dos Biofilmes

3.6.1 - Opacidade / Transparência

A avaliação da opacidade de um material demonstra sua maior ou menor transparência, que, segundo Villalobos et al. (2005), trata-se de uma propriedade relevante do filme, uma vez que tem um impacto direto sobre a aparência do produto revestido.

A baixa transparência de um material é caracterizada pelo bloqueio da passagem de luz. O grau de opacidade depende do conteúdo e do tamanho das partículas de lipídio dispersas na matriz do material. Quando há formação de matriz homogênea, a adição de lipídeos muda a aparência dos filmes que se tornam mais opacos (BERTAN, 2003), porém se não houver incorporação destes lipídeos na matriz, haverá mais espaços entre os ácidos graxos e, portanto, ocasionará uma maior 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 mostrar as características originais do produto, como a cor, por exemplo. A transmissão de luz é necessária em embalagens cujo objetivo é mostrar o conteúdo, mas deve ser controlada quando os alimentos são susceptíveis à deterioração pela luz, como a oxidação lipídica, destruição da riboflavina e pigmentos naturais (YANG; PAULSON, 2000; MATTA JUNIOR, 2009).

A coloração e a opacidade dos filmes não devem ser alteradas ao longo do armazenamento do material, uma vez que essa mudança de aspecto pode prejudicar a aceitação do produto que foi acondicionado no filme (SAKANAKA, 2002).

3.6.2 - Permeabilidade ao Vapor d'Água (PVA)

A permeabilidade ao vapor d'água dos filmes é outro fator que interfere na qualidade e vida de prateleira dos alimentos embalados. A água liberada pelas frutas e hortaliças no seu metabolismo pós-colheita deve ser parcialmente removida do interior da embalagem para evitar desenvolvimento de microorganismos nocivos. Alterações de aparência e peso no alimento também podem ocorrer devido à maior ou menor passagem da água pelo filme.

Segundo Sobral, Ocuno (2000), 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 útil para embalagens de vegetais frescos, enquanto um filme pouco permeável poderá ser indicado, por exemplo, para produtos desidratados. A barreira à umidade em plásticos pode ser avaliada por meio da determinação da PVA, que é a quantidade de água que passa por unidade de área e tempo, com temperatura e umidade relativa específicas (SCHNEIDER; TORRES, 2006).

Inúmeros autores se interessam pelo efeito dos plasticizantes na PVA dos filmes. Maior quantidade desses componentes como o glicerol, diminui as forças intermoleculares entre as cadeias de macromoléculas adjacentes dos polímeros. Como efeito, ocorre a diminuição da temperatura de transição vítrea (T_g) e conseqüente aumento da flexibilidade do material (diminuindo sua resistência), o que afeta todas as propriedades funcionais dos biofilmes, inclusive a PVA (McHUGH; KROCHTA, 1994(b); CUQ et al., 1997; SOBRAL, 1999; SANTOSA; PADUA, 1999; MALI et al., 2006). Segundo Péroval et al. (2002), a resistência de um filme ao vapor d'água é inversamente proporcional à polaridade dos lipídios. Características mais específicas, como o estado físico e propriedades de conformação, polimorfismo e viscoelasticidade do plasticizante podem, também, influenciar a PVA dos biofilmes.

Conhecendo a permeabilidade do biofilme pode-se obter a sua permeância dividindo-se o seu valor pela espessura do material (WOLF, 2007). O resultado refere-se a uma avaliação de desempenho e não uma propriedade inerente do filme.

A PVA depende de vários fatores externos como temperatura, umidade relativa e pressão além do tipo de material usado na confecção do filme. Em filmes de zeína industrial estudados por Lai, Padua (1998), a PVA 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). Esta menor permeabilidade pode ser explicada pelos aminoácidos predominantes na zeína, que são apolares e hidrofóbicos. Quando comparado os valores com filmes de PEBD ($0,003 \text{ g.mm/m}^2.\text{h.kPa}$ a 38°C) a PVA mostrou-se muito maior (SMITH, 1986).

A aplicação de uma camada de óleos secantes (linhaça, por exemplo) em filmes de zeína reduz a PVA na ordem de dez vezes, obtendo-se valores em torno de $0,005 \text{ g.mm/m}^2.\text{h.kPa}$ a 25°C (RAKOTONIRAINY; PADUA, 2001). Segundo Wang, Padua (2004) filmes de zeína possuem menor PVA quando comparados a outras proteínas, porém a adição de plasticizantes faz com que a PVA aumente. Os autores encontraram uma PVA dos filmes de zeína no valor de $3,7 \text{ g.mm/m}^2.\text{dia.kPa}$ enquanto que para os filmes de zeína adicionados de glicerol foi de $47 \text{ g.mm/m}^2.\text{dia.kPa}$.

3.6.3 - Isotermas de Sorção

A deterioração de um alimento é normalmente resultante do crescimento de microrganismos, atividade enzimática e reações químicas, as quais dependem da presença de água (PEDRO, 2009). A atividade de água (a_w) de um produto está intrinsecamente relacionada à sua vida de prateleira. Produtos com atividade de água mais baixa geralmente estão menos sujeitos à degradação por microrganismos e por reações químicas (FERREIRA; PENA, 2003). A partir do seu conhecimento podem-se propor sistemas adequados de embalagem de um produto. Por esta razão, muita atenção tem sido dada a propriedades de sorção de alimentos (AL-MUHTASEB; McMINN; MAGEE, 2004).

A tendência de um material em adsorver água do ambiente onde se encontra define a higroscopicidade, uma característica fundamental dos produtos alimentícios que pode influenciar os processos de manuseio, processamento, estocagem e consumo (LABUZA, 1968). O estudo da higroscopicidade dos alimentos pode ser

feito por meio das isotermas de sorção, que são as curvas que relacionam o conteúdo de umidade do produto e sua atividade de água (a_w), a temperatura e pressão constantes (CHAVES et al., 2004). No equilíbrio, a a_w se iguala à Umidade Relativa (UR) do ambiente no qual o produto se encontra. A relação entre a_w e UR de equilíbrio permite prever se o alimento irá ganhar ou perder umidade quando for exposto num ambiente com UR conhecida, assim fornece boa indicação da estabilidade do produto durante a estocagem. As isotermas podem ser de adsorção (ganho de umidade) ou de dessorção (perda de umidade).

A temperatura, por afetar a mobilidade das moléculas de água e o equilíbrio dinâmico entre o vapor e a fase adsorvida, deve ser mantida constante. Para um valor de a_w constante, o aumento na temperatura provoca uma redução na quantidade de água adsorvida, assim, o aumento na temperatura promove maior atividade de água, reduzindo a qualidade do produto (REIS, 2005).

Há dois métodos de obtenção das isotermas: estático e dinâmico. No estático, as amostras permanecem em um recipiente fechado, com UR e temperatura controladas, até atingir o equilíbrio higroscópico. Uma maneira de se obter uma UR específica é a utilização de soluções saturadas de sais num recipiente fechado. No método dinâmico, a amostra é submetida a uma corrente de ar forçada, com UR e temperatura constantes.

De acordo com Heldman; Lund (1992) a isoterma pode ser dividida em três regiões, dependendo do estado em que se encontra a água no alimento. A primeira região, que cobre a faixa de a_w de 0 até 0,2, representa a adsorção de um filme monomolecular de água. A segunda região, entre 0,2 e 0,7, representa a adsorção de camadas adicionais de água sobre a monocamada e, acima de 0,7 encontra-se a região em que a água condensa nos poros do material e solubilizam compostos solúveis presentes. Geralmente, sistemas com alto teor protéico apresentam maior incidência de isotermas da forma sigmoideal (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1993; ALVES, 2007).

Vários autores têm estudado modelos matemáticos que descrevem o comportamento de sorção de umidade. Alguns desses modelos estão baseados na teoria do mecanismo de sorção, outros são empíricos ou semi-empíricos (RIZVI, 1995). Equações empíricas e semi-empíricas têm sido propostas para correlacionar

a umidade de equilíbrio com a a_w de produtos alimentícios. Algumas delas são descritas a seguir.

- Modelo de BET (Brunauer, Emmet e Teller):

Analisando aspectos da natureza química da umidade, Brunauer, Emmet e Teller (BET) propuseram, para camadas polimoleculares a seguinte expressão (PARK; NOGUEIRA, 1992).

$$X_{eq} = \frac{(X_m \cdot C \cdot aw) \cdot (1 - (n + 1) \cdot aw^n + n \cdot aw^{n+1})}{(1 - aw) \cdot (1 + (C - 1) \cdot aw - C \cdot aw^{n+1})} \quad (\text{Eq. 2})$$

- Modelo de GAB (Guggenheim, Anderson e Boer):

Equação que permite um melhor ajuste dos dados de sorção até a atividade de água de 0,9. A equação de GAB, segundo Van Den Berg (1985) é descrita como:

$$X_{eq} = \frac{X_m \cdot C \cdot K \cdot aw}{(1 - K \cdot aw) \cdot (1 - K \cdot aw + C \cdot K \cdot aw)} \quad (\text{Eq. 3})$$

- Modelo de Oswin:

Baseia-se na expansão matemática para curvas de formato sigmoidal (OSWIN, 1946).

$$X_{eq} = A \cdot \left(\frac{aw}{1 - aw} \right)^B \quad (\text{Eq. 4})$$

- Modelo de Peleg:

Modelo empírico de quatro parâmetros que visa conjugar duas tendências em uma equação (PELEG, 1993).

$$X_{eq} = K_1 \cdot aw^{n_1} + K_2 \cdot aw^{n_2} \quad (\text{Eq. 5})$$

- Modelo de Halsey:

Halsey (1985) desenvolveu um modelo para a condensação das camadas a uma distância relativamente grande da superfície. O modelo proposto é dado por:

$$aw = \exp\left(\frac{-a}{X_{eq}^b}\right) \quad (\text{Eq. 6})$$

- Modelo de Henderson:

Segundo Park et al. (2008), um dos modelos mais usados para a predição de isotermas é a equação empírica de Henderson (1952).

$$X_{eq} = \left(\frac{\ln(1 - aw)}{k(T)}\right)^{1/N} \quad (\text{Eq. 7})$$

Sendo:

X_{eq} = teor de água de equilíbrio (Kg água / Kg peso seco)

X_m = teor de água na monocamada molecular (Kg água / Kg peso seco)

aw = atividade de água, adimensional

$C, K, N, n, A, B, K_1, K_2, n_1, n_2, a, b$ = constantes de ajustes dos modelos; A restrição para a equação de Peleg é que $n_1 < 1$ e $n_2 > 1$

T = temperatura absoluta (Kelvin)

3.6.4 – Solubilidade em Água

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. Segundo Veiga-Santos (2004), a solubilidade de filmes biodegradáveis é de grande importância, uma vez que a grande maioria é elaborada a partir de carboidratos e proteínas que possuem grande afinidade com a água. Segundo Perez-Gago, Krochta (2001), em alguns casos a solubilidade em água é requerida, como no preparo de desidratados (sopas instantâneas, arroz semi-prontos) que devem sofrer uma hidratação prévia ao consumo.

A solubilidade dos materiais é avaliada pela porcentagem de peso seco não solubilizado, após a imersão da amostra em água destilada por 24 horas sob agitação. Pela diferença entre o peso seco inicial da amostra e peso seco após a solubilização, calcula-se a porção solúvel da amostra.

3.6.5 - Molhabilidade

A interação entre uma superfície e um determinado líquido pode ser estudada medindo-se o ângulo de contato θ do líquido com a superfície. A definição desse ângulo, mostrada na Figura 8 indica a hidrofobicidade ou molhabilidade da superfície do polímero.

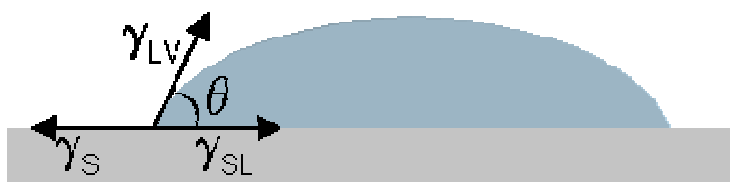


Figura 8 - Ângulo de contato entre o líquido e a superfície. γ_S é a energia de superfície do sólido; γ_{LV} a tensão superficial do líquido em equilíbrio com o vapor; e γ_{SL} é a energia da interface sólido-líquido.

Fonte: Péroval et al. (2002).

A análise do ângulo de contato pode ser utilizada em filmes biodegradáveis para avaliar sua polaridade e o seu caráter hidrofílico por meio do acompanhamento

de sua variação desde o contato inicial até um tempo pré-determinado de 300 segundos. Em geral, para filmes convencionais obtidos de petróleo, o ângulo de contato é constante, não variando com o tempo. Entretanto, para filmes biodegradáveis, ele pode variar grandemente, com a completa absorção da gota pelo material (VEIGA et al., 2003).

Um ângulo de contato tende a 0° (Figura 9a) quando há um caso extremo de máxima afinidade química entre a superfície e o líquido e, portanto, haverá espalhamento completo do líquido no sólido. Quando o ângulo de contato tende a 180° (Figura 9c) há o outro caso extremo, em que o líquido não apresenta qualquer interação com a superfície. Um ângulo de contato menor que 90° (Figura 8b), indica que a superfície é molhada pelo líquido (WANG; FU; WANG, 2009).

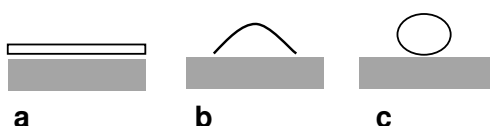


Figura 9 - Ângulo de contato: a) $\theta = 0^\circ$, a água é absorvida pelo material); b) $30^\circ < \theta < 90^\circ$, a água é parcialmente absorvida; c) $\theta > 90^\circ$, a água não é absorvida.

3.6.6 - Propriedades Térmicas

3.6.6.1 - Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A determinação da Temperatura de Transição Vítrea (T_g) tem despertado interesse entre os cientistas de alimentos, pois ajuda a explicar o comportamento químico e físico dos sistemas alimentícios (KUMAGAI; SUGIYAMA; IWANAMOTO, 2000).

Transição vítrea refere-se à temperatura na qual ocorre uma mudança de fase de segunda ordem nos materiais amorfos, é específica para cada material e corresponde a mudanças na mobilidade e flexibilidade molecular (PEREZ, 1994). A T_g está associada à região amorfa dos polímeros e representa a temperatura em que, devido à rotação de grupos laterais em torno de ligações primárias, se torna

restrita pela coesão molecular. Abaixo da T_g , desaparece a mobilidade das cadeias macromoleculares, e o material torna-se mais rígido (MANO, 1996).

Para Rogers (1985), o valor da T_g é governado primeiramente pela composição química e pela presença de plasticizantes e, secundariamente pelas características estruturais como ramificações da cadeia, ligações cruzadas e cristalinidade. O estudo da temperatura de transição vítrea também fornece informações quanto à miscibilidade / compatibilidade entre os constituintes da matriz de um filme, principalmente no caso de blendas / compósitos (CORRADINI; PINEDA; HECHENLEITNER, 1999).

Na temperatura de transição vítrea o sistema passa do estado vítreo para o estado borrachoso. O estado vítreo é caracterizado por alta viscosidade, rigidez e estabilidade, dada por uma baixa mobilidade molecular em que os movimentos estão restritos a rotacionais e de extremidade de fraca amplitude. O contrário ocorre no estado borrachoso, onde a viscosidade diminui bruscamente e aumenta a mobilidade das cadeias de macromoléculas (SOBRAL, 1999). De acordo como Rogers (1985), as propriedades mecânicas e de barreira dos polímeros estão relacionadas com a T_g . Assim, o conhecimento desta temperatura nos filmes comestíveis e / ou biodegradáveis ajuda na escolha das melhores condições de armazenamento, sendo esperado que a permeação a gases e ao vapor d'água seja maior acima da T_g , onde as cadeias de polímeros estão em maior movimento.

Muitas técnicas são utilizadas para determinar a temperatura de transição vítrea, entre elas a Calorimetria Exploratória Diferencial ou calorimetria diferencial de varredura (DSC) e a Análise Dinâmico-Mecânica (DMA), sendo esta última técnica três vezes mais sensível (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002). A calorimetria exploratória diferencial é a técnica que mede a diferença de energia fornecida à amostra em relação a um material de referência, enquanto ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura. A medida de temperatura é feita por meio de termopares fixados à base do suporte da amostra e da referência (CANEVAROLO JR., 2007). Segundo Santos (2004), são comuns duas varreduras para a análise de DSC, porém em alguns filmes biodegradáveis, após o final da primeira varredura, o material encontra-se deteriorado inviabilizando uma segunda varredura.

Alterações de temperatura da amostra são devidas à variações de entalpia endotérmicas ou exotérmicas, decorrentes de transições físicas ou de reações químicas. A área contida sob o pico é representativa da variação de entalpia (ΔH) sofrida pela amostra. As variações de entalpia são chamadas transições de primeira ordem (fusão, cristalização, vaporização, solidificação e adsorção) e são caracterizadas como picos, mesmo que eles possam sobrepujar um ao outro. As transições térmicas ditas de segunda ordem são acompanhadas de variação da capacidade calorífica da amostra, juntamente com variações dimensionais e viscoelásticas como, por exemplo, a transição vítrea (T_g), mas não apresentam variações de entalpia, não gerando picos nas curvas de DSC e sim, alterações na linha de base, geralmente chamados de “degraus”. Isto ocorre porque não há mudança na entalpia como em reações de fusão ou cristalização, mas somente uma mudança na capacidade calorífica (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

3.6.6.2 - Análise Termogravimétrica (TGA)

Termogravimetria (TG) é a técnica na qual a variação da massa de uma amostra é medida em função da temperatura e / ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura (SCHELEMMER; SALES; RESCK, 2010). É um método usado para determinação da taxa de decomposição de substâncias, quando há adição de materiais orgânicos e se deseja avaliar a estabilidade térmica e oxidativa destes (CORTEZ, 2009).

Segundo Lucas, Soares, Monteiro (2001), o resultado da análise TGA, em geral, é mostrado sob forma de um gráfico cuja abscissa contém os registros de temperatura ou tempo e a ordenada, o percentual em massa perdido ou ganho.

3.6.7 - Propriedades Mecânicas: Tensão de Ruptura (σ_r), Percentagem de Elongação na Ruptura (ϵ_r) e Módulo de Young (E)

Segundo Péroval et al. (2002), para revestimentos comestíveis são exigidas boas propriedades mecânicas e, portanto, o percentual de alongamento e resistência à tração dos filmes devem ser estudados.

As propriedades de tensão expressam a resistência do material à deformação por alongamento quando submetido à tração. Observando uma curva característica

de tensão *versus* deformação de filmes flexíveis, inicialmente o material oferece resistência crescente à solicitação de tração, a qual provoca seu alongamento. A partir de certo ponto, o aumento de resistência passa a ser menor para um mesmo aumento de deformação até o ponto de escoamento, a partir do qual é possível alongar o filme sem que este responda com um aumento de resistência. Continuando o alongamento, o material resiste até que ocorra sua ruptura (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

Conforme Figura 10, o equipamento de ensaio aplica gradativamente, a partir do zero, uma força de tração no corpo de prova. Assim, de forma genérica, pode-se dizer que, a cada valor de força aplicada F , corresponderá uma deformação ΔL do corpo. Continuando o aumento da força F , chega-se, como em (c) da figura, ao ponto de ruptura do material, finalizando o ensaio.

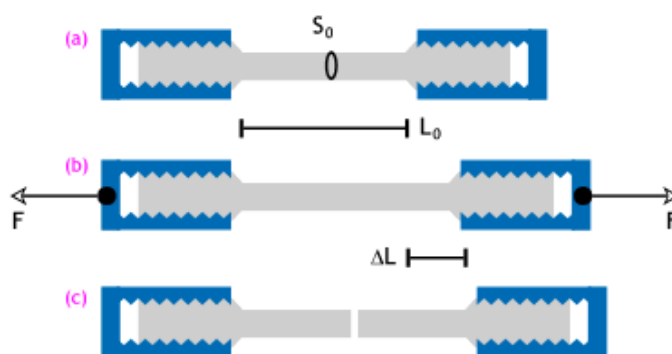


Figura 10 - Ensaio de tração demonstrando o comprimento da parte central do material (L_0), a área transversal (S_0), a força aplicada (F), a deformação do material (ΔL) e ruptura total, sendo: (a)- condição inicial, (b)- deformação e (c)- ruptura.

Segundo Sarantópoulos et al. (2002), a resistência à tração é comumente expressa em MPa, N/m^2 ou kgf/cm^2 . Já o fator de ruptura, é a relação entre a força máxima de tração por unidade de largura inicial do corpo de prova. É um parâmetro alternativo para caracterizar a resistência à tração de filmes cuja seção transversal não é homogênea. A percentagem ao alongamento é a relação entre o alongamento do corpo de prova e seu comprimento inicial, podendo ser determinada para a situação de ruptura.

Desta forma, três principais propriedades de tensão são de interesse para caracterizar o comportamento dos filmes plásticos quanto à resistência a uma solicitação externa: força de tensão de ruptura (σ_r), módulo de Young (E) e deformação na ruptura ou percentagem de alongação (ϵ_r). “ σ_r ” é a máxima força normal aplicada na seção transversal que o material em teste possa suportar; “ ϵ_r ” é a relação entre a força de tensão e a deformação sofrida pelo material submetido à solicitação e “E” é o módulo de elasticidade do material submetido a uma força de tração.

Lai, Padua (1997) determinaram essas propriedades para filmes de zeína-ácido oléico e compararam com as propriedades dos filmes de outros materiais. σ_r , ϵ_r e E para os filmes acondicionados a 25 °C e 50 % de umidade relativa foram de 9 MPa, 12 % e 267 MPa, respectivamente. Para filmes de colágeno, usados em salsicharia para embutidos, Hood (1987) encontrou valores de “ σ_r ” e “ ϵ_r ” de 3 a 11 MPa e de 25 a 50 %, respectivamente. A deformação na ruptura (ϵ_r) aumentou de 12 para 30 % e o módulo de Young (E) diminuiu de 267 para 150 MPa quando a umidade relativa aumentou de 50 para 98 %, enquanto a força de tensão de ruptura não foi afetada significativamente ($p > 0,05$) (LAI; PADUA, 1998). Este efeito é atribuído ao fenômeno de plasticização da zeína provocado pela umidade.

Plasticizantes são utilizados em filmes para reduzirem as forças de ligação entre moléculas em sistemas de baixa umidade, aumentando a flexibilidade do filme. No entanto, seu aumento pode resultar em redução nas propriedades mecânicas de tração dos filmes (COUPLAND et al., 2000). Segundo Mali et al. (2006), quanto maior a quantidade de glicerol na elaboração dos biofilmes, menor é a força de tensão de ruptura e do módulo de Young e maior a alongação na ruptura.

3.6.8 - Permeabilidade a Gases

Os gases de maior interesse na permeabilidade dos filmes são o oxigênio (O_2) e o dióxido de carbono (CO_2), pois afetam diretamente a taxa de respiração de vegetais e influenciam a cor de produtos cárneos embalados, modificando a vida de prateleira e qualidade desses produtos. Pode ocorrer deterioração do alimento, quando exposto a altas pressões de oxigênio, modificando as suas características sensoriais e nutricionais e diminuindo sua estabilidade no armazenamento. A

deterioração ocorre devido à oxidação de lipídeos, vitaminas, compostos de sabor e pigmentos (KESTER; FENNEMA, 1986). Segundo Bertan (2003), a deterioração pode ser controlada com o uso de filmes comestíveis e / ou biodegradáveis no revestimento ou embalagem do produto, de forma a controlar as permeabilidades ao oxigênio e gás carbônico.

As permeabilidades ao O_2 e CO_2 variam com o tipo de filme e da presença em sua formulação de outros componentes, como é o caso de substâncias secantes (óleos secantes) e substâncias plasticizantes (ácidos graxos). Como exemplo, tem-se a permeabilidade do polietileno de baixa densidade (PEBD) ao O_2 de $550 \text{ cm}^3/\text{dia}/100\text{in}^2$ a 25°C e 50 % de UR e ao CO_2 de $2900 \text{ cm}^3/\text{dia}/100\text{in}^2$ a 25°C e 50 % de UR. Filmes de celofane são os que apresentam menor permeabilidade (em torno de $1 \text{ cm}^3/24\text{h}/100\text{in}^2$, tanto para o O_2 quanto para o CO_2) (HANLON, 1992).

A permeabilidade ao oxigênio (PO_2) é definida pela quantidade do gás que atravessa uma unidade de área, paralelamente à superfície de um filme ou chapa plástica, por unidade de tempo, sob as condições de ensaio (REIS, 2005). Conforme a Figura 11, o corpo de prova é fixado entre duas câmaras à pressão atmosférica ambiente, deixando uma área superficial de contato. Numa das câmaras há um fluxo contínuo de nitrogênio (gás inerte de arraste), enquanto na outra câmara há um fluxo de ar com oxigênio. À medida que o oxigênio permeia o material, ele será conduzido pelo gás de arraste até um detector coulométrico, em que produzirá uma corrente elétrica. A intensidade da corrente será proporcional à quantidade de oxigênio que chega ao detector por unidade de tempo (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

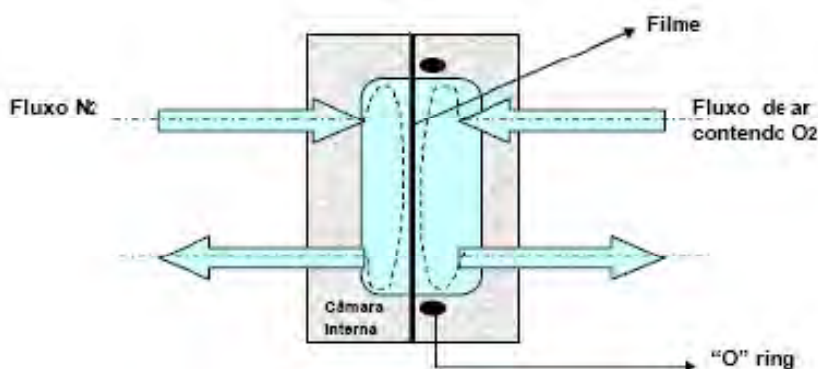


Figura 11 - Ilustração do funcionamento do equipamento OX-TRAN 2/20 utilizado para análise de permeabilidade ao oxigênio.

Fonte: Reis (2005).

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da UNESP - campus de São José do Rio Preto e em outras unidades ou instituições listadas:

- Depto. Biologia Animal - UNESP/São José do Rio Preto;
- Depto. Física - UNESP/São José do Rio Preto;
- Embrapa - CNPDIA/São Carlos;
- Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada - ITAL, Campinas;
- IMA - Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano – UFRJ, Rio de Janeiro;
- CCDM - Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais - UFSCar - UNESP, São Carlos.

4.1 - Materiais

A proteína zeína foi obtida da indústria “Freeman Industries, Inc. NY, USA” e utilizada na proporção de 20 g zeína / 100 mL etanol 75 %. Óleos naturais comestíveis, com alta percentagem de ácido oléico em sua composição (macadâmia, oliva e buriti), e o ácido oléico (VETEC, Brasil) foram adquiridos no comércio local e utilizados na proporção de 70 g / 100 g proteína. Utilizou-se o glicerol (Merck, Brasil) na proporção de 30 g glicerol / 100 g proteína como coadjuvante do agente plasticizante. O emulsificante Emustab[®] (Duas Rodas Industrial Ltda., Brasil) foi utilizado na proporção de 5 g para 100 g proteína para facilitar a formação da emulsão. Trata-se de um emulsionante à base de monoglicerídeos destilados, monoestearato de sorbitana e polysorbato 60.

O biofilme formulado com ácido oléico puro foi considerado controle para uma melhor comparação dos resultados.

4.2 - Métodos

4.2.1 - Composição em Ácidos Graxos dos Plasticizantes Utilizados

As análises de composição em ácidos graxos, dos óleos comestíveis e do ácido oléico utilizados, foram realizados no Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada, ITAL, Campinas, seguindo as metodologias de Hartman (1973); Holland (2002); Horwitz (2005); Firestone (2006).

4.2.2 - Caracterização da Zeína em Pó por Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A zeína, na forma de pó, foi caracterizada por espectroscopia no infravermelho (FTIR) conforme Bicudo et al. (2005). Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro (Spectrum 1000, FT-IR Spectrometer - Perkin Elmer) com 16 varreduras, na região de 4000 a 400 cm^{-1} , intervalo de 2 cm^{-1} e resolução 4 cm^{-1} . Utilizou-se a técnica de pastilhamento com 1 mg de zeína para 100 mg de brometo de potássio (KBr).

4.2.3 - Preparação dos Biofilmes de Zeína

Para a formação dos biofilmes, a zeína e a solução aquosa de etanol 75 % foram agitados magneticamente por 5 minutos. Adicionou-se o glicerol, o ácido oléico (ou os óleos comestíveis) e o emulsificante nas proporções citadas anteriormente (Ítem 4.1) e agitou-se mecanicamente a 65 °C a 250 rpm durante 10 minutos, seguindo Kleen, Padua, Engeseth (2002). Em seguida, essa solução foi aplicada em placas retangulares de acrílico (suporte) e o material mantido à temperatura de 25 °C, sobre superfície nivelada durante 24 horas para secagem. Este procedimento de secagem foi feito em função de observações relatadas por Batista (2004), em estudo com biofilmes de pectina e ácidos graxos, que ao realizarem a secagem em estufa a 30 °C os materiais apresentavam regiões com diferentes colorações esbranquiçadas indicando migração dos lipídios para alguns locais da placa de plaxiglass.

Após esse período de 24 horas para secagem, os filmes foram retirados das placas e armazenados em dessecadores, com umidade relativa 55 a 58 % (NaBr) e temperatura de 25 a 28 °C, para posteriores análises.

4.2.4 - Caracterização Geral dos Biofilmes

4.2.4.1 - Aspecto Visual

Após a secagem dos filmes, foram realizadas análises visuais e táteis de acordo com Bertan et al. (2005), visando utilizar apenas os filmes que fossem homogêneos. Verificou-se a coloração, espessura, presença de partículas insolúveis, continuidade dos filmes, isto é, sem apresentar rupturas ou zonas quebradiças, e a facilidade na retirada dos suportes, indicando uma boa manuseabilidade. Os biofilmes que não apresentaram essas características foram descartados uma vez que poderiam comprometer os resultados das análises posteriores.

4.2.4.2 - Espessura

A espessura foi obtida pela média aritmética dos valores de seis pontos aleatórios em diferentes segmentos dos filmes (PEREZ-GAGO; KROCHTA, 2000; HSU et al., 2005). Utilizou-se para as medidas um micrômetro digital (Digimess) com resolução de 0,001 mm.

4.2.5 - Caracterização Estrutural dos Biofilmes

4.2.5.1 - Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier acoplada à Técnica de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

A análise FTIR-ATR dos quatro tipos de filmes foi realizada no Depto de Física da UNESP, campus de São José do Rio Preto. Amostras de aproximadamente 7 x 70 mm foram fixadas no ATR com o uso de espectrofotômetro (Nicolet Nexus 670 Ft-IR ESP). Os espectros foram obtidos com 128 varreduras, na

região de 4000 a 1200 cm^{-1} (faixa permitida pelo equipamento utilizado e a de maior interesse para as bandas protéicas), intervalo 2 cm^{-1} e resolução 4 cm^{-1} .

4.2.5.2 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microestrutura superficial dos filmes foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no Depto de Biologia Animal da UNESP, campus de São José do Rio Preto. A seqüência para a preparação do espécime incluiu a montagem sobre os suportes de alumínio (*stubs*) e a metalização (*sputtering*) segundo Ghanbarzadeh et al. (2007); Georget, Barker, Belton (2008). Amostras dos filmes foram fixadas em *stubs* de 12 mm de diâmetro, em duplicata, com fita condutiva face dupla de cobre. As 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. A barra indicativa de aumento (escala) utilizado, que corresponde a 10 μm , está identificada nas eletromicrografias.

4.2.5.3 - Microscopia Óptica (MO)

A Microscopia Óptica (MO) foi realizada no Laboratório de Microscopia da UNESP, campus de São José do Rio Preto. Utilizou-se, conforme Figura 12, a técnica de coloração *Xylidine ponceau* em pH 2,5, um corante acidófilo que evidencia proteínas totais nesse pH (VIDAL, 1970).



Figura 12 - Técnica de coloração *Xylidine ponceau*.

Após a coloração, as lâminas foram secas em estufa (Odontobras ECB 1.2 Digital) por 24 horas a aproximadamente 37 °C (Figura 13). Pingou-se 4 gotas de Bálsamo de Canadá sobre a lâmina e adicionou-se a lamínula. Por 24 horas as lâminas secaram a 25 °C para, então, serem analisadas em microscópio (Olympus BX60) com captador de imagens (Olympus DP-71, U-CMAD-2, U-TV1X) com potência 10 (Figura 14).



Figura 13 - Secagem das lâminas em estufa.



Figura 14 - Microscópio utilizado para análise de microscopia óptica.

4.2.5.4 - Análise de Difração de Raios-X em Ângulo Alto (WAXS)

A análise de WAXS foi realizada segundo Vanin (2003), no Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano - URRJ, Rio de Janeiro. Utilizou-se o equipamento Bruker General Area Detector Diffraction System (GADDS, Bruker

AXS, Inc., Madison, WI). O sistema foi equipado com um difratômetro (Siemens HiStar 2D), a uma distância de 8,5 cm e operado a 60 mA, 40 kV por 30 minutos.

4.2.6 - Caracterização Funcional dos Biofilmes

4.2.6.1 - Opacidade / Transparência

Foi determinada, em triplicata, em espectrofotômetro (Biospectro, SP-220), como proposto por Cao, Fu, He (2006); Gounga, Xu, Wang (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 opacidade dos filmes foi calculada usando a Equação 8.

$$Opacidade = \frac{A_{600}}{X} \quad (Eq. 8)$$

Sendo:

A_{600} = absorvância a 600 nm

X = espessura dos filmes (mm)

4.2.6.2 - Permeabilidade ao Vapor d'Água (PVA)

A Permeabilidade ao Vapor d'Água (PVA) dos filmes foi determinada gravimetricamente a 25 °C utilizando-se o método padrão ASTM E-96-95 (ASTM, 1995). As amostras de cada filme foram seladas em células de permeação de acrílico, hermeticamente fechadas e contendo dessecante (sílica gel) em seu interior (0 % UR, 0 mmHg de pressão de vapor d'água). Essas células foram acondicionadas em dessecadores a 25 °C com água destilada (100 % UR e 23,76 mmHg de pressão de vapor d'água). As células de permeação de acrílico, com abertura circular e diâmetro de 3,4 cm, possuíam área de exposição dos filmes de

9,08 cm². 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 7 a 8 dias (até a estabilização). A condição de estado estacionário foi considerada quando a mudança no peso da célula tornou-se constante com o tempo. As determinações foram realizadas em triplicata conforme o esquema da Figura 15.

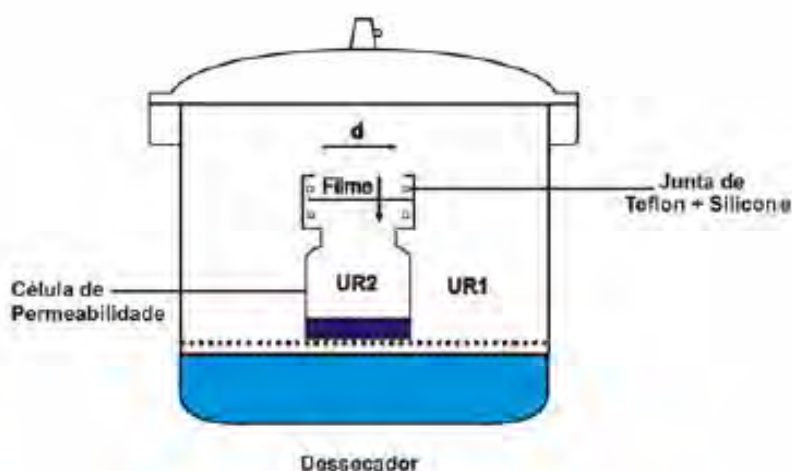


Figura 15 - Esquema do dispositivo para determinação da permeabilidade ao vapor d'água.

A PVA foi calculada empregando-se a Equação 9.

$$PVA = \frac{m \cdot e}{t \cdot A \cdot \Delta p} \quad (\text{Eq. 9})$$

Sendo:

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 (h)

A = área exposta do filme (m^2)

Δp = diferença de pressão parcial de vapor de água a 100 % UR e 0 % UR, ambos a 25 °C, correspondendo a 2646 KPa

4.2.6.3 - Isotermas de Sorção

Testes de capacidade de sorção de água nos quatro tipos de filme foram realizados por meio de isotermas pelo método estático gravimétrico (LOPES FILHO et al., 2002). Amostras de cada biofilme de $1,0 \text{ cm}^2$ e $0,25 \pm 0,02 \text{ mm}$ de espessura foram acondicionadas, em triplicata, em dessecadores com nove soluções salinas (Tabela 3) que estabeleceram umidades relativas de 11 a 98 % nas temperaturas de 5, 15, 25, 35 e 45 °C. Num período entre 60 e 90 dias as amostras atingiram peso constante (não excedendo 0,1 %, ou seja, 0,001 g / g sólidos). O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico em estufa a 105 °C por 24 horas.

Tabela 3 - Atividade de água das soluções salinas.

Sal	Atividade de água (a_w)				
	5 °C	15 °C	25 °C	35 °C	45 °C
LiCl	11,26	11,30	11,30	11,25	11,16
MgCl ₂	33,60	33,30	32,78	32,05	31,10
K ₂ CO ₃	43,13	43,15	43,16	43,50	42,90
NaBr	63,51	60,68	57,57	54,55	51,95
NaNO ₂	68,40	66,50	64,50	62,50	60,70
NaCl	75,65	75,61	75,29	74,87	74,52
KCl	87,67	85,92	84,34	82,95	81,74
BaCl ₂	91,58	90,80	90,40	89,70	88,90
CuSO ₄	98,31	97,20	97,20	96,60	95,50

Fonte: Greenspan (1977), Wolf (2007), Young (1967).

Os dados dos testes de adsorção foram ajustados aos modelos matemáticos de Brunauer, Emmett e Teller (BET) (VAN DEN BERG, 1984); Guggenheim, Anderson e Boer (GAB) (TELIS et al., 2000); Halsey (HALSEY, 1985); Oswin (OSWIN, 1946); Henderson (HENDERSON, 1952) e Peleg (PELEG, 1993). Os dados de umidade foram ajustados aos modelos de análise de regressão não-linear utilizando o software Origin versão 5.0. Os parâmetros de desvio percentual (χ^2) e o coeficiente de determinação (R^2) foram considerados para escolha do melhor ajuste.

4.2.6.4 - Solubilidade em Água

A solubilidade em água dos filmes foi realizada conforme Gontard et al. (1994). Inicialmente, três discos de cada amostra de filme com 2,0 cm 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) em shaker (Marconi, MA-410) por 24 horas a temperatura de 25 °C. Passado este período, os filmes foram retirados da água e secos em estufa a 105 °C por 24 horas para determinação da massa seca final. A solubilidade foi calculada como a relação entre a matéria seca final e a matéria seca inicial.

4.2.6.5 – Molhabilidade

As análises de ângulo de contato dos filmes foram realizadas na Embrapa - CNPDIA / São Carlos, de acordo com Wang, Fu, Wang (2009). A molhabilidade foi estimada pela medida do ângulo de contato formado por uma gota de água deionizada (cerca de 2 µL), com um auxílio de uma micro seringa conforme ilustra a Figura 16, e a superfície do filme. Para isto, os biofilmes foram fixados em lâminas e uma gota foi depositada sob o material em temperatura ambiente (25 °C). Imagens da gota de água sobre a superfície do filme foram gravadas com uma câmera eletrônica e o ângulo calculado com o auxílio do Software FTA32 Image Software (First Tem Angstroms). Foram realizadas seis medidas em locais diferentes para cada amostra e os tempos de medida foram 0, 30, 60, 120 e 300 segundos.



Figura 16 - Equipamentos utilizados para a análise do ângulo de contato.

4.2.6.6 - Propriedades Térmicas

4.2.6.6.1 - Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Esta análise foi realizada na Embrapa - CNPDIA em São Carlos, SP. As medidas foram feitas em um calorímetro diferencial de varredura (TA Instruments - TA Q100). Aproximadamente 6 mg de amostra foram submetidas a um pré-aquecimento de 25 °C a 120 °C para eliminação da história térmica. A amostra foi novamente aquecida até 120 °C ou 200 °C com taxa de aquecimento de 10 °C / min e fluxo de nitrogênio de 50 mL / min. A temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura de fusão (T_m) foram obtidas a partir do mínimo da primeira derivada e mínimo do pico da curva DSC, respectivamente.

4.2.6.6.2 - Análise Termogravimétrica (TGA)

Realizadas na Embrapa - CNPDIA em São Carlos, SP, a estabilidade térmica dos materiais foi investigada por meio de um analisador termogravimétrico (TGA) TA Instruments, Modelo Q500. Em todos os ensaios foi utilizada a massa de aproximadamente 7,0 mg, sob fluxo de nitrogênio de 50 mL / minuto e a taxa de aquecimento de 10 °C / minuto, sendo a faixa da temperatura varrida de 25 a 900 °C.

4.2.6.7 - Propriedades Mecânicas

As análises de resistência à tração (σ_r), porcentagem de alongação na ruptura (ϵ_r) e módulo de Young (E) foram realizadas no CCDM - UFSCAR, São Carlos, com o equipamento Universal-Instron (Modelo 5569, Instron Engineering Corp, Canton, MA), seguindo os métodos padrões de teste da ASTM D882-91 (ASTM, 2002). Este método é aplicado na determinação das propriedades mecânicas em tração de filmes poliméricos finos, ou seja, com menos de 1,0 mm de espessura.

O teste obtendo as propriedades mecânicas em tração do biofilme de zeína-ácido oléico pode ser observado na Figura 17.



Figura 17 - Análise das propriedades mecânicas de tração do biofilme zeína-ácido oléico.

Para os ensaios, cinco corpos de prova com médias de 20 mm de largura e 0,15 mm de espessura foram fixados, um de cada vez, no equipamento, com separação inicial das garras de 125 mm. Os testes foram realizados em temperatura ambiente (25 °C) com célula de carga de 500 N e velocidade de ensaio de 12,5 mm / minuto.

4.2.6.8 - Permeabilidade ao Oxigênio (PO₂)

Realizada no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) / Campinas, a Permeabilidade ao Oxigênio (PO₂) foi determinada pelo método coulométrico, segundo procedimento descrito na norma ASTM F 1927-07 (ASTM, 2010). Utilizou-se o equipamento OXTRAN, modelo 2/20, da MOCON, operando com oxigênio puro como gás permeante à temperatura de 23 °C e “a úmido” (ambiente saturado com água fornecendo de 75 a 80 % de umidade relativa). O condicionamento dos corpos-de-prova foi feito durante 3 a 5 dias, a 25 °C e 75 % de UR. Foi utilizada uma célula de permeação, na qual o filme teste dividia o compartimento interno em duas câmaras, uma por onde passava o gás teste (oxigênio) e na outra o gás de arraste (mistura nitrogênio/hidrogênio). A área efetiva de permeação de cada corpo-de-prova foi de 100 cm². Os resultados obtidos foram corrigidos para 1 atm de gradiente de pressão parcial de oxigênio.

Uma vez obtida a Taxa de Permeabilidade ao Oxigênio (TPO₂), calculou-se o coeficiente de permeabilidade ao oxigênio (P), conforme a Equação 10.

$$P = \frac{TPO_2 \cdot e}{p} \quad (\text{Eq. 10})$$

Sendo:

P = coeficiente de permeabilidade ao oxigênio (cm³(CNTP). μm/(m². dia.atm));

TPO_2 = taxa de permeabilidade ao oxigênio (cm³(CNTP)/(m². dia));

e = espessura média do corpo-de-prova (μm);

p = pressão parcial de oxigênio na câmara de permeação (1 atm), visto que a pressão parcial de O₂ na câmara do gás de arraste é considerada nula.

4.3 - Análise Estatística

A análise de variância (ANOVA) dos resultados experimentais foi realizada a partir de um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com a utilização do teste de Tukey para comparação de médias, considerando um nível de significância de 5 % de probabilidade ($p < 0,05$). O programa computacional ESTAT - Sistema para Análises Estatísticas, versão 2.0 foi usado segundo Banzatto, Kronka (2006).

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Processos de Formação e Secagem dos Filmes

Todos os filmes selecionados para a posterior caracterização de sua estrutura básica e de suas propriedades funcionais apresentaram aspecto visual homogêneo, livre de partículas insolúveis, espessura uniforme e boa maleabilidade, que os tornavam fáceis ao manuseio. Os filmes com características diferentes destas foram excluídos. A Figura 18 mostra a aparência das amostras de filmes com essas características.



Figura 18 - Aspecto visual homogêneo de um biofilme de zeína-óleo de macadâmia.

Observa-se na Figura 18 uma coloração amarelada presente em todos os materiais, sendo o filme elaborado com ácido oléico puro o que se apresentou menos amarelo. Esta cor é atribuída não só à concentração de carotenóides do milho que ficou agregada a zeína, como também à sua elevada presença nos óleos de macadâmia e buriti. Os carotenóides são amplamente encontrados em vegetais e gorduras animais e possuem cor intensa, variando do amarelo ao vermelho (ALBUQUERQUE et al., 2005).

Todos os filmes foram elaborados de forma a apresentarem homogeneidade na espessura, entre $0,19 \pm 0,02$ a $0,27 \pm 0,02$ mm. A uniformidade da espessura dos filmes é importante, pois funciona como base para cálculo de várias propriedades funcionais (XIE et al., 2002).

5.2 - Caracterização da Zeína em Pó

5.2.1 - Espectroscopia no Infravermelho

O resultado obtido para a zeína, na forma de pó, com o FTIR é mostrado na Figura 19.

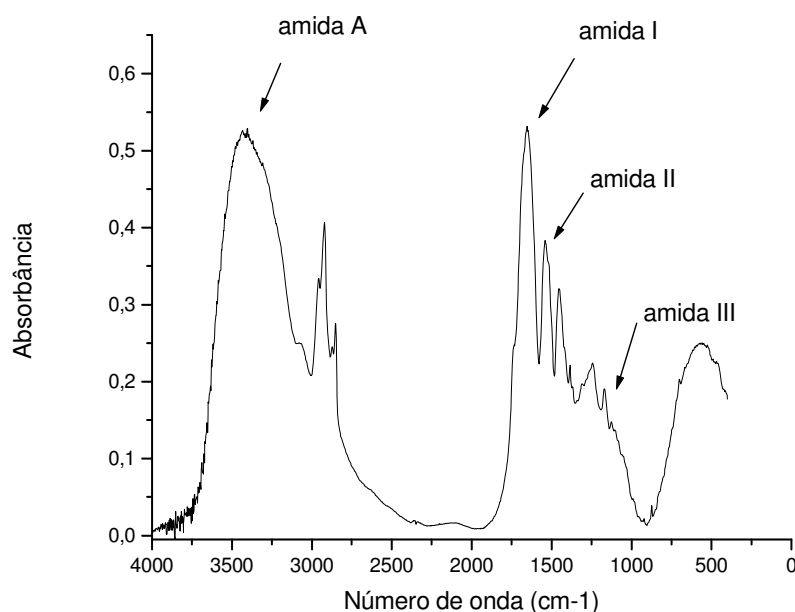


Figura 19 - Espectro de FTIR obtido para zeína na forma de pó.

Verifica-se na figura, a presença de hidroxila associada (O-H), isto é, que efetua ligação de hidrogênio, aparecendo como uma banda numa região por volta de 3.500 cm^{-1} . Compostos alifáticos (C-H), que geram bandas com picos múltiplos, aparecem na região de 2900 cm^{-1} . Estes resultados estão em conformidade com os obtidos por Forato et al. (2000); Forato, Bicudo, Colnago (2003); Corradini (2004). Neste espectro estão indicadas as bandas mais utilizadas para o estudo de proteínas (amida I, II, III e A). Porém, verificou-se a possível presença de lipídeos em razão dos picos de carbonilas (C=O) de ésteres obtidos na região em torno de $1800 - 1700\text{ cm}^{-1}$ (SCHIMITT; FLEMMING, 1998). Isto indica que a proteína tem contaminação residual de lipídeos.

5.3- Caracterização dos Plasticizantes

Os óleos plasticizantes apresentaram teores diferentes de ácidos graxos. A composição dos principais ácidos graxos dos óleos comestíveis e do ácido oléico utilizados é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição em ácidos graxos dos óleos plasticizantes utilizados na formulação dos biofilmes.

Plasticizante	Oléico (%)	Linoléico (%)	Palmítico (%)	Palmitoléico (%)
Ácido oléico	73,2	4,0	4,1	3,7
Óleo de buriti	35,1	53,6	5,5	0,1
Óleo de macadâmia	61,0	1,7	7,9	16,8
Azeite de oliva	64,7	17,1	11,3	0,7

Verifica-se que a composição em ácidos graxos dos óleos comestíveis e ácido oléico utilizados, está em conformidade com dados da literatura (ERENO, 2005; MANHÃES, 2007; VITALATMAN, 2010) quanto à concentração de ácido oléico superior a 60 %. Com exceção do óleo de buriti, que além de apresentar menos de 60 % de ácido oléico em sua composição, apresentou uma concentração de linoléico (53,6 %) superior a do oléico (35,1 %). Segundo Ha, Padua (2001) tanto o oléico quanto o linoléico produzem materiais com boas características de flexibilidade e propriedades funcionais.

5.4 - Caracterização Estrutural dos Biofilmes

5.4.1 - Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier acoplada à Técnica de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

Os resultados obtidos com o FTIR-ATR para os biofilmes de zeína estão apresentados na Figura 20. As bandas mais intensas do espectro mostrado são devidas principalmente aos grupos peptídicos da proteína que é caracterizada neste espectro como bandas dos grupos amida I (1650 cm^{-1}), amida II (1540 cm^{-1}) e amida

A (3290 cm^{-1}) segundo Osiro (2004), Barth (2007), Silva (2009). As diferenças de intensidade verificadas no gráfico não indicam maiores ou menores absorções do infravermelho. Essas diferenças de absorbância são usuais neste tipo de análise e não implicam em alterações nos grupos constituintes da proteína. Desta forma, verificam-se, para todos os materiais analisados, porções indicando a presença dos mesmos constituintes.

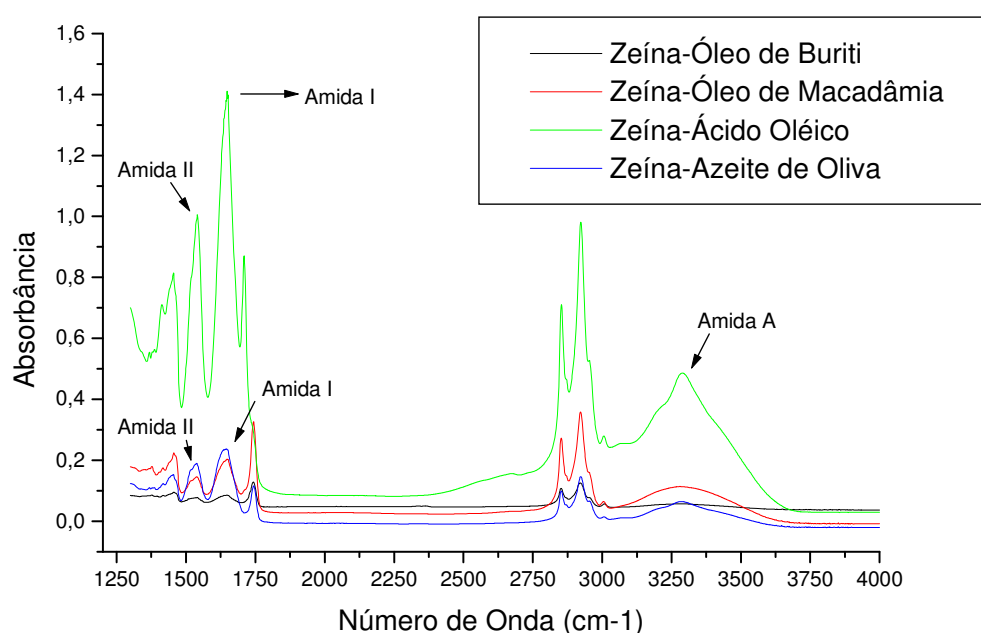


Figura 20 - Espectro de FTIR-ATR obtido para os biofilmes de zeína.

Ainda, segundo Forato, Bernardes-Filho, Colnago (1998), Marcotte et al. (2007), as bandas de amida I e II observadas na região entre 1500 e 1800 cm^{-1} , indicam a predominância de estruturas secundárias α e β que são predominantes na zeína.

Nota-se, também, a presença de carboxilas em número de onda de aproximadamente 1745 cm^{-1} presente em ácidos graxos livres como também já observados em outros trabalhos com zeína (FORATO; YUSHMANOV; COLNAGO, 2004). A presença de bandas entre 2800 e 3000 cm^{-1} indica vibrações e estiramentos CH de grupos funcionais CH_3 e CH_2 , geralmente ácidos graxos de

membranas e da cadeia lateral de alguns aminoácidos (GEORGET; BARKER; BELTON, 2008) e a presença de compostos alifáticos (CH) que geram bandas com picos múltiplos na região entre 2900 e 3000 cm^{-1} (FORATO et al., 2000; FORATO; BICUDO; COLNAGO, 2003; CORRADINI, 2004). Segundo TAVARES (2010) estas bandas em torno de 1750, 2850 e 2950 cm^{-1} confirmam a presença do ácido oléico.

5.4.2 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Observa-se nas eletromicrografias (Figura 21) que os filmes com o óleo de macadâmia e o óleo de buriti, apresentaram estruturas muito semelhantes, com presença homogênea de componentes arredondados, similares a poros, na superfície. Segundo Villalobos et al. (2005), a fração de volume de lipídios no filme seco e o tamanho dos agregados lipídicos são os principais fatores envolvidos no grau de heterogeneidade óptica na matriz do filme.

A presença de lipídios foi verificada por meio da presença de estruturas arredondadas, demonstrando que não houve a formação de uma camada contínua da matriz filmogênica. Esta observação foi também relatada para biofilmes de zeína (DONG; SUN; WANG, 2004; BATISTA; TANADA-PALMU; GROSSO, 2005; GHANBARZADEH et al., 2007; CORRADINI, 2007), pectina (BATISTA; TANADA-PALMU; GROSSO, 2005), glúten de trigo (TANADA-PALMU, 2003), gelatina (BATISTA, 2004; DAVANÇO, 2006) e metilcelulose (VILLALOBOS et al., 2005).

Os filmes formados com ácido oléico (Figura 21c) e azeite de oliva (Figura 21d) apresentaram menores quantidades das formas arredondadas e uma nítida diminuição do tamanho dos glóbulos de gordura demonstrando, portanto, a formação de uma matriz mais homogênea.

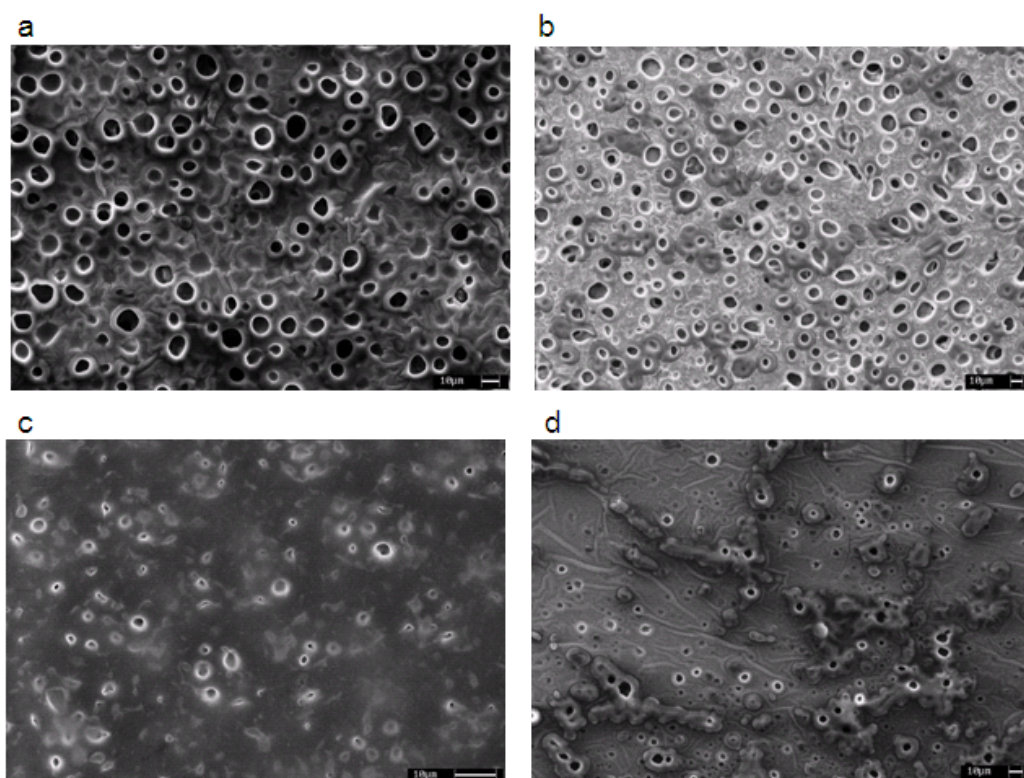


Figura 21 – Eletromicrografias dos biofilmes, obtidas por MEV, sendo a) zeina-óleo de buriti; b) zeina-óleo de macadâmia; c) zeina-ácido oléico e d) zeina-azeite de oliva. A barra indicativa de aumento corresponde a 10 µm.

5.4.3 - Microscopia Óptica (MO)

Para complementar a análise de MEV sobre a homogeneidade da matriz dos biofilmes com relação às formas arredondadas similares a poros e / ou glóbulos observados, realizou-se a MO usando a técnica de coloração *Xylidine ponceau* em pH 2,5. Neste meio, as proteínas são coradas de vermelho e os glóbulos de gordura apresentam-se em tom branco.

As imagens captadas para cada uma das amostras são mostradas nas Figuras 22 e 23 em que os aumentos e correspondentes escalas das fotos foram de 4× (1 mm) e 10× (500 µm).

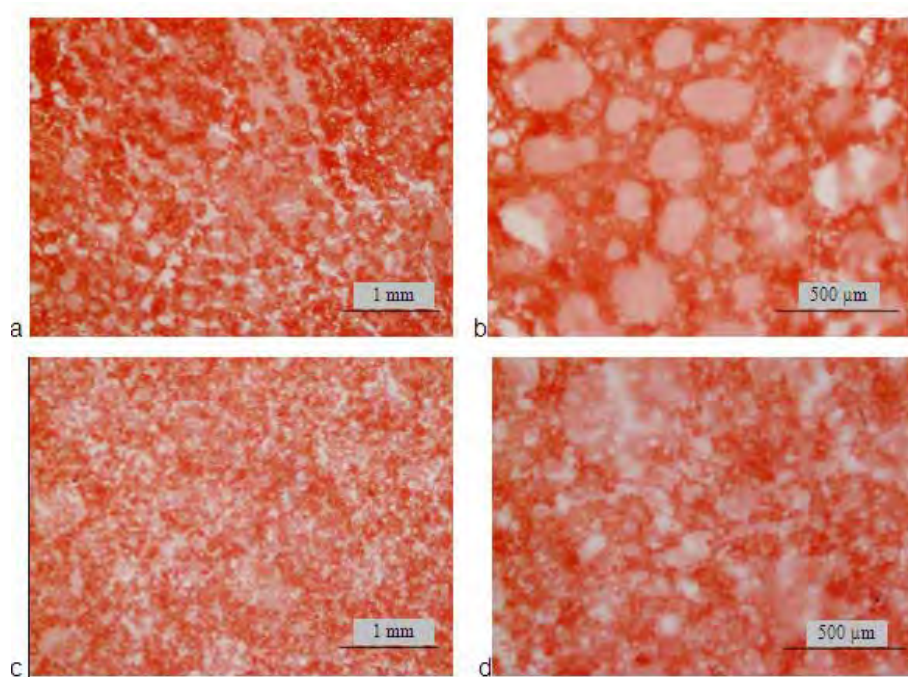


Figura 22 – Micrografias dos biofilmes, obtidas por MO, sendo a-b: zeína-óleo de buriti e c-d: zeína- óleo de macadâmia. A barra indicativa corresponde ao aumento de 4× (10 μm) e e 10× (500 μm).

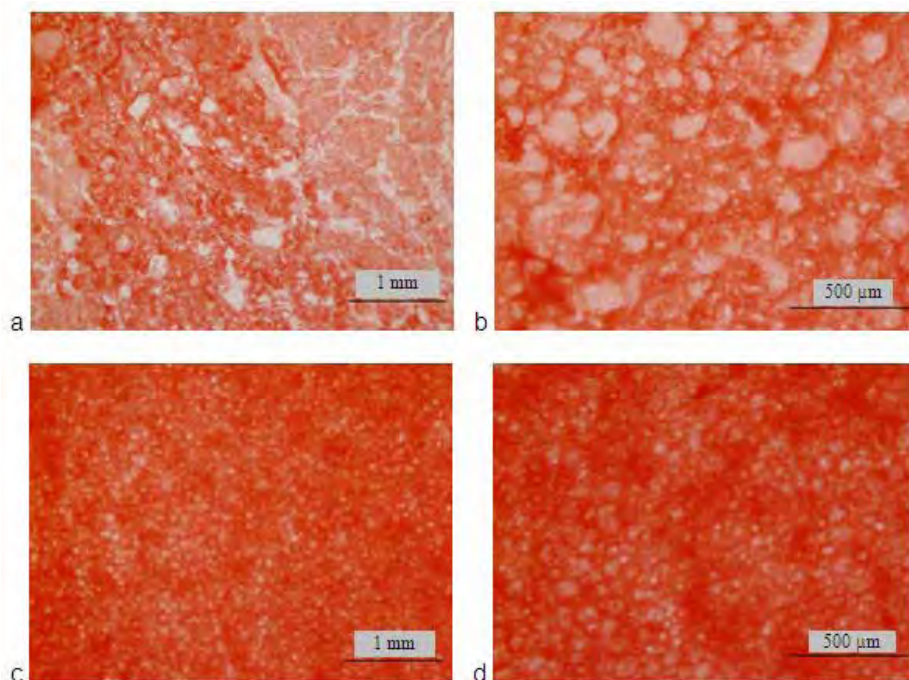


Figura 23 - Micrografias dos biofilmes, obtidas por MO, sendo a-b: zeína-azeite de oliva; c-d: zeína-ácido oléico. A barra indicativa corresponde ao aumento de 4× (10 μm) e e 10× (500 μm).

As micrografias mostram que o biofilme controle (zeína-ácido oléico) foi o que se apresentou mais homogêneo (Figura 23c-d), complementando a observação verificada na MEV. O biofilme zeína-óleo de macadâmia (Figura 22c-d) mostrou ser mais homogêneo que os adicionados de óleo de buriti (Figura 22a-b) e azeite de oliva (Figura 23a-b). Nestes dois últimos há uma heterogeneidade na dispersão dos glóbulos de gordura que também são maiores, sugerindo que quanto maior o teor de ácido oléico no óleo mais homogêneo será o material. Além disto, observa-se grande quantidade de estrias que são as proteínas fibrilares alinhadas demonstrando que a incorporação do plasticizante pela matriz não foi totalmente efetuada (LAI; PADUA, 1997; GHANBARZADEH et al., 2007). Essa maior ou menor homogeneidade pode estar relacionada com o teor de ácido oléico presente nos óleos, pois a maior homogeneidade ocorreu no material adicionado de ácido oléico puro e a menor, no material que conteve óleo de buriti. De acordo com a Tabela 4 (página 48), o óleo de menor teor de ácido oléico foi o de buriti. O material formado com óleo de buriti apresentou as piores características estruturais e funcionais e o oposto ocorreu no filme controle.

5.4.4 - Difração de Raios-X: Análise de WAXS

Difratogramas de Difração de raios-X em altos ângulos (WAXS) são mostrados na Figura 24.

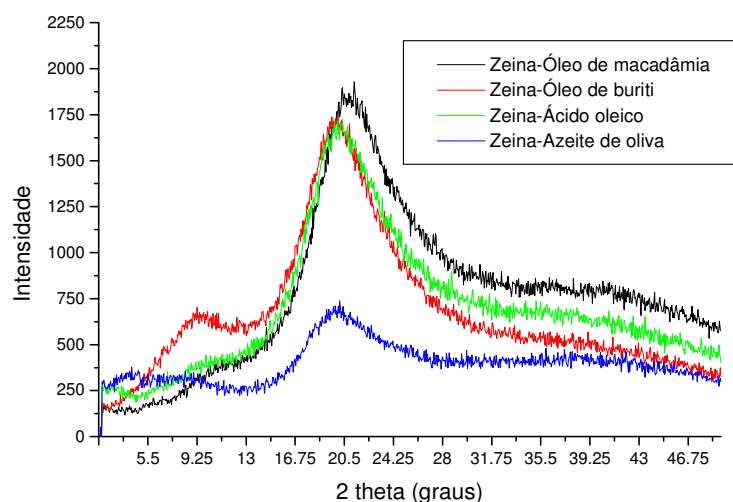


Figura 24 - Difratogramas de WAXS para os biofilmes de zeína.

De acordo com Fakhouri (2009) a presença de picos acentuados, em difratogramas de WAXS, indica regiões cristalinas. Tais regiões cristalinas são claramente observadas nos picos definidos na região de 2θ entre 18,5 e 21 °. Os filmes com azeite de oliva mostraram picos mais amorfos e os adicionados de óleo de buriti apresentaram mais um pico em torno de 9 ° na região de 2θ . As observações indicam que não houve influência marcante dos tipos de óleos usados como plasticizantes na cristalinidade dos materiais, sugerindo que não há mudança na conformação da matriz protéica.

Na integração dos padrões de difração determinou-se, através da relação de Bragg, o espaço d (“ d spacing”) de 4,5 Å que também foi observado em trabalhos anteriores por Lai, Geil, Padua (1999); Wang et al. (2005). Os picos observados na região de 2θ entre 9 e 10 ° estão próximos encontrados na literatura (WANG et al., 2005; LAI; GEIL; PADUA, 1999). Estes valores podem ser atribuídos ao espaço médio entre uma espiral e outra da α -hélice da matriz protéica de zeína, conforme modelo proposto por Matsushima et al. (1997), ou, eventualmente, espaços entre as cadeias do ácido oléico (WANG et al., 2005). Assim, pode-se concluir que tanto os plasticizantes usados por esses autores como os diferentes óleos usados no presente trabalho não modificaram a estrutura da α -hélice da proteína.

Quanto às pequenas diferenças de intensidade observadas nos filmes, Wang et al. (2005) afirmam que uma menor intensidade pode ser devido a agregados moleculares de zeína demonstrando que o filme com azeite de oliva continha mais agregados que os demais. Esta observação está coerente com os resultados das análises de MEV e MO, em que o filme zeína-ácido oléico, de alta intensidade no espectrograma, apresentou maior homogeneidade.

5.5- Caracterização Funcional dos Biofilmes

5.5.1 - Opacidade / Transparência

Na Tabela 5 encontram-se os valores da opacidade para os filmes produzidos com ácido oléico, óleo de buriti, óleo de macadâmia e azeite de oliva. Os resultados foram comparados com um filme comercial de polietileno.

Tabela 5 - Opacidade dos biofilmes de zeína e do polietileno comercial.

Material	Espessura (mm)	Absorbância a 600 nm	Opacidade (Abs.nm⁻¹)
Zeína + Ácido Oléico	0,19 ± 0,02	1,40 ± 0,06	6,40 ± 0,09 ^a
Zeína + Óleo de Buriti	0,24 ± 0,02	1,23 ± 0,14	5,31 ± 0,79 ^b
Zeína + Óleo de Macadâmia	0,25 ± 0,01	1,50 ± 0,04	5,83 ± 0,34 ^{ab}
Zeína + Azeite de Oliva	0,27 ± 0,02	1,67 ± 0,08	6,20 ± 0,60 ^a
Polietileno	0,05 ± 0,001	0,05 ± 0,01	2,66 ± 0,09 ^c

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

Conforme esperado a opacidade dos biofilmes foi maior quando comparados ao filme de polietileno. Esse resultado é principalmente devido à coloração amarela da zeína que segundo Sessa et al. (2003) contém pigmentos carotenóides (β-caroteno, zeaxantina e luteína), naturais do milho.

Analisando a Tabela 5, verifica-se que somente o filme zeína-óleo de buriti apresentou maiores diferenças quando comparado aos demais. O filme controle teve maior opacidade e não diferiu dos filmes elaborados com óleo de macadâmia e azeite de oliva. Isto sugere que quanto menor a concentração do ácido oléico maior será a transparência do biofilme.

Efeito semelhante foi encontrado por diversos autores: Batista (2004), que observou a opacidade dos filmes combinados de pectina e gelatina verificou que os filmes apresentaram-se mais opacos com a adição dos ácidos graxos; Rhim et al. (2002), verificaram filmes de isolado protéico de soja com maior opacidade ao incorporar ácidos graxos (láurico, palmítico e esteárico) na formulação, com maior efeito provocado pela adição do ácido palmítico; Davanço (2006) concluiu que os filmes combinados de pectina / gelatina sem a adição de lipídios foram os mais transparentes. Outros estudos também chegaram à conclusão do aumento de opacidade relacionado à adição de lipídeos em biofilmes de gelatina, isolado protéico de soja e isolado protéico de soro de leite (YANG; PAULSON, 2000; RHIM et al., 1999; KIM; USTUNOL, 2001).

As diferentes espessuras dos filmes de zeína, que variaram de $0,19 \pm 0,02$ a $0,27 \pm 0,02$ mm não influenciaram nos resultados da opacidade, pois, conforme Villalobos et al. (2005), a espessura não tem efeito na opacidade aparente dos filmes e sim o rearranjo molecular que pode ocorrer durante a secagem que, por consequência, afeta as propriedades ópticas.

5.5.2 - Permeabilidade ao Vapor d'Água (PVA)

Na Tabela 6 encontram-se os valores de PVA para os filmes de zeína produzidos com ácido oléico, óleo de buriti, óleo de macadâmia e azeite de oliva.

Tabela 6 - Espessura, PVA e permeância dos biofilmes a 25 °C.

Biofilmes	Espessura (mm)	PVA (gmm/m ² .h.KPa)	Permeância (g/h.m ² .KPa)
Zeína + Ácido Oléico	$0,12 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,07^b$	$4,21 \pm 0,58^{ab}$
Zeína + Óleo de Buriti	$0,17 \pm 0,02$	$0,82 \pm 0,09^a$	$4,84 \pm 0,56^{ab}$
Zeína + Óleo de Macadâmia	$0,15 \pm 0,05$	$0,76 \pm 0,05^a$	$5,07 \pm 0,32^a$
Zeína + Azeite de Oliva	$0,12 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,02^b$	$3,78 \pm 0,13^b$

^{a,b} – Médias seguidas de mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (biofilmes condicionados a 25 °C e 58 % de UR durante 3 dias).

Para Li et al. (2008) a PVA depende do número de grupos (-OH) disponíveis que o polímero possui. Desta forma, a menor PVA dos biofilmes adicionados de ácido oléico e azeite de oliva é devida à formação de uma matriz mais estruturada com grupos -OH menos disponíveis e assim com uma menor difusão de vapor d'água. Esta matriz mais estruturada também pôde ser visualizada na análise de microscopia eletrônica de varredura (Figura 24). Segundo Debeaufort et al. (2000), a diminuição da granulometria dos lipídeos está relacionada diretamente à redução da PVA em filmes adicionados de plasticizantes. Além do mais, a presença de grande número de partículas esféricas, uniformemente dispersas na matriz dos biofilmes, aumenta a distância percorrida pelas moléculas de água difundida através do filme diminuindo a permeabilidade (PÉROVAL et al., 2002; PEREZ-GAGO; KROCHTA,

2001). Parris et al. (1997) analisando a PVA em filmes de zeína adicionados de glicerina encontraram o valor de $1,21 \pm 0,15 \text{ g.mm/h.m}^2.\text{kPa}$, valor este maior do que os apresentados na Tabela 6, o que pode indicar uma menor homogeneidade do material estudado por eles.

Os maiores valores de PVA ocorreram para os filmes com óleo de buriti e óleo de macadâmia e não foram significativamente diferentes. Em princípio, esses maiores valores seriam justificados pelas menores espessuras desses filmes, porém, analisando os valores de permeância (permeabilidade dividida pela espessura do filme) verifica-se que a espessura não influenciou significativamente, sendo a permeância semelhante para todos os filmes. Assim, reforça-se a idéia de que a presença do ácido oléico influencia mais do que a espessura do filme nos valores de PVA. Os resultados de permeância obtidos no presente trabalho estão próximos ao encontrado por Wolf (2007) para filmes elaborados com a proteína colágeno ($4,15 \text{ g.mm/m}^2.\text{h.kPa}$).

Apesar da zeína e dos ácidos graxos serem hidrofóbicos, a maior PVA nos biofilmes com óleo de buriti e óleo de macadâmia pode ser explicada pela desuniformidade das partículas na matriz, o que foi confirmado nas análises de microscopia de varredura (MEV) e óptica (MO). Segundo Gontard et al. (1994); Batista (2004); Villalobos et al. (2005); Sztuka, Kołodziejska (2009), a heterogeneidade na dispersão dos componentes na matriz favoreceu a migração da umidade por canais preferências, fazendo estes biofilmes mais permeáveis ao vapor d'água. Os dados deste trabalho estão de acordo com Wang, Padua (2004) que afirmam que a escolha do plasticizante é o fator determinante na maior ou menor adsorção de água em filmes de zeína.

5.5.3 - Isotermas de Sorção

Os dados de umidade de equilíbrio higroscópico se ajustaram de forma satisfatória a todos os modelos de isotermas testados ($0,85 \leq R^2 \leq 0,99$), porém o modelo de Peleg apresentou os melhores resultados com coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,97. A Figura 25 apresenta as curvas de ajuste dos dados, com média de três repetições, ao modelo de Peleg nas temperaturas de 5 a

45 °C para todos os biofilmes e a Tabela 7 mostra os parâmetros estimados do modelo de Peleg com os coeficientes R^2 e χ^2 .

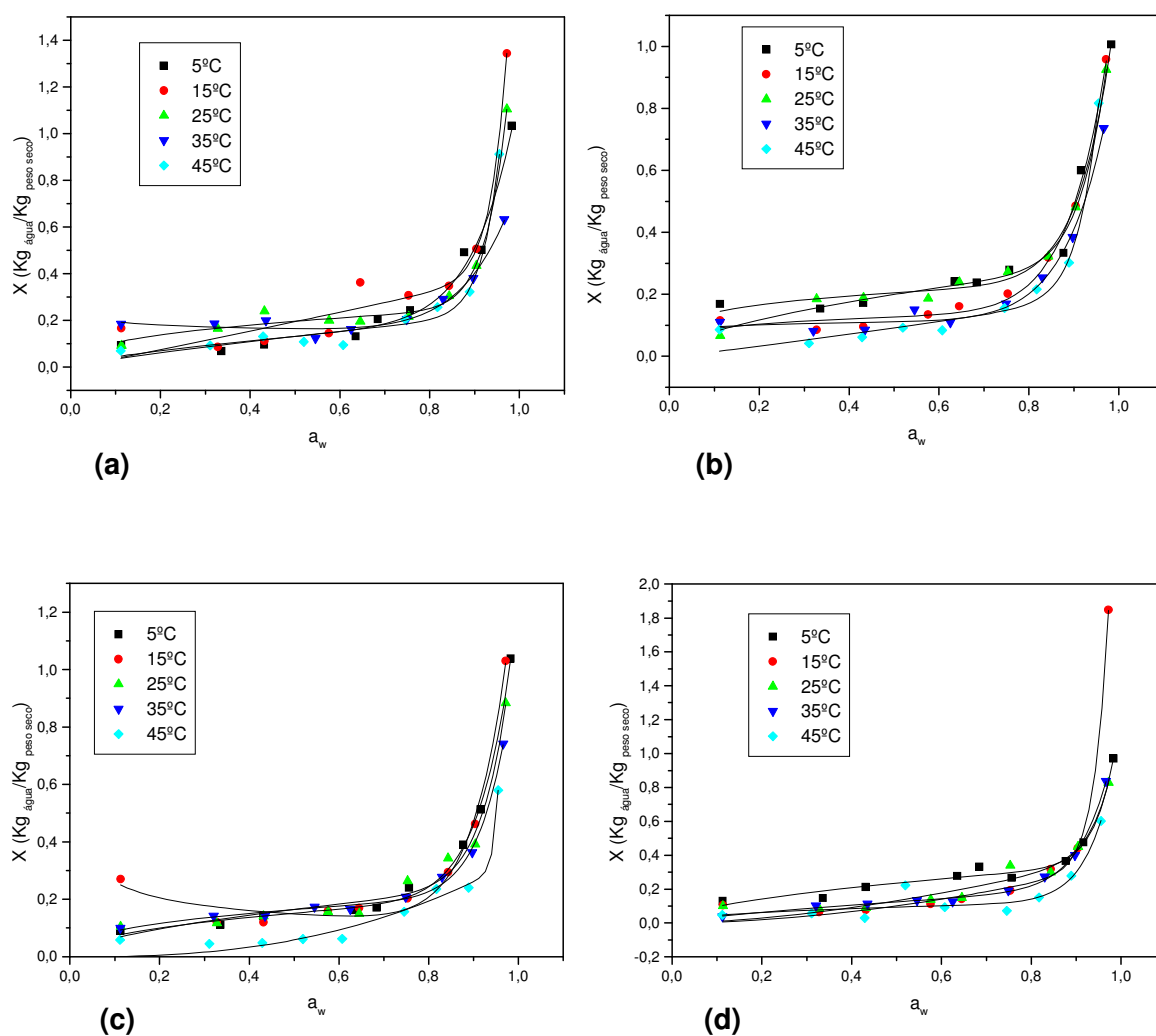


Figura 25 - Isotermas de sorção de biofilmes de zeína, de acordo com o modelo de Peleg, em diferentes temperaturas com os diferentes plasticizantes. a) ácido-oléico; b) óleo de macadâmia; c) óleo de buriti; d) azeite de oliva.

Tabela 7 - Constantes e médias dos desvios percentuais obtidos para o modelo de Peleg no ajuste dos dados de umidade de equilíbrio higroscópico.

Temperatura (°C)		5	15	25	35	45
Parâmetros*		Ácido oléico				
Peleg	K ₁	0.1518	0.4014	0.2561	0.2561	0.1518
	n ₁	-0.1060	1.0466	0.3866	0.3866	-0.1061
	K ₂	0.6531	2.0136	1.5198	1.5198	0.6532
	n ₂	9.1525	26.2893	20.3958	20.3958	9.1526
	Chi ²	0.0016	0.0077	0.0009	0.0007	0.0016
	R ²	0.9856	0.9681	0.9941	0.9817	0.9857
		Óleo de macadâmia				
Peleg	K ₁	0.9654	1.1064	0.8776	0.8776	1.6378
	n ₁	12.9864	11.1053	10.4024	10.4024	20.9133
	K ₂	0.2400	0.1466	0.1185	0.1185	0.1997
	n ₂	0.2294	0.2142	0.0972	0.0972	1.1204
	Chi ²	0.0025	0.0007	0.0007	0.0007	0.0015
	R ²	0.9800	0.9949	0.9904	0.9904	0.9843
		Óleo de buriti				
Peleg	K ₁	1.0361	1.2847	0.9959	0.8844	0.3410
	n ₁	13.0754	12.3600	15.8547	14.9748	2.5370
	K ₂	0.2078	0.1170	0.2461	0.2138	21.9170
	n ₂	0.4525	-0.3492	0.5787	0.3803	94.9814
	Chi ²	0.0004	0.0016	0.0020	0.0003	0.0013
	R ²	0.9975	0.9884	0.9792	0.9959	0.9732
		Azeite de oliva				
Peleg	K ₁	0.3455	0.3515	0.4077	0.2084	0.1277
	n ₁	0.5526	1.7941	1.6344	0.7418	0.4448
	K ₂	0.9067	3.6728	0.7968	1.0326	1.0217
	n ₂	21.4017	31.2481	20.9903	14.2329	16.4655
	Chi ²	0.0013	0.0025	0.0039	0.0002	0.0045
	R ²	0.9880	0.9951	0.9594	0.9975	0.9155

*Os parâmetros estão definidos nos itens 3.6.3 e 4.2.6.3 (páginas 24 e 40, respectivamente).

Geralmente, o teor de umidade de equilíbrio tende a diminuir com o aumento da temperatura a uma atividade de água constante e, nestes materiais, houve esta tendência. As isotermas obtidas apresentaram uma combinação das isotermas do tipo II e do tipo III, de acordo com a classificação de Brunauer (BRUNAUER et al., 1940), tendo maior contribuição do tipo III. Segundo Porpino (2009), esta curva do tipo III está relacionada a interações muito fracas em sistemas contendo macro e mesoporos. De acordo com Labuza (1984) o comportamento das curvas é devido aos efeitos aditivos da Lei de Raoult, capilaridades e interações água-superfícies. Segundo Beck, Tomka, Wasysek (1996); Wei, Baianu (1999); Wang, Padua (2004), plasticizantes hidrofílicos como o glicerol aumentam a sorção de água pela zeína, o que foi observado neste trabalho, onde todos os filmes foram adicionados de glicerol. Wang, Padua (2004) relataram que este comportamento é devido à morfologia da zeína, que é formada por agregados de proteínas com múltiplos poros e capilares que são capazes de absorver as gotas de água. Observa-se, também, uma pequena diferença entre as curvas dos materiais devido às diferentes hidrofobicidades dos plasticizantes.

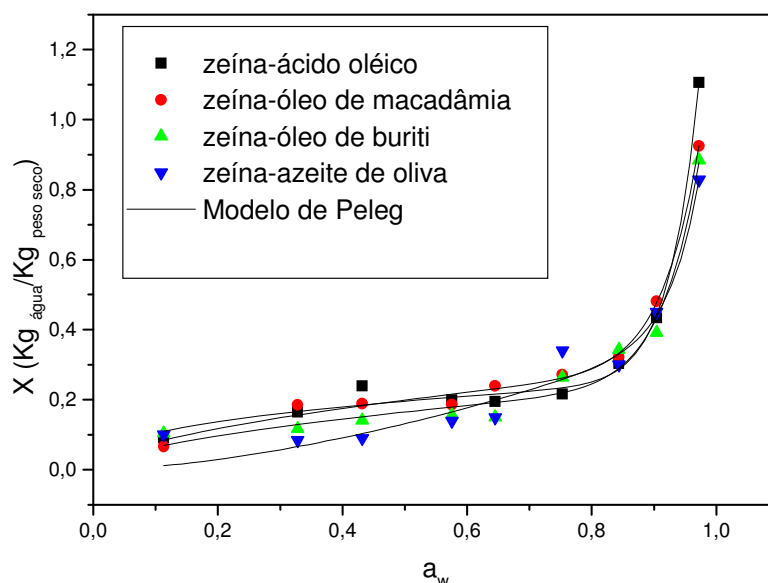


Figura 26 - Isotermas de biofilmes com: zeína-ácido oléico, zeína-óleo de macadâmia, zeína-óleo de buriti e zeína-azeite de oliva a 25 °C.

A Figura 26 apresenta as isotermas para os quatro diferentes tipos de plasticizantes adicionados nos filmes de zeína a 25 °C. Os tipos de plasticizantes não tiveram efeito significativo ao nível de 5 % de probabilidade ($p < 0,05$) nos valores de umidade de equilíbrio. Há uma tendência que, para a_w menores que 0,6, os filmes com azeite de oliva apresentem valores de umidade menores em relação aos outros plasticizantes adicionados. Segundo Wang, Padua (2004), isso pode ser explicado em razão do ácido oléico, presente em maior quantidade nos filmes controle e com azeite de oliva, tornar os materiais mais hidrofóbicos visto que todos os filmes apresentaram o glicerol em sua composição. Esta característica também foi verificada na análise de permeabilidade ao vapor d'água dos filmes, apresentada anteriormente.

5.5.4 - Solubilidade em Água

Na Tabela 8 encontram-se os valores de solubilidade e umidade dos filmes.

Tabela 8 - Espessura, solubilidade em água e umidade dos biofilmes a 25 °C.

Biofilmes	Espessura (mm)	Solubilidade (%)	Umidade (%)
Zeína + Ácido Oléico	$0,14 \pm 0,03$	$5,04 \pm 1,58^c$	$3,54 \pm 0,17^{bc}$
Zeína + Óleo de Macadâmia	$0,13 \pm 0,01$	$14,34 \pm 4,19^b$	$2,96 \pm 0,18^c$
Zeína + Azeite de Oliva	$0,14 \pm 0,01$	$23,19 \pm 2,85^a$	$4,35 \pm 0,56^{ab}$
Zeína + Óleo de Buriti	$0,17 \pm 0,01$	$17,25 \pm 3,78^{ab}$	$5,02 \pm 0,18^a$

^{a,b,c} – Médias seguidas de mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (filmes condicionados a 25 °C e 58 % de UR durante 3 dias).

Somente os filmes com óleo de buriti e macadâmia tiveram diferença significativa entre si quanto à umidade. Quanto à solubilidade, o filme controle diferiu dos demais apresentando a menor solubilidade em água, sendo, portanto, o biofilme menos hidrofílico. Esta observação está de acordo com os resultados apresentados nas análises de permeabilidade ao vapor d'água, isotermas de sorção e ângulo de contato.

Todos os biofilmes estudados apresentaram-se íntegros quando, após 24 horas, foram retirados da imersão em água, indicando que a rede protéica se manteve intacta.

5.5.5 – Molhabilidade

Os ângulos de contato obtidos para os materiais são mostrados nas Figuras 27, 28 e 29. A hidrofilicidade dos filmes foi ilustrada pela cinética de absorção da gotícula d'água dada pelo ângulo de contato formado entre a gota e a superfície dos filmes (°/segundo). Nesta análise, os filmes apresentaram espessuras semelhantes entre $0,12 \pm 0,01$ e $0,13 \pm 0,03$ mm.

Todas as amostras apresentaram rápida absorção da gota d'água, principalmente nos biofilmes com óleo de macadâmia e buriti, provavelmente devido à natureza hidrofílica dos plasticizantes. Não foi possível realizar a análise para os biofilmes elaborados com estes óleos, pois a gota se espalhou muito rapidamente logo no início do teste impedindo a medida do ângulo ao longo do tempo (Figura 28).

As observações desta análise também estão em conformidade com os resultados da permeabilidade ao vapor d'água (Ítem 5.4.2.), em que os biofilmes com óleo de buriti e de macadâmia não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) e foram os mais hidrofílicos.

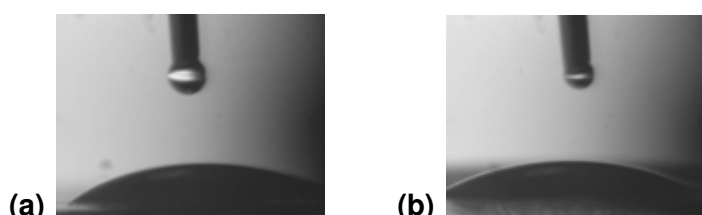


Figura 27 - Ilustração da gota d'água sobre os biofilmes para medidas de ângulo de contato no tempo zero. a) biofilme zeína-óleo de buriti e b) biofilme zeína-óleo de macadâmia.

Para os materiais adicionados de ácido oléico e azeite de oliva (Figuras 28 e 29), as análises indicaram que são mais hidrofóbicos que os outros.

O valor inicial de ângulo de contato para o biofilme zeína-ácido oléico foi de $66,32 \pm 4,7^\circ$, similar aos valores encontrados por Scramim et al. (2007). Contudo,

conforme análise da Figura 28 foi possível observar um comportamento de redução do ângulo em função do tempo.



Figura 28 - Ilustração da gota d'água sobre o biofilme com ácido oléico para medidas de ângulo de contato nos tempos 0, 30, 60, 120 e 300 segundos.

Wang, Fu, Wang (2009) estudando filmes de zeína encontraram um ângulo de contato maior que 50 °C e atribuiu isso ao fato da zeína ser uma proteína hidrofóbica em função da elevada quantidade de aminoácidos hidrofóbicos em sua composição.

O valor inicial do ângulo de contato para o biofilme zeína-azeite de oliva foi de $33,97 \pm 2,1$ °, sendo este material mais hidrofílico que o filme controle. É também observado, assim como no biofilme zeína-ácido oléico, um comportamento dependente do tempo em que o ângulo reduziu, conforme Figura 29.

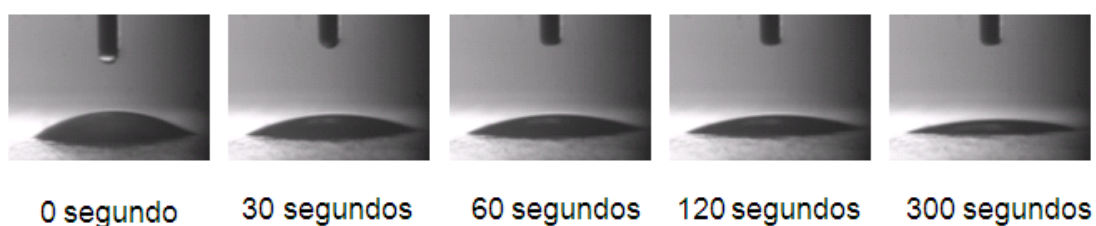


Figura 29 - Ilustração da gota d'água sobre o biofilme com azeite de oliva para medidas de ângulo de contato nos tempos 0, 30, 60, 120 e 300 segundos.

O comportamento observado nas Figuras 28 e 29 é interpretado como um indicativo da capacidade de absorção d'água ou a água que foi aprisionada devido à forças capilares. Com isto, observa-se uma tendência ao caráter hidrofílico e não

hidrofóbico como se esperava, devido às características isoladas dos plasticizantes e da zeína. Scramin et al. (2007(a)), estudando o ângulo de contato de biofilmes de zeína-ácido oléico também verificaram um caráter hidrofílico nos biofilmes, em que o ângulo de contato inicial foi de $68 \pm 3^\circ$, reduzindo com o tempo. De acordo com esses autores, o comportamento hidrofílico dos filmes pode ser em razão da presença das moléculas dos plasticizantes nas cadeias poliméricas, provocando um rearranjo dos grupos polares na direção da interface e também uma redução do número de resíduos de aminoácidos expostos ao solvente.

5.5.6 - Propriedades Térmicas

5.5.6.1 - Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os termogramas dos biofilmes exibem picos exotérmicos e endotérmicos que caracterizam transições ou reações que tenham ocorrido durante a análise, como transição vítrea (T_g), cristalização (T_c), fusão (T_m), entre outras. A Figura 30 apresenta os termogramas onde estão indicadas as temperaturas de fusão (T_m) e de cristalização (T_c) e na Figura 31 os valores das temperaturas de transição vítrea (T_g) dos materiais estudados.

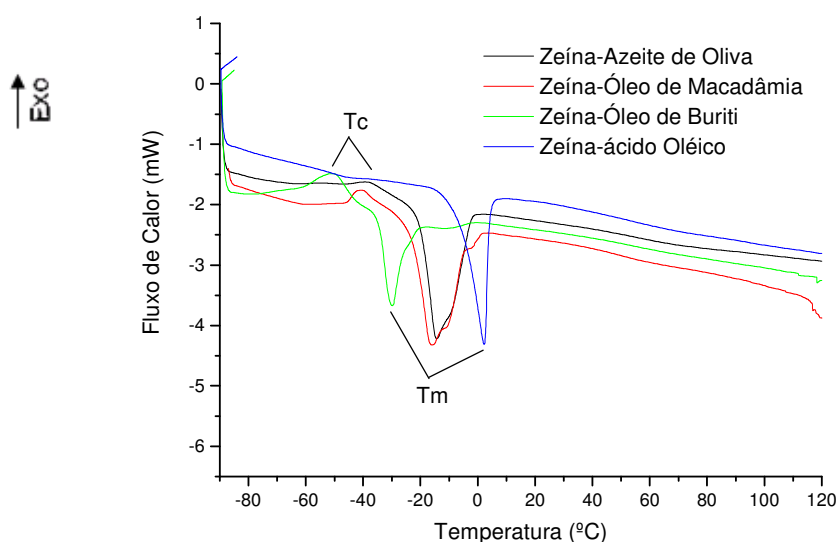


Figura 30 - Termogramas DSC dos quatro biofilmes estudados na temperatura de -90 a 90 °C.

Os pequenos picos no sentido do fluxo de calor exotérmico encontrados entre -55 °C e -35 °C, com clara evidência para os materiais produzidos com óleo de buriti e óleo de macadâmia, são atribuídos à cristalização da água residual (T_c) contida nas suas matrizes (GHANBARZADEH et al., 2006), enquanto os picos observados para todos os materiais no sentido do fluxo de calor endotérmico entre -30 e 3 °C, são atribuídos aos pontos de fusão (T_m) dos óleos.

Segundo Canevarolo Jr. (2010) o fator externo que mais altera os valores de T_g e T_m é a presença de plasticizantes na forma líquida e por meio da análise de composição em ácidos graxos (Ítem 5.3), verificou-se que o óleo de buriti continha uma concentração de ácido linoléico (53,6 %) superior a do ácido oléico (35,1 %). O ácido oléico apresentou T_m de -2,2 °C, enquanto o óleo de buriti teve uma menor temperatura de fusão (-29,8 °C). Isto pode ser devido ao menor teor de ácido oléico presente no óleo de buriti e, portanto, diferentes estruturas químicas. Os resultados encontrados para o ácido oléico confirmam observações de Tandon et al. (2000) em que o ácido oléico, componente majoritário dos óleos estudados, apresenta uma transição de fase sólido-sólido, do tipo ordem-desordem ($\gamma \rightarrow \alpha$), em -2,2 °C.

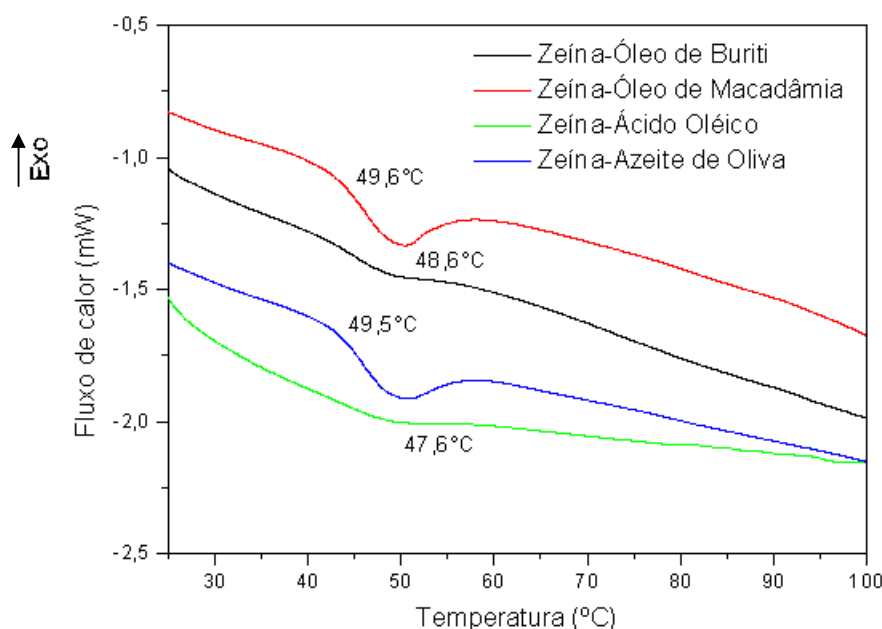


Figura 31 - Termogramas DSC apresentando a T_g dos biofilmes de zeína.

Segundo Magoshi, Nakamura, Murakami (1992); Wang, Crofts, Padua (2003); Corradini (2004), os valores de temperatura de transição vítrea (T_g) encontram-se na faixa de 150 a 180 °C para a zeína em pó pura e decrescem para 50 - 80 °C quando há a adição de polióis ou ácidos graxos. No presente trabalho, os valores de T_g para os filmes de zeína, mostrados na Figura 31, encontraram-se na faixa de 47 a 50 °C. O menor valor (47,6 °C) ocorreu no filme de zeína com ácido oléico e os maiores foram obtidos para os filmes com macadâmia e azeite de oliva (49,6 e 49,5 °C, respectivamente). Apesar da T_g dos filmes não terem apresentado diferenças significativas, este resultado pode ser devido à pureza e teor do ácido graxo oléico presente nos plasticizantes, pois segundo Lucas, Soares, Monteiro (2001), quanto maior o teor do plasticizante menor será o valor da T_g .

5.5.6.2 - Análise Termogravimétrica (TGA)

As estabilidades térmicas da zeína na sua forma nativa (pó), do filme de zeína sem plasticizante e dos filmes plasticizados foram determinadas por termogravimetria (TG). Nas Figuras 32a e 32b são apresentadas, respectivamente, as curvas TG e a primeira derivada ou termogravimetria derivativa (DTG), para a zeína em pó e para o filme de zeína preparado sem plasticizante.

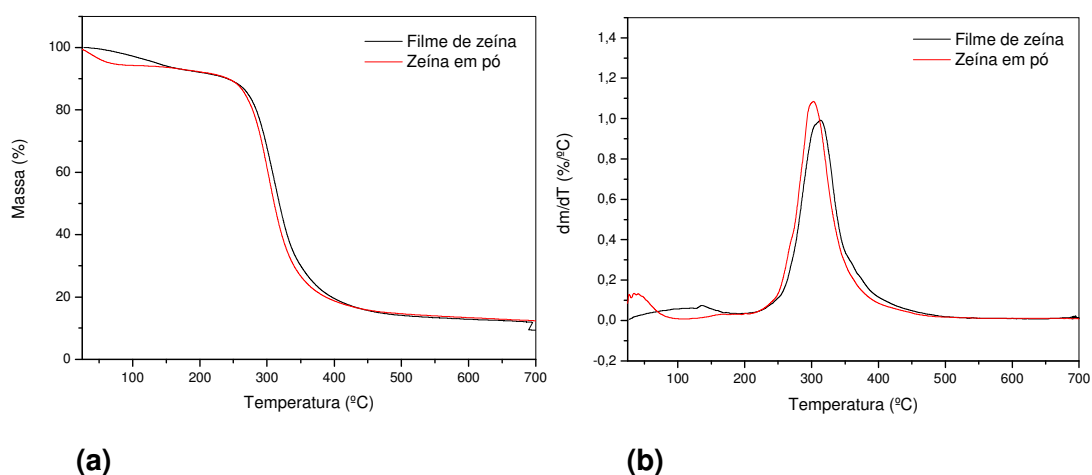


Figura 32 - a) Curvas de TG para a zeína em pó e para o filme de zeína preparado sem plasticizante; b) Curvas da primeira derivada (DTG) da Figura 32a.

O comportamento térmico da zeína em pó e do filme de zeína é bastante similar. A primeira etapa de perda de massa ocorre na faixa de 25 a 120 °C, a qual é devido à evaporação de água. Entre 120 e 200 °C ocorre uma pequena perda de massa, provavelmente, devido à evaporação de ácidos graxos. A principal etapa de degradação térmica, para a zeína na forma de pó e para o filme, ocorre na faixa de 270 a 415 °C. Estes resultados estão de acordo com dados apresentados por Magoshi, Nakamura, Murakami (1992); Oliviero, Maio, Iannace (2010). Nota-se também um pequeno deslocamento, para maiores temperaturas, do pico referente à decomposição da curva (DTG) obtida para o filme de zeína em relação ao pico de decomposição zeína em pó, o qual pode ser devido a diferenças estruturais entre a zeína na forma de pó e na forma de filme.

Nas Figuras 33a e 33b são apresentadas as curvas de TG e de DTG, respectivamente, para os filmes de zeína plasticizados com os diferentes óleos vegetais. As curvas de TG para todos os filmes apresentaram uma perda de massa entre 50 - 120 °C devida à evaporação da água. Os materiais apresentaram também uma perda de massa de 3 a 5 % em 120 °C, sendo estes valores semelhantes ao encontrado por Corradini (2004). Acima de 120 °C notam-se sucessivas perdas de massa em todos os materiais.

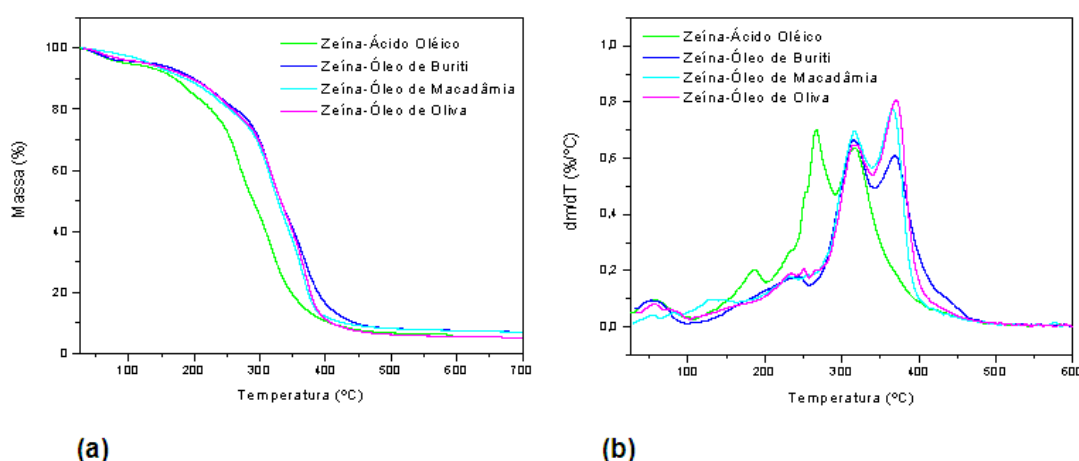


Figura 33 - a) Curvas TG e b) Curva DTG para os filmes adicionados de plasticizantes.

A principal etapa de degradação térmica para os filmes ocorre na faixa de 250 a 405 °C. A faixa de 110 a 200 °C, presente em todos os materiais, é referente a uma pequena perda de massa a qual é, provavelmente, devido à evaporação de ácidos graxos ou do glicerol, pois segundo Schlemmer, Sales, Resck (2010), o plasticizante glicerol ao ser analisado isoladamente, apresenta temperatura de decomposição em torno de 213 °C. Nota-se que para o filme adicionado de ácido oléico a perda de massa iniciou em menor temperatura. Estes resultados são semelhantes aos encontrados na literatura para zeína em pó (MAGOSHI; NAKAMURA; MURAKAMI, 1992; CORRADINI, 2004; OLIVIERO; MAIO; IANNACE, 2010). Observa-se, também, um pequeno deslocamento, para maiores temperaturas, dos picos referentes à decomposição da curva obtida para os filmes de zeína adicionados de óleo de buriti, macadâmia e oliva em relação ao pico de decomposição do filme controle. Este resultado pode ter ocorrido em função de diferenças estruturais entre o ácido oléico e os demais ácidos graxos componentes dos óleos.

5.5.7 - Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes em estudo foram afetadas pelo tipo de plasticizante adicionado. A Tabela 9 mostra os valores encontrados para Tensão de Ruptura (σ_r), Elongação na Ruptura (ϵ_r) e Módulo de Young (E)

Tabela 9 - Valores de tensão de ruptura, elongação na ruptura e módulo de Young para os filmes adicionados de plasticizantes.

Biofilme	Tensão de ruptura (σ_r) (MPa)	Elongação na ruptura (ϵ_r) (%)	Módulo de Young (E) (MPa)
Zeína-Ácido Oléico	0,64 ± 0,27	8,08 ± 2,71	48,6 ± 16,8
Zeína-Óleo de Buriti	1,66 ± 0,29	1,19 ± 0,38	278,28 ± 17,67
Zeína-Óleo de Macadâmia	1,30 ± 0,45	0,93 ± 0,24	278,86 ± 28,06
Zeína-Azeite de Oliva	1,02 ± 0,26	1,20 ± 0,46	202,59 ± 13,71

Em relação à elongação, característica de maior ou menor elasticidade dos materiais, os filmes com ácido oléico foram os que apresentaram a maior percentagem ($8,08 \pm 2,71 \%$) e aqueles elaborados com óleo de macadâmia apresentaram o menor percentual ($0,93 \pm 0,24 \%$) devido a menor homogeneidade da matriz protéica. Esta informação é comprovada nas análises de microscopias apresentadas anteriormente neste trabalho, bem como nos trabalhos de Péroval et al. (2002); Yang, Paulson (2000). Estes autores verificaram que a percentagem de alongamento dos filmes diminui quando os ácidos graxos não são incorporados na matriz. Esta tendência é explicada pelo fato de que os lipídios são incapazes de formar uma matriz coesa e contínua.

Para Péroval et al. (2002); Debeaufort et al. (2000), a adição dos lipídeos também afeta a resistência à tração e módulo de Young dos filmes, apresentando-se menores conforme a melhor incorporação dos lipídeos na matriz. Assim, conforme esses autores e observações das microscopias da presente pesquisa, os resultados de tração indicam que o filme controle foi o mais homogêneo por ter maior coesão entre os componentes da matriz.

Debeaufort, Voilley (1995) também verificaram que em filmes de metilcelulose, quanto maior o diâmetro do glóbulo lipídico dentro da matriz, menor a resistência à tração e alongamento do filme.

5.5.8 - Permeabilidade ao Oxigênio (PO_2)

As amostras de zeína-óleo de buriti, zeína-azeite de oliva e zeína-óleo de macadâmia, apresentaram pequenas fissuras durante o ensaio não permitindo a manutenção de um fluxo de gás constante no equipamento o que comprometeu as leituras obtidas. Estas fissuras podem ser vistas nas fotografias da Figura 34.

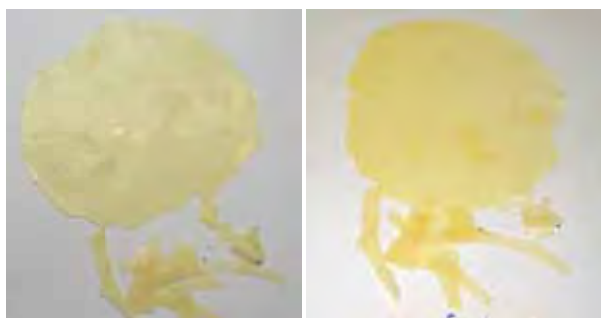


Figura 34 - Amostra de filmes de zeína- óleo de macadâmia que não resistiram ao ensaio de PO_2 .

Tihminlioglu, Atik, Özen (2010) analisaram a permeabilidade ao oxigênio de filmes de zeína adicionados de glicerol e polietilenoglicol e verificaram que a taxa de permeabilidade ao O_2 aumentou com o acréscimo da concentração do plastificante. Esta influência dos plasticizantes está associada à sua natureza hidrofílica e à alta umidade do material que causou inchaço do filme permitindo, assim, rápida difusão dos gases. Os filmes adicionados de polietilenoglicol apresentaram maior permeabilidade ao oxigênio do que os adicionados de glicerol.

A taxa permeabilidade ao oxigênio (TPO_2) para o material com ácido oléico a $23^\circ C$, 75 - 80 % de UR e 1 atm de gradiente de pressão parcial de gás permanente foi de $3,65 \pm 7,6 \text{ cm}^3 \text{ (CNTP).m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$. O coeficiente de permeabilidade (P) foi de $517,87 \text{ cm}^3.\mu\text{m.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}.\text{atm}$ com um coeficiente de variação de 11,1 %.

Oliveira et al. (2006) estudaram, nas mesmas condições de umidade e temperatura, embalagens termoprocessáveis formadas por poliamida (PA) e por copolímero de etileno e álcool vinílico (EVOH). Filmes de PA apresentaram TPO_2 entre 32 e $72 \text{ cm}^3 \text{ (CNTP).m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ e filmes de EVOH apresentaram TPO_2 menor que $5 \text{ cm}^3 \text{ (CNTP).m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ sendo, portanto, um material de maior barreira ao oxigênio, conferindo maior proteção ao produto contra a oxidação. Desta forma, justificou-se o uso deste material como embalagem de produtos cárneos curados cozidos, como presunto, apresuntado e similares, cuja coloração é muito sensível à oxidação e conseqüente perda da desejável coloração rósea. Como o biofilme de zeína, do presente estudo, apresentou ainda menor TPO_2 trata-se de um filme de grande barreira ao oxigênio.

O menor valor da TPO_2 para o filme de zeína-ácido oléico pode ser devido a boa homogeneidade do material, com a matriz protéica bem interagida com o ácido graxo. Conforme Anker, Stading, Hermansson (2000), quando os filmes apresentam uma estrutura protéica compacta, portanto com boa interação entre os componentes, a permeabilidade ao oxigênio é reduzida devido ao aumento de obstáculos à passagem de moléculas do gás.

6 - CONCLUSÕES

- Todos os filmes selecionados para a posterior caracterização estrutural e funcional apresentaram aspecto visual homogêneo, espessura uniforme e boa maleabilidade.
- A zeína utilizada apresentou contaminação residual de lipídeos do milho e o óleo de buriti apresentou uma menor concentração de ácido oléico (35,1 %) comparado aos demais plasticizantes adicionados (acima de 61 %).
- Os diferentes plasticizantes não afetaram a estrutura química e molecular da matriz de zeína e também não houve influência marcante dos diferentes plasticizantes na cristalinidade dos materiais.
- Os poros encontrados por meio da MEV tratam-se, na realidade, de glóbulos de gordura conforme dados da microscopia óptica.
- Sugere-se que quanto maior o teor de ácido oléico no óleo / plasticizante mais homogêneo e opaco é o material.
- Biofilmes elaborados com ácido oléico puro apresentaram os menores valores de PVA, solubilidade e ângulo de contato (molhabilidade), sendo, portanto, mais hidrofóbicos que os demais. Isto foi devido à formação de uma matriz mais estruturada que pôde ser visualizada na análise de microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica.
- Materiais adicionados de óleo de buriti e óleo de macadâmia são altamente hidrofílicos, assim, quanto menor o teor de ácido oléico maior é a hidrofobicidade.
- Os dados de umidade de equilíbrio higroscópico se ajustaram de forma satisfatória a todos os modelos de isothermas testados ($0,85 \leq R^2 \leq 0,99$) sendo que o modelo de Peleg apresentou os melhores resultados com coeficiente de determinação superior a 0,97. Os diferentes tipos de plasticizantes não tiveram efeito significativo sobre os valores da umidade de equilíbrio. Há uma tendência de que, para atividades de água menor que 0,6, o filme de zeína com azeite de oliva apresente o valor da umidade de equilíbrio menor em relação aos outros plasticizantes.
- Os valores de Tg para todos os filmes de zeína encontraram-se na mesma faixa de temperatura (48 a 50 °C), permitindo concluir que os diferentes óleos não afetaram a

Tg. Foram verificados picos de cristalização da água residual contida na matriz protéica e picos correspondentes aos pontos de fusão dos óleos (entre -30 e 3 °C).

- A principal etapa de degradação térmica, para a zeína na forma de pó e para o filme sem plasticizantes, ocorreu na faixa de 270 a 415 °C e para os filmes plasticizados na faixa de 250 a 405 °C. As curvas TG dos filmes adicionados de ácidos graxos apresentaram uma perda de massa entre 50 e 120 °C devida à evaporação da água. A 120 °C a perda de massa foi de 3 a 5 % e acima desta temperatura notam-se sucessivas perdas de massa em todos os materiais as quais foram, provavelmente, devido à evaporação de ácidos graxos ou do glicerol. A maior perda de massa ocorreu para o filme adicionado de ácido oléico.

- Na análise mecânica, os filmes com ácido oléico foram os que apresentaram a maior percentagem de elongação na ruptura, devido à maior homogeneidade da matriz protéica ocasionado pelo maior teor de ácido oléico. Esta informação é confirmada com os menores valores apresentados por este material para o módulo de Young e a menor tensão de ruptura do material.

- Só foi possível realizar o ensaio de PO_2 no filme adicionado de ácido oléico, pois os demais apresentaram pequenas fissuras durante o ensaio. O resultado obtido para o filme controle foi inferior aos encontrados na literatura sugerindo tratar-se de um material bastante homogêneo e, portanto, com mais obstáculos à passagem de moléculas de oxigênio.

- Desta forma, o material adicionado de ácido oléico puro foi o que apresentou as melhores características estruturais e funcionais concluindo que o teor de ácido oléico no plasticizante é de suma importância para uma melhor ou menor performance do filme formado.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMILHO. Associação Brasileira das Indústrias Moageiras de milho. Estatísticas. Disponível em: < <http://www.abimilho.com.br>>. Acesso em: 02 ago. 2010.

ABRAMILHO. Associação Brasileira dos Produtores de Milho. Disponível em: <<http://www.abramilho.org.br>>. Acesso em: 02 ago. 2010.

ALBUQUERQUE, M. L. S. et al. Absorption and emission spectra of buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 6B, p. 1113-1117, 2005.

AL-MUHTASEB, A. H.; McMINN, W. A. M.; MAGEE, T. R. A. Water sorption isotherms of starch powders. Part 2: Thermodynamic characteristics. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 62, n. 1-4, p. 135, 2004.

ALVES, C. O. C. **Pós obtidos de polpa de pequi (*Caryocar brasiliense camb.*) liofilizada: higroscopicidade e microestrutura**. 2007. 146 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

ANKER, M.; STADING, M.; HERMANSSON, A. Relationship between the microstructure and the mechanical and barrier properties of whey protein films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 9, p. 3806-3816, 2000.

ANSELMO, G. C. S. et al. Determinação da higroscopicidade do cajá em pó por meio da secagem por atomização. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 58-65, 2006.

ARGOS, P. et al. Structure model for maize zein proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 257, n. 17, p. 9984-9990, 1982.

ASTM. Annual Book of American Society for Test and Material Standards, **Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials**. E96-95. The Society: Philadelphia, PA., 1995.

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., 2002.

ASTM. Annual Book of American Society for Test and Material Standards, **Standard Test Method for Determination of Oxygen Gas Transmission Rate, Permeability and Permeance at Controlled Relative Humidity through Barrier Materials using a Coulometric Detector**. F1927-07. The Society: Philadelphia, PA., 2010.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação Agrícola**. 4 ed., Jaboticabal: Ed. FUNEP, 2006.

BARBOSA, S. J. et al. Análise de difração de raios X em suco de manga em pó obtido por spray drying. In: III FÓRUM DE ENSINO, PESQUISA, EXTENSÃO E GESTÃO, 2009, Montes Claros. **Anais...** Montes Claros: Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, 2009. Disponível em: <<http://www.fepeg.unimontes.br/evento2009/index.php/fepeg/fepeg2009/schedConf/presentations>>. Acesso em: 10 nov.2010.

BARTH, A. Review: Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 767, n. 9, p. 1073-1101, 2007.

BATISTA, J. A. **Desenvolvimento, caracterização e aplicações de biofilmes a base de pectina, gelatina e ácidos graxos em bananas e sementes de brócolos**. 2004. 140f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

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**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 781-788, 2005.

BECK, M. I.; TOMKA, I.; WAYSEK, E. Physico-chemical characterization of zein as a film coating polymer. A direct comparison with ethyl cellulose. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 141, n. 1/2, p. 137-150, 1996.

BERTAN, L. C. **Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e compostos a base de gelatina, ácidos graxos e breu branco**. 2003. 157 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BERTAN, L. C. et al. Effect of fatty acids and "Brazilian elemi" on composite films based on gelatin. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 19, n. 1-6, p. 73-82, 2005.

BICUDO, T. C. et al. Study of the conformation of γ -zeins purified maize proetin bodies by FTIR and NMR spectroscopy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 383, n. 1-7/8, p. 291-296, 2005.

BLANCHARD, P. H. **Technology of corn wet milling and associated processes**. New York: Elsevier, 1992.

BRUNAUER, S. et al. On a theory of the van der Waals adsorption of gases. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 62, n. 1-24, p.1723-1732, 1940.

CANEVAROLO JR., S. V. **Técnica de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 448p., 2007.

CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos Polímeros** - Um texto básico para tecnólogos e engenheiros. 3 ed., São Paulo: Artliber, 280p., 2010.

CAO, N.; FU, Y.; HE, J. Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 21, n. 7, p. 1153-1162, 2006.

CARTER, R.; RECK, D. R. **Low temperature solvent extraction process for producing high quality zein**. U.S. Patent 3, 535, 305, 1970.

CARVALHO FILHO, C. D. **Conservação de cerejas (*Prunus avium* L.), cv. Ambrunés, utilizando coberturas comestíveis**. 2000. 108 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

CASTRO, C. R. F. **Tomografia por difração de raios X em tecidos biológicos utilizando radiação síncrona**. 2006. 100 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

CHANVRIER, H. et al. Structure and mechanical behaviour of corn flour and starch-zein based materials in the glassy state. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 59, n. 1, 3-4, p. 109-119, 2005.

CHAVES, M. C. V. et al. Caracterização físico-química do suco de acerola. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 4, n. 2, p. 121-133, 2004.

CHEN, S.; NUSSINOVITCH, A. The role of xanthan gum in traditional coatings of easy peelers. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 319-326, 2000.

CORRADINI, E. **Desenvolvimento de blendas poliméricas de zeína e amido de milho**. 2004. 132 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

CORRADINI, E.; PINEDA, E. A. G.; HECHENLEITNER, A. A. W. Lignin-poly (vinyl alcohol) blends studied by thermal analysis. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v. 66, p. 199-208, 1999.

CORRADINI, E. et al. Mechanical and morphological characterization of starch/zein blends plasticized with glycerol. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 101, n. 1-6, p. 4133-4139, 2006.

CORRADINI, E. et al. Preparation and characterization of thermoplastic starch/zein blends. **Materials Research**, São Carlos, v. 10, n. 3, p. 221-231, 2007.

CORTEZ, J. C. V. Análise termogravimétrica da bioespuma poliuretana do projeto de produto gasolimp como agente cogrador de energia. *In*: INTERNATIONAL WORKSHOP ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION – “KEY ELEMENTS FOR A SUSTAINABLE WORLD: ENERGY, WATER AND CLIMATE CHANGE”. São Paulo, 2009.

COUPLAND, J. N. et al. Modeling the effect of glycerol on the moisture sorption behavior of whey protein edible films **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 43, n. 1-3, p. 25-30, 2000.

CUQ, B. et al. Select functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 3, p. 622-626, 1997.

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

DEBEAUFORT, F. et al. A. Lipid hydrophobicity and physical state effects on the properties of bilayer edible films. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 180, p. 47-55, 2000.

DEBEAUFORT, F., VOILLEY, A. Effect of surfactants and drying rate on barrier properties of emulsified edible films. International **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 30, p. 183-190, 1995.

DICKEY, L. C. et al. Zein batch extraction from dry-milled corn: cereal disintegration by dissolving fluid shear. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 75, n. 4, p. 443-448, 1998.

DONG, J.; SUN, Q. S.; WANG, J. Y. Basic study of corn protein, zein, as a biomaterial in tissue engineering, surface morphology and biocompatibility. **Biomaterials**, Surrey, v. 25, n. 1-28, p. 4691-4697, 2004.

ERENO, D. Biotecnologia - Novos materiais – Plástico de buriti. **Pesquisa Fapesp**, São Paulo, n. 117, p. 76-77, 2005.

ESEN, A. A proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays* L.). **Journal of Cereal Science**, London, v. 5, n. 1-3, p.117-128, 1987.

EVORA, M. C. et al. Comparação de técnicas FTIR de transmissão, reflexão e fotoacústica na análise de poliamida-6, reciclada e irradiada. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 12, n. 1, p. 60-68, 2002.

FAKHOURI, F. M. **Bioplásticos flexíveis e biodegradáveis à base de amido e gelatina**. 2009. 249 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

FERREIRA; C. D.; PENA, R. S. Comportamento higroscópico da farinha de pupunha. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 251-255, 2003.

FINK, D. J.; CHITTUR, K. K. Monitoring biological process by fourier transform infrared spectroscopy. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 9, p. 568-572, 1986.

FINK, D.J. et. al. Quantitative surface studies of protein adsorption by infrared spectroscopy. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 165, n. 1-2, p. 147-154, 1987.

FIRESTONE, D. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemistry Society. 5th Ed. Rev., 2nd print. Champaign: AOCS. 2005/2006. v.2, met. Ce 1e-91, Ce 1f-96, Ce1-62, 2006.

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

FORATO, L. A.; BERNARDES-FILHO, R.; COLNAGO, L.A. Protein structure in KBr pellets by infrared spectroscopy. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 259, p. 136-141, 1998.

FORATO, L. A. et al. Identification of free fatty acids in maize protein bodies and purified α zeins by ^{13}C and ^1H nuclear magnetic resonance. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1543, p. 106–114, 2000.

FORATO, L.; BICUDO, T.; COLNAGO, L. A. Conformation of α zeins in solid state by Fourier Transform IR. **Biopolymers**, New York, v. 72, n. 3-6, p. 421-426, 2003.

FORATO, L. A.; YUSHMANOV, V. E.; COLNAGO, L. A. Interaction of two prolamins with 1- ^{13}C oleic acid by ^{13}C NMR[†]. **Biochemistry**, Washington v. 43, n. 22, p. 7121-7126, 2004.

FU, F. N.; FULLER, M. P.; SINGH, B. R. Use of fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy for the study of surface adsorption of proteins. **Applied Spectroscopy**, Baltimore, v. 47, n. 1-12, p. 98-102, 1993.

GHANBARZADEH, B. et al. Effect of plasticizing sugars on rheological and thermal properties of zein films. **Food Research International**, Barking, v. 39, n. 1-10, p. 882-890, 2006.

GHANBARZADEH, B. et al. Effect of plasticizing sugars on water vapor permeability, surface energy and microstructure properties of zein films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, p.1191–1197, 2007.

GASPAR, M. **Alterações em genes de zeína induzidas por variação somacional**. 1996. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

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

GEORGET, D. M. R.; BARKER, S. A.; BELTON, P. S. A study on maize proteins as a potential new tablet excipient. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, London, v. 69, p. 718-726, 2008.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 58, n. 6, p. 206-211, 1993.

GONTARD, N. et al. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapor permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 39-50, 1994.

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**, Essex, v. 83, n. 2-4, p. 521-530, 2007.

GREENSPAN, L. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. **Journal of Research of the National Bureau of Standards**, Washington, v. 81, n. 1, 1977.

HA, T. T.; PADUA, G. W. Effect of extrusion processing of properties of zein-fatty acids sheets. **Transactions of the ASAE**, St. Joseph, v. 44, n. 5, p. 1223-1228, 2001.

HALSEY, G. Physical adsorption on uniform surfaces. **The Journal of Chemical Physics**, New York, v. 16, n. 10, p. 931-937, 1985.

HANLON, J.F. **Handbook of package engineering**. 2th ed. Lancaster: Technomic, 1992.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methy esters from lipids. **Laboratory Practice**, London, v. 22, n. 8, p. 475-476, 1973.

HELDMAN, D. R.; LUND, B. L. **Handbook of Food Engineering**. New York: Marcel Dekker, 1992, 756p.

HEIDECKER, G.; CHAUDHURI, S. Highly clustered zein gene sequences reveal evolutionary history of the multigene family. **Genomics**, San Diego, v. 10, p. 719-732, 1991.

HENDERSON, S. M. A basic concept of equilibrium moisture. **Agricultural Engineering**, St. Joseph, v. 33, n.1, p. 29-32, 1952.

HOLLAND, B. et al. In: The composition of foods. Mc Cance and Widdowson's. 6th Ed. Cambridge, UK, p. 9-10, 2002.

HOOD, L. L. Collagen in sausage casings. In: PEARSON, A.M.; DUTSON, T.R.; BAILEY, A.J. (Ed.). New York: Van Nostrand Reinhold, **Advances in Meat Research**, Westport, v. 4, p. 109-129, 1987.

HORWITZ, W. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. 18th ed. AOAC, v. 2, cap. 41, met. 996.06, p. 20, 2005.

HSU, B. L. et al. Structural investigation of edible zein films/coating and determining their thickness by FT-Raman. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 1-26, p. 5089-5095, 2005.

JACKSON, D. S.; SHANDERA, D. L. Corn wet milling: Separation chemistry and technology. **Advances in Food and Nutrition Research**, San Diego, v. 38, p. 271-300, 1995.

JAWHARI, T.; QUINTANILLA, L. e PASTOR, J. M., A Comparison of Specular Reflection and Pa-FTIR Techniques in the Analysis of Annealed Injection-Molded Polyamide 6,6. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 51, n. 3, p. 463-471, 1994.

JEON, J. S.; SPERLINE, R. P.; RAGHAVANS, S. Quantitative analysis of absorbed serum albumin on segmented polyurethane using FTIR-ATR spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, Baltimore, v. 46, n. 1-12, p. 1644-1648, 1992.

KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: A review. **Food Technology**, Chicago, v. 10, n. 12, p. 47-59, 1986.

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

KLEEN, D.; PADUA, G. W.; ENGESETH, N. Stabilization of lipids in a biodegradable zein-oleic film by incorporation of antioxidants. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 79, n. 1-6, 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.

KUMAGAI, H.; SUGIYAMA, T.; IWANAMOTO, S. Effect of water content on dielectric relaxation of gelatin in a glassy state. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n.1-12, p. 2260-2265, 2000.

LABUZA, T. P. Sorption phenomena in foods. **Food Technology**, Chicago, v. 22, n. 3, p. 263-271, 1968.

LABUZA, T. P. **Moisture sorption: practical aspects of isotherm measurement and use**. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemistry, 1984.

LAI, H-M.; PADUA, G. W. Properties and microstructure of plasticized zein films. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 74, n. 1-6, p. 771-775, 1997.

LAI, H-M; PADUA G. W. Water vapor barrier properties of zein films plasticized with oleic acid. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 75, n. 1-6, p. 194-199, 1998.

LAI, H-M.; GEIL, P. H.; PADUA, G. W. X-ray diffraction characterization of the structure of zein-oleic acid films. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 71, n. 1-14, p.1267-1281, 1999.

LI, Y. et al. Paste viscosity of rice starches of different amylose content and carboxymethylcellulose formed by dry heating and the physical properties of their films. **Food Chemistry**, London, v. 109, n. 3, p. 616-623, 2008.

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

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

LEHNINGER, A. L. **Fundamentos de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1980.

LOPES-FILHO, J. F. et al. Sorption isotherms of alligator's meat (*Caiman crocodiles yacare*). **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 52, n. 1, p. 201-206, 2002.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de polímeros: Determinação de peso molecular e análise térmica**. Série Instituto de Macromoléculas. Rio de Janeiro: e-papers, 366 p., 2001.

MAGOSHI, J.; NAKAMURA, S.; MURAKAMI, K-I. Structure and physical properties of seed proteins. I. Glass transition and crystallization of zein protein from corn. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 45, n. 1-12, p. 2043-2048, 1992.

MALI, S. et al. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 75, n. 1-4, p. 453-460, 2006.

MANHÃES, L. R. T. **Caracterização da polpa de buriti (*Mauritia flexuosa*, Mart.): um potente alimento funcional**. 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

MANO, E. B. **Polímeros como materiais de engenharia**. São Paulo: Edgard Blücher, p. 25, 1996.

MARCOTTE, L. et al. An alternative infrared spectroscopy assay for the quantification of polysaccharides in bacterial samples. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 36, p. 17-47, 2007.

MATTA JUNIOR, M. D. **Caracterização de biofilms obtidos a partir de amido de ervilha (*Pisum sativum*) associado à goma xantana e glicerol**. 2009. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MATSUSHIMA, N. et al. Three-dimensional structure of maize α -zein proteins studied by small-angle x-ray scattering. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1339, p. 14-22, 1997.

MCGOWAN, B. A.; LEE, S. Y. Comparison of methods to analyze time-intensity curves in a corn zein chewing gum study. **Food quality and preference**, Barking, v. 17, n. 1-8, p. 296-306, 2006.

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**, Easton, v. 42, n. 4, p. 841-845, 1994a.

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

MECITOGLU, C. et al. Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging. **Food Research International**, Barking, v. 39, n. 1-10, p. 12-21, 2006.

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**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 179-189, 2000.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise térmica em materiais**. São Paulo: I Editora, 1 ed., p. 113-201, 2002.

MUSSOLINI, R. C. **Caracterização físico-química e rendimento da moagem úmida do milho de quatro híbridos de milho**. 2009. 58 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto 2009.

NUSSIO, L. G. **Milho**. A cultura do milho e sorgo para a produção de silagem, Piracicaba: USP, ESALQ, p. 58-86, 1990.

OLIVEIRA, L. M. et al. Embalagens termoformadas e termoprocessáveis para produtos cárneos processados. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 16, n. 3, p. 202-210, 2006

OLIVIERO, M.; MAIO, E. D.; IANNACE, S. Effect of molecular structure on film blowing ability of thermoplastic zein. **Journal of Applied polymer Science**, New York, v. 115, p. 277-287, 2010.

OSIRO, D. et al. A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 236, n. 1-2, p. 313-318, 2004.

OSWIN, C. R. The kinetics of parking life. III. The isotherm. **Journal of Chemical Industry and Engineering**, Beijing, v. 65, p. 419-423, 1946.

PARK, H. J.; CHINANN, M. S. Gas and Water Vapor Barrier Properties of Edible Films from Protein and Cellulosic Materials. **Journal of food Engineering**, Essex, v. 25, n. 1-4, p. 497-507, 1995.

PARK, K. J.; NOGUEIRA, R. I. Modelos para ajuste de isotermas de sorção de alimentos. **Engenharia Rural**, Piracicaba, v. 1 n. 3, p. 180-186, 1992.

PARK, K. J. B. et al. Considerações termodinâmicas das isotermas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 10, n. 1, p. 83-94, 2008.

PARRIS, N. et al. Water vapor permeability and solubility of zein/starch hydrophilic films prepared from dry milled corn extract. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 32, n. 1-4, p.199-207, 1997.

PEDERSEN, K. et al. Cloning and sequence analysis reveal structural variation among related zein genes in maize. **Cell**, Cambridge, v. 29, n. 1-3, p. 1015-1026, 1982.

PEDRO, M. A. M. **Influência de encapsulantes e do método de secagem nas propriedades físico-químicas e atributos de qualidade de polpa de maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) em pó**. 2009. 204 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto 2009.

PELEG, M. Assessment of a semi-empirical four parameter general model for sigmoid moisture sorption isotherms. **Journal of Food Processing Engineering**, Hoboken, v. 16, n. 1, p. 21-37, 1993.

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

PEREZ-GAGO, M. B.; KROCHTA, J. M. Drying temperature effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein-lipid emulsion films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 1-12, p. 2687-2692, 2000.

PEREZ-GAGO, M. B.; KROCHTA, J. M. Lipid Particle Size Effect on Water Vapor Permeability and Mechanical Properties of Whey Protein/Beeswax Emulsion Films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 1-12, p. 996-1002, 2001.

PÉROVAL, C. et al. A. Edible arabinoxylan-based films. 1. Effects of lipid type on water vapor permeability, film structure, and other physical characteristics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 2-5, p. 3977-3983, 2002.

PINAZZA, A. P. **Cadeia produtiva do milho** – Série Agronegócios, volume 1 / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura. Brasília: MAPA/SPA, 108 p., 2007.

PITT, W. G.; COOPER, S. L. Albumin adsorption on alkyl chain derivatized polyurethanes: I. The effect of C-18 alkylation. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v. 22, n. 1,4, p. 359-382, 1988.

PORPINO, K. K. P. **Biossorção de ferro (II) por casca de caranguejo *Ucides cordatus***. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

RAKOTONIRAINY, A. M.; PADUA, G. W. Effects of lamination and coating with drying oils on tensile and barrier properties of zein films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 1-12, p. 2860-1863, 2001.

RAMIREZ, E.C. et al. Engineering process and cost model for a conventional corn wet milling facility. **Industrial Crops and Products**, v. 27, p. 91-97, 2008.

REGINA, R.; SOLFERINI, O. Produção de cultivares de ingredientes de alto valor nutricional: características e benefícios. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2, 2002, Uberlândia. **Anais...** Campinas: CBNA, p.105-116, 2002.

REINERS, R.A.; WALL, J.S.; INGLETT, G.E. Corn proteins: potential for their industrial use. In: Pomeranz Y, editor. Industrial uses of cereals. St. Paul, MN: American, 1973.

REIS, A. B. **Caracterização de filmes e coberturas de quitosana aplicados em papelão ondulado**. 2005. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

RHIM, J. W. et al. Properties of ultraviolet irradiated protein films. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, London, v. 32, n. 1-2, 4-8, p. 129-133, 1999.

RHIM, J. A. et al. Sodium dodecyl treatment improves properties of cast films from soy protein isolate. **Industrial Crops and products**, Lincoln, v. 15, p. 199-205, 2002.

RIZVI, S.S.H. Thermodynamic properties of foods in dehydration. *In*: M.A. Rao and S.S.H. Rizvi (Ed.). Engineering Properties of Foods, New York: Academic Press, 1995.

ROE, R. X-ray diffraction. *In*: ENCYCLOPEDIA OF POLYMER SCIENCE AND ENGINEERING. Nova York: J. I. Kroschwitz, v. 17, 1985.

ROGERS, C.E. Permeation of gases and vapors in polymer. *In*: POLYMER PERMEABILITY. J. Comyn, London: Elsevier Applied Science, p. 11-73, 1985.

SAKANAKA, L. S. **Estudo das condições de armazenamento sobre as propriedades mecânicas e de barreira de filmes de gelatina reticulada**. 2002. 175 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

SANTOS, P. V. **Elaboração, aditivação e caracterização de biofilmes à base de fécula de mandioca**. 2004. 252 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

SANTOSA, F. X. B.; PADUA, G. W. Tensile properties and water absorption of zein sheets plasticized with oleic and linoleic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 1-12, p. 2070-2074, 1999.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. et al. **Embalagens Plásticas Flexíveis**. Principais Polímeros e Avaliação de Propriedades. Campinas: CETEA/ITAL, 267p., 2002.

SCHNEIDER, F.; TORRES, F. J. S. Resposta Técnica produzida pelo Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas / SBRT - SENAI-RS, jul. 2006. Disponível em <<http://www.sbrt.ibict.br>>. Acesso em: 05 jun. 2008.

SCHLEMMER, D.; SALES, M. J. A.; RESCK, I. S. Preparação, Caracterização e Degradação de Blendas PS / TPS Usando Glicerol e Óleo de Buriti como Plastificantes. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 20, n. 1, p. 6-13, 2010.

SCRAMIM, J. A. et al. Caracterização da ação protetora de filmes à base de zeína e ácido oléico aplicados em maçãs in natura. Embrapa Instrumentação Agropecuária. **Circular técnica** 37, São Carlos, 2007a.

SCRAMIN, J. A. et al. Surface wetting and DMA characterization of zein/oleic acid based films. *In: XI INTERNATIONAL MACROMOLECULAR COLLOQUIUM; 6th ISNAPOL*, Gramado, RS, 2007. **Proceedings...** Porto Alegre, RS : UFRGS/ABPol, 4p. 1 CD-ROM. Paper 117, 2007b.

SCHROOYEN, P. M. M. et al. Stabilization of solutions of feather keratins by sodium dodecyl sulfate. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 240, n. 1, p. 30-39, 2001.

SESSA, D. J. et al. Improved methods for decolorizing corn zein. **Industrial Crops and Products**, v. 18, n. 1, p. 55-65, 2003.

SHUKLA, P. T. Trends in zein research and utilization. **Cereal Foods World**, Minneapolis, v. 37, n. 1-12, p. 225-225, 1992.

SHUKLA, R. **Production of zein from dry milled corn by solvent extraction and ultrafiltration**. 2000. Ph.D. Thesis. University of Illinois at Urbana-Champaign, 2000.

SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. **Biochemical Journal**, London, v. 267, n. 1, p. 1-12, 1990.

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

SILVA, M. E. T. F. **Glicopéptidos fluorescentes: síntese e caracterização**. 2009. 148 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade do Minho, Escola de Ciências, Braga, Portugal, 2009.

SINGH, N.; ECKHOFF, S. R. Wet milling of corn – A review of laboratory – scale and pilot plant- scale procedures. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, 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 e Engenharia**, Uberlândia, v. 8, n. 1, p. 60-67, 1999.

SOBRAL, P. J. A.; OCUNO, D. Permeabilidade ao vapor de água de biofilmes à base de proteínas miofibrilares de carne. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 3, p. 11-16, 2000.

STRAATEN, V. J.; PEPPAS, N. A. ATR-FTIR analysis of protein adsorption on polymeric surfaces. **Journal of Biomaterials Science - Polymer Edition**, Germantown, v. 2, p. 113-121, 1991.

SZTUKA, K.; KOLODZIEJSKA, I. The influence of hydrophobic substances on water vapor permeability of fish gelatin films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, n.1-8, p. 1062-1064, 2009.

TANADA-PALMU, P. S. **Preparação, propriedades e aplicação de biofilmes comestíveis à base de glúten de trigo**. 2003. 258 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

TANDON, G. et al. Phase transitions in oleic acid as studied by X-ray diffraction and FT-Raman spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 524, p. 201-215, 2000.

TAVARES, L. L. **Efeito da adição de argilas modificadas na estrutura e propriedades funcionais de biofilmes produzidos a base de zeína**. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

TATHAM, A. S. et al. Solution conformational analysis of the α -zein proteins of maize. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 268, n. 2-13, 15-36, p. 26253-26259, 1993.

TELIS, V. R. N. et al. Water sorption thermodynamic properties applies to persimmon skin and pulp. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 343, p. 49-56, 2000.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 14, n. 1-12, p. 71-78, 2003.

TIHMINLIOGLU, F.; ATIK, I. D.; ÖZEN, B. Water vapor and oxygen-barrier performance of corn-zein coated polypropylene films. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 96, p. 342–347, 2010.

TORRES-GINER, S.; GIMENEZ, E.; LAGARON, J. M. Characterization of the morphology and thermal properties of zein prolamine nanostructures obtained by electrospinning. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 22, n. 1-9, p. 601-614, 2008.

VAN DEN BERG, C. Description of water activity of food engineering purposes by means of the GAB model of sorption. *In*: MCKENNA, B.M. (ed.). **Engineering and foods**. New York: Elsevier, p. 119-131, 1984.

VAN DEN BERG, C. Development of BET like models for sorption of foods: theory and relevance. *In*: D. Simatos & J. L. Multon (ed.). **Properties of water in foods**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, p. 119-135, 1985.

VANIN, M. **Obtenção caracterização e estudo da adsorção de proteínas na blenda biorreabsorvível poli (β-hidroxibutirato) (PHB)/poli (L-ácido láctico) (PLLA)**. 2003. 182 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

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

VEIGA, P. G. J. et al. Efeito do preparo da amostra na análise do ângulo de contato de filmes biodegradáveis obtidos a partir de amido de mandioca. *In*: 7º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS. **Anais...** Belo Horizonte, p. 905, 2003.

VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2, **Ann. Histochem.**, v. 15, p. 289-296, 1970.

VILLALOBOS, R. et al. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 19, n. 1-6, p. 53-61, 2005.

VITALATAMAN. Vital Âtaman. O óleo da sua vida. Disponível em: <<http://www.vitalatman.com.br>>. Acesso em: 02 out. 2010.

WANG, Q.; CROFTS, A. R.; PADUA, G. W. Protein-lipid interactions in zein films investigated by surface plasmon resonance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 25, p. 7439-7444, 2003.

WANG, Y.; PADUA, G. W. Water sorption properties of extruded zein films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 1-26, p. 3100-3105, 2004.

WANG, Y. et al. Effects of processing on the structure of zein/oleic acid films investigated by x-ray diffraction. **Macromolecular Bioscience**. Weinheim, v. 5, p. 1200-1208, 2005.

WANG, H. J.; FU J. X.; WANG, J. Y. Effect of water vapor on the surface characteristics and cell compatibility of zein films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 69, n. 1, p.109-115, 2009.

WEI, W.; BAIANU, I. C. Physicochemical properties of plasticized corn zein films: NMR and adsorptive studies. **Macromolecular Symposia**, Heidelberg, v. 140, p.197-209, 1999.

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

WU, S.; MYERS, D. J.; JOHNSON, L. A. Effects of maize hybrid and meal drying conditions on yield and quality of extracted zein. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 74, n. 3, p. 268-273, 1997.

XIE, L. et al. Edible film coating to minimize eggshell breakage and reduce post wash bacterial contamination measured by dye penetration in eggs. **Journal of Food Science**. Chicago, v. 67, n. 1, p. 280-284, 2002.

YANG, L.; PAULSON, A. T. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. **Food Research International**. Barking, v. 33, n. 1-10, p. 571-578. 2000.

YOUNG, J. F. Humidity control in the laboratory using salt solutions - a review. **Journal of Applied Chemistry**, London, v. 17, n. 1-12, p. 241-245, 1967.

YOSHINO, T.; ISOBE, S.; MAEKAWA, T. Influence of preparation conditions on the physical properties of zein films. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 79, n. 4, p. 345-349, 2002.

ANEXO

Morphological and Structural Characteristics of Zein Biofilm Added with Xanthan Gum

Crislene Barbosa de Almeida¹, Kelly Tafari Catelam¹, Marinônio Lopes Cornélio² and José Francisco Lopes Filho^{1*}

¹Department of Food Engineering and Technology, UNESP – São Paulo State University, R.Cristóvão Colombo, 2265 CEP: 15054-000, São José do Rio Preto, Brazil

²Physics Department, UNESP – São Paulo State University, R.Cristóvão Colombo, 2265 CEP: 15054-000, São José do Rio Preto, Brazil

Summary

Morphological and structural characteristics of zein-based biofilms have been studied in this work. The sorbitan component in the control formulation of the film was substituted with xanthan gum at concentrations between 0.01 by 0.04 % to analyze its effect on lipid dispersion. Scanning electron microscopy (SEM) showed a surface for the control (0 % xanthan) with good lipid distribution. However, when the samples were investigated by optical microscopy (OM), lipid globules in the control biofilm appeared larger and more dispersed in the matrix than in the other samples. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy pointed out that xanthan concentrations deeply affected C=O linkages from amide I group, as well as the functional N-H group of amide II of the zein structure. Other weak interactions of amide I and II with carboxylic acids and aliphatic compounds were also observed. UV-VIS analysis as well as transparency measurements indicated that the addition of xanthan to the film matrix lowered significantly its transparency properties. Overall, the addition of xanthan gum favoured lipid dispersion in the matrix, making biofilms more homogeneous, although with less transparency.

Key words: zein, biofilm, xanthan gum, morphological properties, structural properties

Introduction

Since the 1980s, edible films have been of great interest to the food industry as carriers of nutrients and as biodegradable films (1). Natural biopolymers, polysaccharide- and protein based, show the highest potential, mainly because they are renewable, abundant, economic to produce and can form a continuous matrix.

Zein, the main alcohol-soluble corn protein, is commercially produced from corn

*Corresponding author; Phone: ++55 17 32 212 254; Fax: ++55 17 32 212 299; E-mail: lopes@ibilce.unesp.br
to amino acid imbalance, high content of leucine and glutamine and low content of lysine and tryptophan (2- 4). A major advantage of zein, as compared to other corn proteins, is its polymerization characteristic. It has twice more potential than necessary to produce linear polyamide/polyester polymers (5).

Microbial biopolymers are polysaccharides produced by different types of bacteria, fungi and yeast. These materials have the capacity of forming gels and viscous solutions even at low concentrations (6). They are also important due to their emulsification properties, crystallization control, syneresis inhibition, encapsulation, and film-forming capacity (7). Among these biopolymers, xanthan has been used in several food preparations. According to Morris (8), xanthan or xanthan gum is an important food additive due to its functional properties as well as the improvement in several food characteristics. Xanthan is a natural polymer, hydrophilic, produced through sugar fermentation by microorganisms of the genus *Xanthomonas campestris* (9). The main reason for the addition of xanthan to the filmogenic solution was to verify if its characteristics could improve the film functionality.

According to Lai and Padua (10), zein biofilms show good transparency. When plasticizers are added to the matrix, the material becomes more flexible, although some properties can be modified as, for example, increasing opacity (11,12). In order to improve the material characteristics, co-polymerization and different polymeric blends have been produced and characterized (13).

During polymeric material development, a physical mixture of two or more polymers forming a polymeric blend attracted, most of the time, more attention than polymer synthesis. This happened mainly because the combination of polymer properties resulted in materials with different properties that are often better than the individual polymer properties. This process is easier and less expensive than the investigation of new synthetic route. The properties of final polymeric blend depend on the miscibility of the constituents or the morphological structure of each phase in the case of heterogeneous blends (14).

For understanding polymer-polymer miscibility, scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), among other techniques, have been used (15). Material incorporation in the matrix can form a homogeneous or heterogeneous structure depending on their interactions. Optical microscopy (OM) and SEM allow the identification of the material incorporated in the matrix and permit its characterization through the observation of colour and shape.

Other less conventional methods like photoacoustic spectroscopy (PAS) are used, in some cases, to complement usual transmission techniques. These techniques allow a more complete understanding of the material using the properties of transparency and/or heat capacity to characterize the product. The PAS technique uses acoustic signal detection generated by a sample through modulated radiation. The sample is placed in a small chamber with a high definition microphone. Intensity modulated radiation is applied on the sample and the radiation spectrum absorbed is computed (16). The spectroscopy of generalized bidimensional correlation is a technique of simple correlation that permits the access to information not easily visualized with unidimensional spectra. Their spectrum can be analyzed through surface maps, which facilitates the comprehension of the observations (17).

The transparency/opacity of the material shows its capacity to block the light. Low transparency or high opacity, indicates that the material is a good light blocker. Biofilms used as packing or food covering should have high transparency when the characteristics of the packed product have to be visible (18).

The aim of this research is to produce biofilms based on zein with added sorbitan or xanthan gum at different xanthan concentrations, and to determine their morphological and structural characteristics. SEM, OM, FTIR, PAS and transparency/opacity determinations were used to characterize the biofilms.

Materials and Methods

For each treatment, zein-based materials were prepared according to Kleen *et al.* (19), with some adaptations, by dissolving granular zein in a 75 % aqueous ethanol to a concentration of 16 % (by mass per volume) at room temperature. Oleic acid was added at a ratio of 70 g per 100 g of zein, while stirring the solution on a water bath at 60 to 65 °C. Glycerol was added at a ratio of 30 g per 100 g of zein and 0.01 % of sorbitan or four concentrations of xanthan were added. Xanthan concentrations were 0.01, 0.02, 0.03 and 0.04 %, related to the total material. The filmogenic solution was stirred mechanically 10 min and submitted to 20 mHz of ultrasonic frequency (Fisher Scientific®) for another 10 min, after

which they were cast on rectangular acrylic plates and maintained at room temperature (25 °C) for 48 h to dry. After drying, the formed films were peeled off and stored inside the *desiccator* at 58 % relative humidity until analyses.

The thickness of films was determined by the arithmetic mean of six values measured in six randomized points of each sample using a digital micrometer with 0.001 mm resolution (Digimess, Brazil), and the average thickness was (0.12±0.03) mm.

SEM is a common technique for analyzing the microstructure of biodegradable films. This technique has been used for decades to study the global structure of proteins, mainly quaternary conformations (20). For this analysis, film samples of 12 mm diameter were fixed on stubs with double-sided tape with conductive copper and covered with 35 nm of gold (Emitech K550, England). Samples, taken in duplicate, were observed under an electronic microscope (LEO 435 VP, England) at 15 kV in a climatized room.

Optical microscopy was used to identify the formed compounds in films Xylidine ponceau (pH=3.5), which permits the detection of cationic protein radicals (21). Periodic acid-Schiff stain was used to identify neutral polysaccharides and glycoproteins (22). The samples, taken in duplicate, were strained directly without previous fixation and dehydration because of the zein solubility in alcohol solutions, which are used to fix the material. Instead of the fixation by the ethanol-based solution, the glass slides (microscope laminae) were dried in an oven (Odontobras ECB 1.2 Digital, Brazil) at 37 °C for 24 h and mounted with Canada balsam. After 24 h, the samples were analyzed at room temperature with an optical microscope (Olympus BX 60) with an image capture system (Olympus DP 71). Different points in the sample were observed with 10x magnification.

Fourier transform infrared spectroscopy in with attenuated total reflectance accessory (FTIR-ATR) was used as complementary analysis. The infrared spectra were acquired by using a Spectrometer Nicolet Nexus 670 FT-IR ESP. Samples of 7×70 mm were fixed in the ATR and the spectra were recorded in the range from 4000 to 1200 cm⁻¹, with a resolution of 4 cm⁻¹ and 128 scans. This range was used because it encloses amide I and II bands, which are the main portions for protein characterization (23).

The photoacoustic spectroscopy (PAS) data were collected with homemade equipment assembled in the Physics Laboratory of UNESP, São José do Rio Preto, Brasil. The determinations were performed placing the samples in a transparent acrylic support and the readings were done in the UV-VIS range from 200 to 600 nm. Photoacoustic chamber consisted of a steel cylindrical cell with a quartz window and a high sensibility microphone (24).

Film apparent transparency was determined with a UV-VIS spectrophotometer (Quimis, Brazil), as proposed by Gounga *et al.* (25). Samples of rectangular shape were applied to the internal wall of the cuvette. Three replications were done for each film at 600 nm. Film transparency was calculated by dividing the absorbance at 600 nm with the film thickness.

Analysis of variance (ANOVA) was performed considering a randomized experimental design and Tukey's test applied to compare data means at 5 % probability using a computational program ESTAT, v. 2.0, according to Banzatto and Kronka (26).

Results and Discussion

The homogeneity of the samples observed by electron micrographs can be shown in Fig. 1, where it observed that an increase in xanthan concentration promotes changes in the surface of the material, interfering with the distribution of compounds. The control (Fig. 1a) presented the best distribution of fat globules, which is identified by the black points in the picture. Apparently, there was no formation of a continuous layer of the matrix in the other films with various xanthan concentrations. Similar observations of black points on the material surface were found for zein biofilms in the work done by Corradini (27) and Ghanbarzadeh *et al.* (28). The first insight suggests that these points are microbubbles entrapped inside the matrix or spaces occupied by glycerol before the drying process (25). However, there is a possibility of phase separation between zein and glycerol due to the low interaction between these two compounds (27).

Fig. 1

During biofilm formation, difficulties to homogenize the solution were observed as xanthan concentrations increased, mainly 0.03 or 0.04 %, when some lumps appeared as spots in the film. In order to better characterize these lumps, as well as the points found on the surface, optical microscopy was performed to observe the homogeneity through distribution of protein and fat globules.

Figs. 2 and 3 show the images magnified ten times (500 μm) obtained for each xanthan concentration using two kinds of sample preparation: Xylidine ponceau (pH=2.5) and periodic acid- Schiff staining. The red colour represents protein fraction and the white points the fat globules (Fig. 2). As xanthan concentration increases the size of fat globules decreases, enhancing better homogenization of the material into the film matrix in Fig. 3. It can be observed that increasing xanthan concentration resulted in bluer colour of the sample. Fig. 3d

(0.04 % xanthan) shows lower amount of fat globules dispersed, confirming the observations shown in Fig. 2 (Xylidine ponceau staining).

The control sample also presents a slightly purple colour, which indicates that the periodic acid-Schiff reagent stained the hydroxyl radicals of the matrix structure (29).

Fig. 2

Fig. 3

After optical microscopy analyses, it can be concluded that the observations previously considered as porous on SEM image, are indeed fat globules dispersed into the film matrix. Thus it is confirmed that xanthan addition improves homogenization of the compounds mainly with respect to the size and distribution of fat globules.

The chemical structure of xanthan gum and a structural model of zein molecule as proposed by Nery *et al.* (30) and Argos *et al.* (31) and shown in Figs. 4 and 5, help to explain which chemical groups are identified by FTIR-ATR analysis.

Fig. 4

The spokes in Fig. 5 refer to the amino acid side chain directions in the projected helix. The figure shows three polar regions, each composed of two amino acids. The hydrogen-bonding polar residue segments are shown as small circles in Fig. 5, in which Up refers to a helical propagation towards the viewer from the NH₂ to COOH terminus while Dn indicates the opposite direction.

Fig. 5

Fig. 6 presents the results obtained with FTIR-ATR for all biofilms. The spectra were mathematically treated to correct the base line.

Fig. 6

The internal peaks shown in the spectra of the proteins are mainly due to peptide groups. The proteins are in these spectra characterized as amino group peaks, where amide I at 1650 cm⁻¹, amide II at 1540 cm⁻¹ and amide A at 3300 cm⁻¹ can be observed. The amide I peak is the evidence of stretching the C=O linkage from peptide groups. Amide II peak refers to stretching of CN linkage as well as the folding of NH group. Amide A characterized as an intense and wide peak represents the stretching of NH group (32,33). The peaks of amide I and II in the region between 1500 and 1800 cm⁻¹ indicate the predominance of secondary structures α and β (34,35).

In the range from 1500 to 3000 cm⁻¹, where no differences were found among the spectra due to xanthan addition, peaks at 1745 cm⁻¹ were observed corresponding to carboxyl groups. According to some authors (34,35) these groups are probably from free fatty acids.

The bands observed from 2800 to 3100 cm^{-1} indicate CH stretching from functional groups CH_3 and CH_2 , assigning also free fatty acids (36). These bands appear in the commercial zein, probably due to the higher fat residue in the material as compared to the zein extracted in the laboratory.

The principal evidence of xanthan gum is the band centered at 3300 cm^{-1} , as a consequence of stretching of OH linkages, and the band at 1740 cm^{-1} due to C=O stretching from the esterification with pyruvyl (CH-CO-COO) and acetyl (CH-COO), and the glucuronic acid group COOH . The band at 1640 cm^{-1} , related to angular deformations of the sugar OH linkages, occurs in the same region of amide I and proteins, so the distinction among them is difficult (32). The results also indicate the presence of aliphatic compounds (CH) that generate bands with multiple peaks in the region of 2900 to 3000 cm^{-1} (27,37,38).

According to Fig. 6, there were great differences in a wide band at 3300 cm^{-1} . This band is assigned in the vibration combination of NH group from amide A of the zein and also to OH group from xanthan gum. Xanthan addition causes a hypochromic effect in this region, suggesting an interaction between vibrational dipoles from these two groups that causes a decrease of that band. This effect can be better understood through the correlation spectra, capable to identify which chemical groups perform the interactions. Figs. 7 and 8 were obtained through bidimensional infrared analysis, whose main characteristic is to attenuate superposition of spectra with transitions (39-41).

The 2D synchronous spectrum presents simultaneous changes in intensity spectrum and consists of auto-peaks (present in the diagonal line) and cross peaks (located at off-diagonal position). In a 2D synchronous spectrum, negatives cross peaks indicate that the intensity changes observed in two spectral coordinates occur in opposite directions which mean that one increased while the other decreased. A positive cross peak, however, indicates that changes in intensity are in the same direction (42,43).

Fig. 7 shows the main peaks along the diagonal. The first peak at 1710 cm^{-1} represents the vibrations of C=O linkages from carboxyl acids, and the other two peaks at 2850 and 2920 cm^{-1} are assigned to C-H stretching of zein groups.

Fig. 7

The 2D asynchronous spectrum reported about spectral answers that occur out of phase with perturbation pulse. This information is manifested in the form of peaks that are always recorded off the diagonal of the bidimensional space (44,45).

In the asynchronous spectra (Fig. 8), it is observed that the xanthan addition affects first the C=O linkage of amide I group in the region of 1650 cm^{-1} , and then the functional

group N-H of amide II in the region of 1540 cm^{-1} , both from zein, represented by bands with negative intensity. After these groups had been affected, also occurred weak correlations between amides I and II from zein (1650 and 1540 cm^{-1}) with carboxylic acids (1710 cm^{-1}), and CH_3 (2850 cm^{-1}) and CH_2 (2920 cm^{-1}) from aliphatic compounds.

Fig. 8

The PAS with opacity analyses demonstrates the interference of xanthan in the material transparency. The effects of the addition of xanthan and its concentration on the transparency of the material analyzed by PAS in the UV-VIS and opacity tests are shown in the spectrograms presented in Fig. 9.

Fig. 9

The spectra show that in the region of 275 to 350 nm, the increase of xanthan concentration promoted increases in the radiation conversion absorbed as heat. Films with 0 and 0.01 % xanthan presented small peaks in this region. The conversion of maximum radiation occurred in 312 nm.

Table 1

Transparency tests done by UV-VIS spectrometer confirmed the observations of PAS analyses (Table 1). Films with 0.01 % xanthan demonstrated better transparency or lower opacity as shown by the peaks with less intensity in the PAS results. Therefore, the addition of xanthan gum in the polymer matrix decreases the transparency of the material.

Conclusions

It was possible to produce biofilms composed of zein-xanthan gum. The film prepared with 0.04 % of xanthan was visually less homogeneous due to the presence of lumps across the surface. However, after optical microscopy analysis, it can be concluded that the observations previously considered as pores on SEM images are indeed fat globules dispersed into the film matrix. Thus, it is confirmed that xanthan addition improves homogenization of the compounds, mainly with respect to the size and disposition of the fat globules. Infrared spectroscopy (FTIR-ATR) pointed out that xanthan concentrations deeply affected C=O linkages from amide I group, as well as the functional N-H group of amide II of the zein structure. Other weak correlations of amide I and II with carboxylic acids and aliphatic compounds were also observed. PAS analyses as well transparency measurement by spectrophotometry indicated that xanthan addition to the matrix of the film lowers its transparency properties. Overall, the addition of xanthan gum favoured lipid dispersion in the matrix, making the biofilms more homogeneous, although less transparent.

Acknowledgements

The authors are grateful for financial support provided by FAPESP (São Paulo Research Agency) by a grant no. 2005/02407-4 and 2006/01775-2. C.B.A. thanks CAPES Brazilian agency for fellowship.

References

1. N. Cao, Y. Fu, J. He, Preparation and physical properties of soy proteins isolate and gelatin composite films, *Food Hydrocolloids*, 21 (2007) 1153-1162.
2. A. Esen, A proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays L.*), *J. Cereal Sci.* 5 (1987) 117-128.
3. R. Regina, O. Solferini, Production of cultivars of ingredients with high nutritional value: characteristics and benefits, *Proceeding of the Symposium on... Symposium on ingredients in animal feed*, Uberlândia, MG, Brazil (2002) pp.105-116 (in Portuguese).
4. B.A. McGowan, S.Y. Lee, Comparison of methods to analyze time-intensity curves in a corn zein chewing gum study, *Food qual. prefer.* 17 (2006) 296-306.
5. H.M. Lai, G.W. Padua, Properties and microstructure of plasticized zein films, *Cereal Chem.* 74 (1997) 771-775.
6. A.N. Moreira, F.A.B. Del Pino, C.T. Vendruscolo, Study on the biopolymer production by enzymatic pathway through cellular inactivation and lyse and with viable cells by *Beijerinckia sp. 7070*, *Cienc. Tecnol. Aliment.* 23 (2003) 300-305 (in Portuguese).
7. F.M. Maugeri Filho: Production of Polysaccharides. In: U.A. Lima, E. Aquarone, W. Borzani, W. Schmidell, *Biotec. Ind.* 3 (2001) 593 (in Portuguese).
8. E.R. Morris: Polysaccharide Rheology and in Mouth Perception. In: *Food Polysaccharides and Their Applications*, A.M. Stephen, Marcel Dekker, New York, USA (1995) pp. 517-546.
9. N. Lagoueyte, P. Paquin, Effects of microfluidization on the functional properties of xanthan gums, *Food Hydrocolloids*, 12 (1998) 365-371.
10. H.M. Lai, G.W. Padua, Water vapor barrier properties of zein films plasticized with oleic acid, *Cereal Chem.* 75 (1998) 194-199.
11. K. Yamada, H. Takahashi, A. Noguchi, Improved water resistance in edible zein films and composites for biodegradable food packaging, *Int. J. Food Sci. Technol.* 30 (1995) 599-608.
12. H.J. Park, M.S. Chinnan, Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials, *J. Food Eng.* 25 (1995) 497-507.

13. T. Ohnaga, T. Sato, S. Nagata, Miscibility and phase-behavior of methyl methacrylate copolymer and polycarbonate blends, *Polymer*, 38 (1997) 1073-1079.
14. D.T.D.F. Rosa, Optical and thermal characterization of polymeric materials by photothermal methods, *PhD Thesis* University of Maringá, Maringá, Brazil (2005) (in Portuguese).
15. D.R. Paul, S. Newman: *Polymer Blends*, Vol. 2, Academic Press, New York, USA (1978).
16. E. Da Costa Mattos, I. Vigano, R.C.L. Dutra, Application of FTIR methodologies of transmission and photoacoustic to the characterization of highly energetic materials: Part II, *Quím. Nova*, 25 (2002) 722-728 (in Portuguese).
17. C.F. Pereira, C. Pasquini, Two-dimensional correlation spectroscopy: Fundamentals, applications and perspectives, *Quím. Nova*, 29 (2006) 143-148 (in Portuguese).
18. L. Yang, A.T. Paulson, Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film, *Food Res. Int.* 33 (2000) 571-578.
19. D. Kleen, G. Padua, N. Engeseth, Stabilization of lipids in a biodegradable zein-oleate film by incorporation of antioxidants, *Cereal Chem.* 79 (2002) 687-694.
20. L.A. Forato, Study of structures of zein by NMR, FTIR and MFA, *PhD Thesis*, University of São Paulo, São Paulo, Brazil (2000) (in Portuguese).
21. B.C. Vidal, Dichroism in collagen bundles stained with xylydine ponceau 2R, *Ann. Histoc.* 15 (1970) 289-296.
22. A.G.E. Pearse, *Histochemistry, Theoretical and Applied: Preparative and Optical Technology*, Vol. 1, Churchill Livingstone Edinburgh, UK (1980) 439.
23. D.M.R. Georget, S.A. Barker, P.S. Belton, A study on maize proteins as a potential new tablet excipient, *Eur. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 718-726.
24. M.R. Bugs, R.K. Bortoleto-Bugs, M. Lopes Cornélio, Photoacoustic spectroscopy of aromatic amino acids proteins, *Eur. Biophys. J.* 37 (2008) 205-212.
25. M.E. Gouna, S.Y. Xu, Z. Wang, Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation, *J. Food Eng.* 83 (2007) 521-530.
26. D.A. Banzatto, S.N. Kronka: *Agricultural Experimentation*, FUNEP, Jaboticabal, Brazil, (2006) (in Portuguese).
27. E. Corradini, Development of polymeric blends of corn starch and zein, *PhD Thesis*, University of São Paulo, São Carlos, Brazil (2004) (in Portuguese).

28. B. Ghanbarzadeh, M. Musavi, A.R. Oromiehie, K. Rezayi, E.R. Rad, J. Milani, Effect of plasticizing sugars on water vapor permeability, surface energy and microstructure properties of zein films, *LWT-Food Sci. Technol.* 40 (2007) 1191–1197.
29. J.D. Bancroft, A. Stevens: *Theory and Practice of Histological Techniques*, Churchill Livingstone, Edinburgh, UK (1990) pp.187-189.
30. T.B.R. Nery, L.V. Brandão, M.C.A. Esperidião, J.I. Druzian, Biosynthesis of xanthan gum from the fermentation of milk whey: Productivity and viscosity, *Quím. Nova*, 31 (2008) 1937-1941 (in Portuguese).
31. P. Argos, K. Pedersen, M.D. Marks, B.A. Larkins, A structural model for maize zein proteins, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 9984-9990.
32. D. Osiro, H.D. Coletta Filho, M.A. Machado, L.A. Colnago, Use of FTIR to the analysis of bacteria that cause citrus cancer and CVC, EMBRAPA, São Carlos, Brazil (2000) pp. 1-5 (in Portuguese).
33. D. Osiro, L.A. Colnago, A.M.M.B. Otoboni, E.G.M. Lemos, A.A. de Souza, H.D. Della Coletta Filho, M.A. Machado, A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence, *FEMS Microbiol. Lett.* 236 (2004) 313-318.
34. L.A. Forato, R. Bernardes-Filho, L.A. Colnago, Protein structure in KBr pellets by infrared spectroscopy, *Anal. Biochem.* 259 (1998) 136-141.
35. L. Marcotte, G. Kegelaer, C. Sandt, J. Barbeau, M. Lafleur, An alternative infrared spectroscopy assay for the quantification of polysaccharides in bacterial samples, *Anal. Biochem.* 361 (2007) 17-47.
36. L.A. Forato, T.C. Bicudo, L.A. Colnago, Conformation of α zeins in solid state by Fourier transform IR, *Biopolymers*, 72 (2003) 421–426.
37. L.A. Forato, V.E. Yushmanov, L.A. Colnago, Interaction of two prolamins with 1-¹³C oleic acid by ¹³C NMR, *Biochemistry*, 43 (2004) 7121-7126.
38. D.M.R. Georget, S.A Barker, P.S. Belton, A study on maize proteins as a potential new tablet excipient, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 718-726.
39. R.M. Silverstein, G.C. Bassler, T.C. Morrill: *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, New York, USA (1974) p. 424.
40. J.A. Scramim, D. Britto, O.B.G. Assis, L.A. Colnago, L.A. Forato, Surface wetting and DMA characterization of zein/oleic acid based films, *Proceedings of the XI International Macromolecular Colloquium and 6th ISNAPOL*, Gramado, Brazil (2007).
41. I. Noda, A.E. Dowrey, C. Marcoli, G.M. Story, Y. Ozaki, Generalized two-dimensional correlation spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* 54 (2000) 236A-248A.

42. I. Noda, two-dimensional infrared (2D IR) spectroscopy: Theory and applications, *Appl. Spectrosc.* 44 (1990) 550-561.
43. I. Noda, Generalized two-dimensional correlation method applicable to infrared, raman, and other types of spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* 47 (1993) 1329-1336.
44. D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, Thomson Learning, USA, (2002) p. 434.
45. H. Fabian, H.H. Mantsch, C.P. Shultz, Two-dimensional IR correlation spectroscopy: Sequential events in the unfolding process of the Cro-V55C repressor protein, *PNAS.* 96 (1999) 13153-13158.

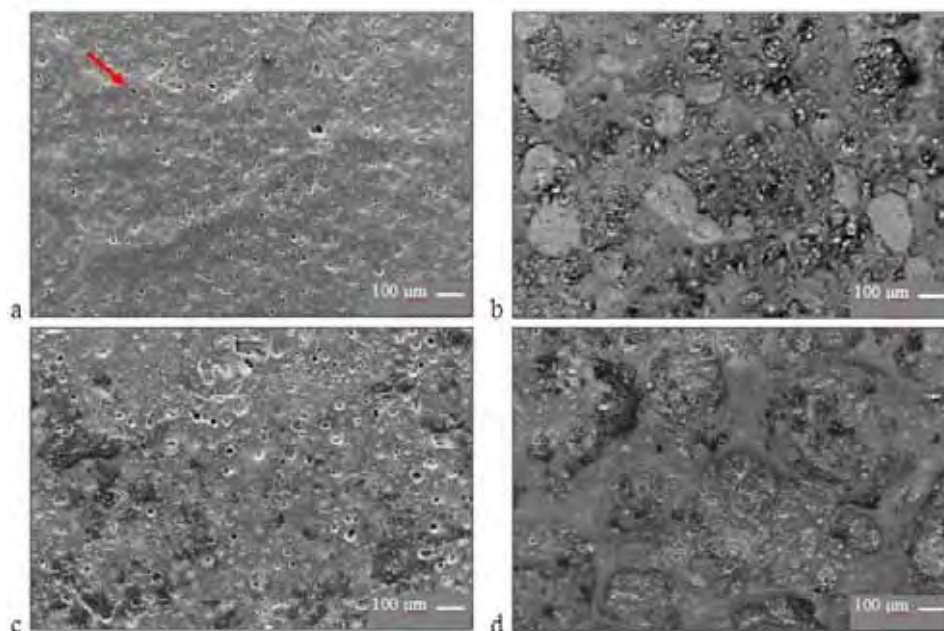


Fig. 1. Scanning electron micrographs of zein-xanthan biofilms: a) 0 % xanthan (control), b) 0.01 % xanthan, c) 0.02 % xanthan, d) 0.04 % xanthan

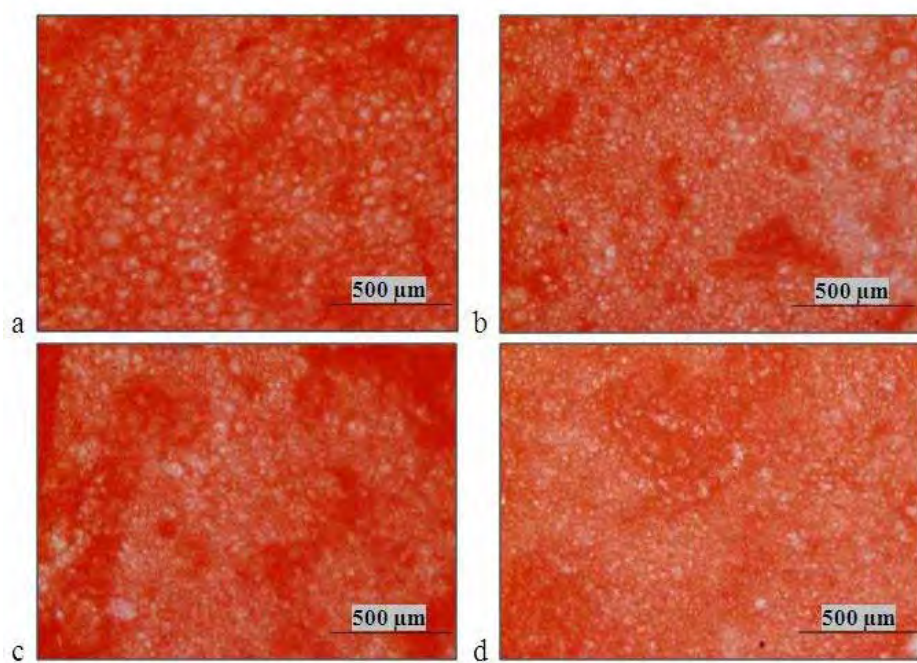


Fig. 2. Optical microscopy with Xylidine ponceau (pH=2.5) stain for zein-xanthan biofilms: a) 0 % xanthan (control), b) 0.01 % xanthan, c) 0.03 % xanthan, d) 0.04 % xanthan

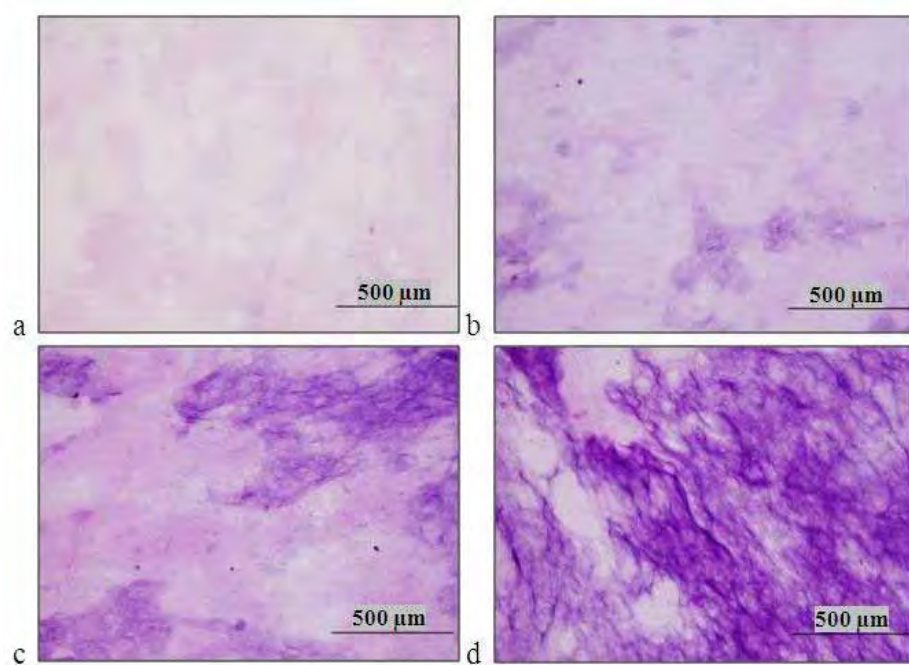


Fig. 3. Optical microscopy with Periodic acid-Schiff stain for zein-xanthan biofilms: a) 0 % xanthan (control), b) 0.01 % xanthan, c) 0.03 % xanthan, d) 0.04 % xanthan

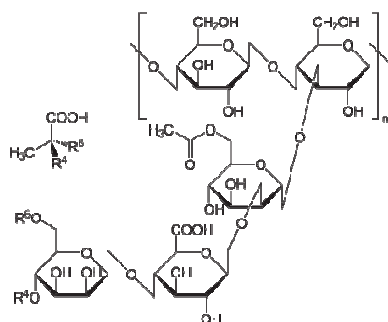


Fig. 4. Chemical model of xanthan gum (30)

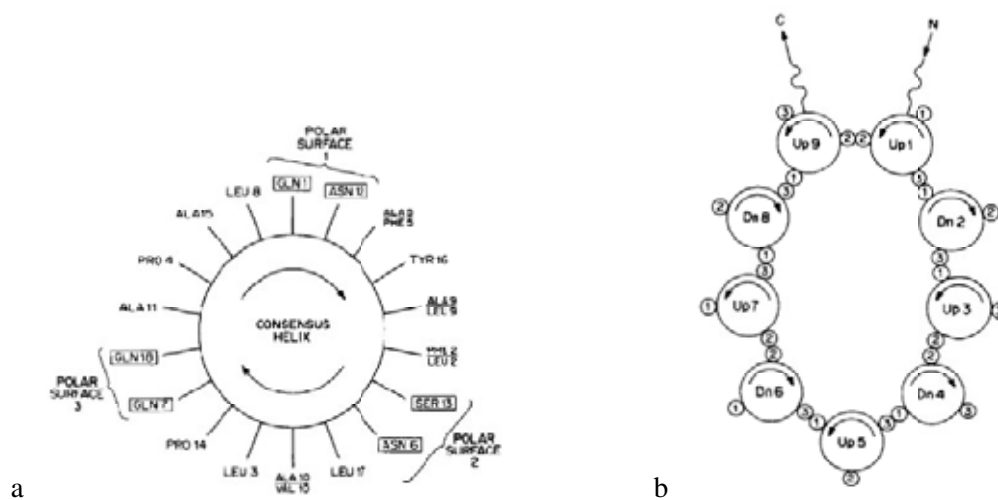


Fig. 5. Structural model of zein molecule: a) Helical wheel for 18-residue repeat sequence in Z19 and Z22 zein type; b) A possible nine-helical zein protein structural model. ALA, LEU....are initial letters of amino acids. Z19 and Z22 refer to zein with molecular weight of 19,000 and 22,000 respectively. Up refers to a helical propagation towards the viewer from the NH₂ to COOH terminus while Dn indicates the opposite direction (31)

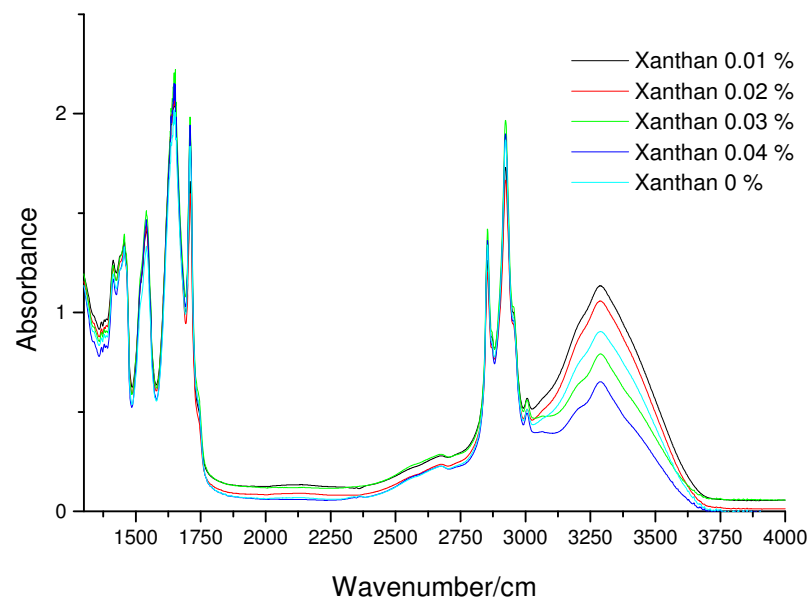


Fig. 6. FTIR-ATR spectra for zein-xanthan biofilms

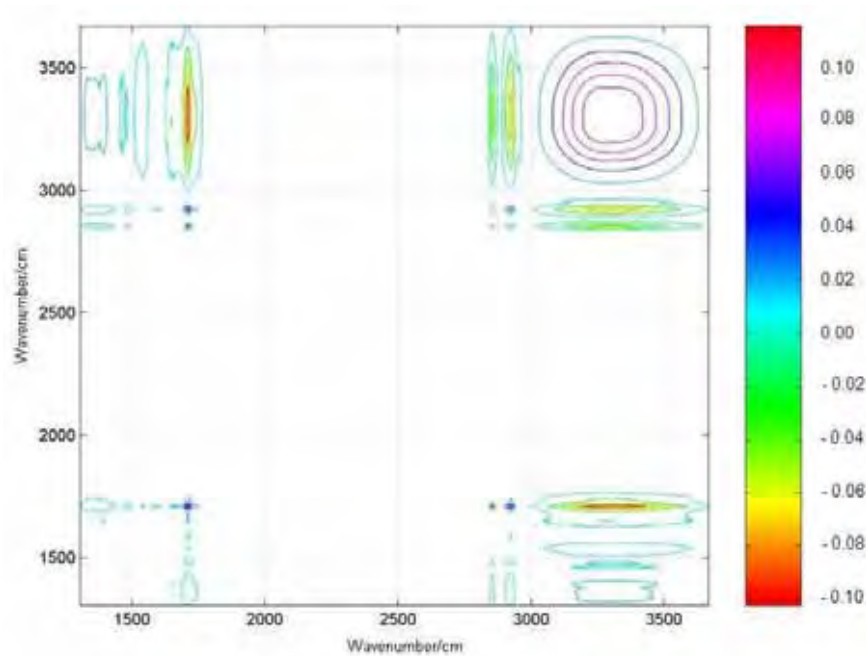


Fig. 7. Synchronous spectra of zein showing functional groups affected by xanthan addition

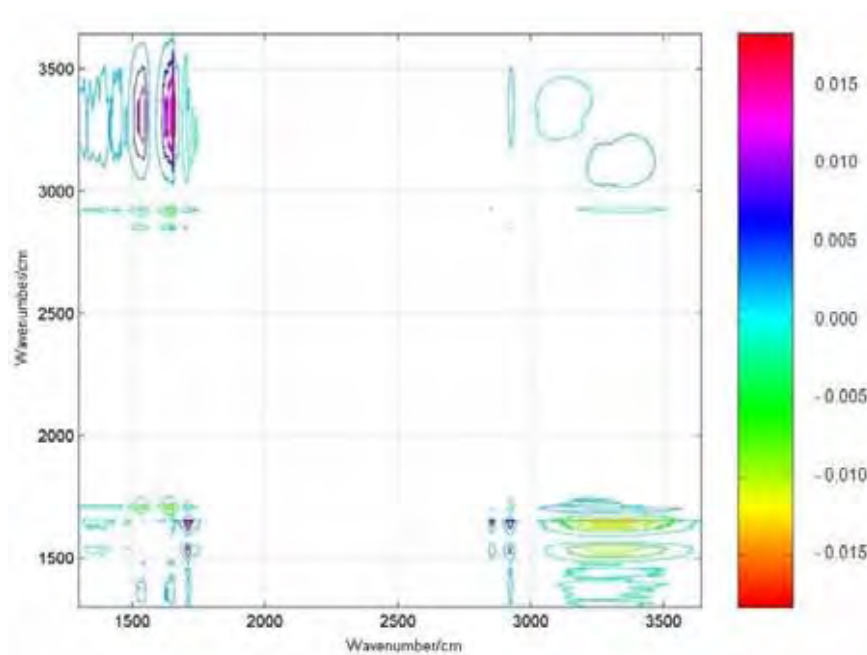


Fig. 8. Asynchronous spectra of zein showing functional groups affected by xanthan addition

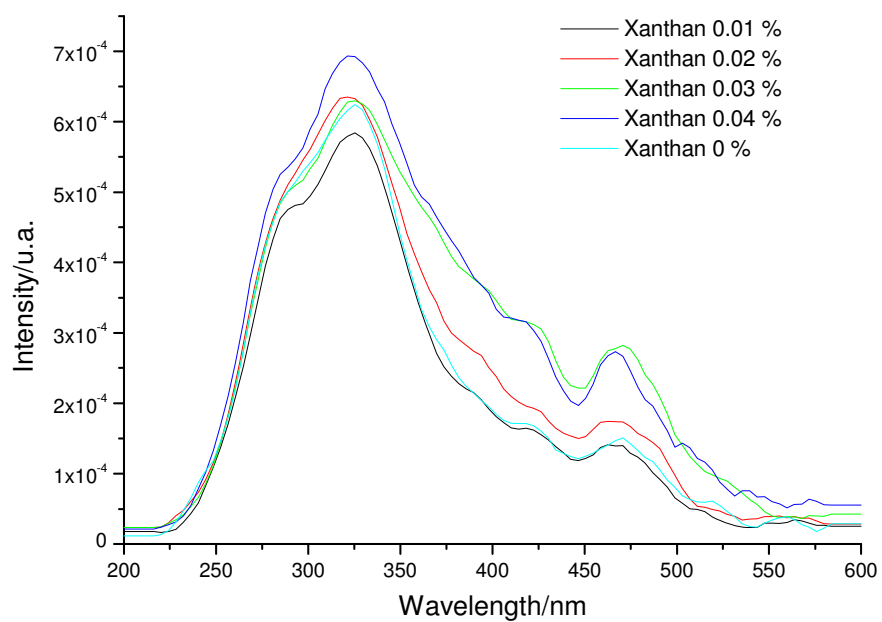


Fig. 9. Photoacoustic spectra of zein-xanthan biofilms

Table 1. Transparency of the zein-xanthan biofilms obtained by UV-VIS spectrometry

Material	$A_{600\text{ nm}}$	Transparency
zein+sorbitan	0.963±0.04	(7.570±0.29) ^b
zein+xanthan 0.01 %	0.822±0.08	(9.605±0.95) ^a
zein+xanthan 0.02 %	0.811±0.03	(7.277±0.26) ^b
zein+xanthan 0.03 %	0.623±0.09	(7.624±1.13) ^b
zein+xanthan 0.04 %	0.869±0.04	(5.565±0.30) ^c

^{a,b,c} Means followed by the same letter in each column are not different according to Tukey's test (p<0.05)

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 20/01/2011

Assinatura