

KLEBER LUÍS WOLF

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MECÂNICAS DE BIOFILMES
ELABORADOS A PARTIR DE FIBRA E PÓ DE COLÁGENO**

São José do Rio Preto – SP

2007

KLEBER LUÍS WOLF

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MECÂNICAS DE BIOFILMES
ELABORADOS A PARTIR DE FIBRA E PÓ DE COLÁGENO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de São José de Rio Preto, para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos (Área de concentração: Engenharia de Alimentos).

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Regina Nicoletti Telis

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral

São José do Rio Preto – SP

2007

Wolf, Kleber Luís.

Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra e pó de colágeno / Kleber Luís Wolf. - São José do Rio Preto : [s.n], 2007.

101 f. : il ; 30 cm.

Orientador: Vânia Regina Nicoletti Telis

Co-orientador : Paulo José do Amaral Sobral

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de

Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Colágeno. 2. Biofilme. 3. Colágeno – Fibras. 4. Alimentos - Embalagens. 5. Reforço – Materiais. I. Telis, Vânia Regina Nicoletti. II. Sobral, Paulo José do Amaral. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 547.962.9

KLEBER LUÍS WOLF

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MECÂNICAS DE BIOFILMES
ELABORADOS A PARTIR DE FIBRA E PÓ DE COLÁGENO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de São José de Rio Preto, para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos (Área de concentração: Engenharia de Alimentos).

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Vânia Regina Nicoletti Telis
(Presidente / Orientadora - DETA/UNESP)

Prof. Dr. Fábio Yamashita
(2º Examinador – DCTA/UEL)

Prof. Dr. José Francisco Lopes Filho
(3º Examinador – DETA/IBILCE/UNESP)

São José do Rio Preto, 26 de Fevereiro de 2007.

DADOS CURRICULARES

KLEBER LUÍS WOLF

- NASCIMENTO** 12/12/1980 – Campinas – SP
- FILIAÇÃO** Renato José Wolf
Elza Rafaela Beccari Wolf
- 2000 a 2004** Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, Campus de São José do Rio Preto – SP
- 2005 a 2007** Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, nível Mestrado, no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, Campus de São José do Rio Preto – SP.

À Natália, com todo amor.

AGRADECIMENTOS

Sou muito grato à minha Orientadora Professora Vânia e ao meu Co-Orientador Professor Sobral pela oportunidade que tive em trabalhar com esses dois ícones da pesquisa acadêmica, e, principalmente, pelo aprendizado adquirido durante este projeto.

Agradeço aos meus amigos e colegas dos laboratórios em que trabalhei que sempre proporcionaram um ambiente agradável e que estiveram dispostos a qualquer tipo de apoio, em especial à Professora Rose da USP de Pirassununga, que colaborou com a parte da microscopia e à Mônica por ter me ajudado em algumas análises.

Também agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por acreditar e fomentar a pesquisa nacional e à empresa NOVAPROM FOOD INGREDIENTS Ltda. que forneceu a matéria-prima para o desenvolvimento dos filmes.

Agora chegamos onde as palavras são insuficientes para descrever tamanho agradecimento. Eu nunca conseguiria expressar os limites de minha gratidão. Elza, Renato, Kendji, Christian e Natália, apesar de serem apenas duas palavras, saibam que elas tentam resumir (se isso é possível), de coração, tudo o que não consigo escrever: **MUITO OBRIGADO!**

*“Alguns buscam na ciência a lógica imaculada;
outros, o deslumbramento espiritual”*

Autor desconhecido

RESUMO

O desenvolvimento de novos materiais é uma área de pesquisas que ganha cada vez mais importância nos meios acadêmicos e industriais. Essa área de pesquisa é vital para a adequação dos materiais existentes às necessidades de aplicação, pois estas estão em constante mudança. O desenvolvimento de biofilmes exige a disponibilidade de um composto - normalmente um hidrocolóide - que possua a propriedade de formar uma matriz filmogênica. O colágeno de origem bovina possui tal propriedade e, por ser abundante no Brasil, é uma matéria-prima interessante para a produção de biofilmes. Por outro lado, para melhorar as características mecânicas e de barreira à umidade dos filmes finais, além do hidrocolóide principal, em geral são adicionadas outras substâncias à matriz filmogênica. O objetivo desse trabalho foi caracterizar física e quimicamente as fibras e pó de colágeno, obtidos a partir de pele bovina, como matérias-primas potencialmente formadoras de filme, bem como avaliar a influência das proporções de fibra e pó de colágeno usadas nas propriedades dos filmes. Nesse sentido, para as matérias-primas, foram realizadas as seguintes análises: composição centesimal, solubilidade em água, isotermas de sorção de água, aminograma, granulometria, calorimetria diferencial de varredura, espectroscopia de infravermelho e reologia da solução filmogênica. A fibra e o pó de colágeno apresentam, praticamente, o mesmo teor de proteína em sua composição e a diferença entre eles, além do formato, aparece na solubilidade em água, que se supõe ser, em parte, devida à diferença de tamanho entre as partículas. Na caracterização dos filmes, realizaram-se testes de tração, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água, determinação de cor e opacidade e microscopia. Neste caso, a fibra atuaria como um compósito de reforço na matriz filmogênica, com a peculiaridade de se tratar de um sistema onde o polímero e o compósito são de mesma natureza. De um modo geral, a fibra aumentou a resistência à ruptura dos filmes formados, diminuiu a solubilidade e a permeabilidade ao vapor de água e aumentou a opacidade.

Palavras-chaves: biofilmes, colágeno, fibra, compósito reforço.

ABSTRACT

The development of new materials is a research area that has received increasing importance in the academic and industrial. This research area is vital for adaptation of existent materials to application needs, since they are in constant change. The biofilms development demands the availability of a material - usually a hydrocolloid - that possesses the property of forming a filmogenic matrix. The collagen of bovine origin possesses such property and, for being abundant in Brazil, it is an interesting raw material for edible and biodegradable films production. On the other hand, in order to improve the mechanical and water vapor barrier characteristics of the final films, in addition to the main hydrocolloid, other substances are generally added to the film forming solution. The objective of this work was to determine the physical and chemical characteristic of collagen fibers and powder, obtained from bovine skin, as potentially film forming raw materials. The following analyses were accomplished: centesimal composition, solubility in water, water sorption isotherms, aminogram, size distribution, differential scanning calorimetric, FTIR and rheology of the filmogenic solution. The collagen fiber and powder present practically the same protein content and in addition to particles shape the main difference between them, appears in the solubility in water that is supposed to be, partly, due to the size difference between fiber and powder particles. The characterization was accomplished by traction tests and the measurement of solubility and water vapor permeability, color and opacity as well as by microscopy. The objective was evaluating the influence of collagen fiber and powder proportions on the films. In this case, fibers could act as reinforcement composite to the film forming matrix, with the peculiarity of being a system where the polymer and the composite are of the same nature. In a general way, fibers addition increased films resistance to rupture, reduced their solubility and water vapor permeability and increased their opacity.

Key words: biofilms, collagen, fiber, powder, reinforcement composites.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1 -	Esquema do equipamento utilizado para teste de permeabilidade ao vapor de água.	26
Figura 2 -	Esquema da organização das moléculas que resulta no aspecto estriado das fibras de colágeno. Os peptídeos –N e –C são representados como círculos.	35
Figura 3 -	Representação molecular da hidroxiprolina.	36
Figura 4 -	Fibra de colágeno vista num microscópio com objetiva de aumento de 4X.	37
Figura 5 -	Fibra de colágeno numa objetiva de aumento de 20X.	37
Figura 6 -	Representação das estruturas que formam a fibra de colágeno.	38
Figura 7 -	Solubilidade em água (g de proteína solúvel/ 100g de colágeno total na suspensão), do pó e fibra de colágeno.	56
Figura 8 -	Termogramas do colágeno em pó: A) pH natural, B) pH 3,0.	57 58
Figura 9 -	Isotermas de adsorção de vapor de água da fibra e do pó de colágeno.	59
Figura 10 -	A. Relação entre atividade de água e temperatura absoluta da fibra de colágeno. B. Relação entre atividade de água e temperatura absoluta do pó de colágeno.	61 61
Figura 11 -	Influência da umidade no calor de sorção da fibra e do pó de colágeno.	62
Figura 12 -	Distribuição granulométrica da fibra de colágeno.	63
Figura 13 -	Fração mássica da fibra de colágeno.	64
Figura 14 -	Ajuste da função Rosin-Rammler aos dados experimentais de granulometria.	64
Figura 15 -	Espectro de absorção de infravermelho do colágeno.	65

Figura 16 -	Figura 16. Comportamento reológico da solução formadora de filme em função da concentração de fibra: A) 0% de fibra (g/ 100 g de colágeno); B) 25% de fibra (g / 100 g de colágeno); C) 50% de fibra (g / 100 g de colágeno); D) 75% de fibra (g/ 100 g de colágeno).	67
Figura 17 -	Variação do índice de consistência (k) da solução formadora de filme em função da concentração de fibra de colágeno (g/ 100 g de colágeno na solução).	68
Figura 18 -	Variação do índice de comportamento (n) da solução formadora de filme em função da concentração de fibra de colágeno (g/ 100 g de colágeno na solução).	69
Figura 19 -	Imagens dos filmes de colágeno: a) 0% de fibra b) 50 % de fibra c) 100% de fibra.	70
Figura 20 -	Espessuras dos filmes de acordo com a quantidade de solução filmogênica aplicada.	71
Figura 21 -	Quantidade de matéria seca por cm ² dos filmes.	72
Figura 22 -	Curvas típicas dos resultados do teste de tração dos filmes de colágeno: a) 0%; b) 10%; c)20%; d) 30%; e) 40%; f) 50%.	73
Figura 23 -	Resultado do teste de tração dos filmes de colágeno em função da variação da concentração de fibra.	74
Figura 24 -	Resultado do teste de alongação dos filmes de colágeno em função da concentração de fibra.	75
Figura 25 -	Módulo de elasticidade dos filmes de colágeno.	76
Figura 26 -	Solubilidade dos filmes de colágeno em função da concentração de fibra.	77
Figura 27 -	Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de colágeno.	78
Figura 28 -	Permeância ao vapor de água dos filmes de colágeno.	79
Figura 29 -	Espectros padrões dos resultados do teste de cor dos filmes de colágeno. STD=Padrão; S6=0%; S5=10%; S4=20%; S3=30%; S2=40%; S1=50%.	81
Figura 30 -	Imagem da superfície do filme 0% num aumento de 50X.	82
Figura 31 -	Imagem da superfície do filme 10% num aumento de 50X.	82

Figura 32 -	Imagem da superfície do filme 30% num aumento de 50X.	83
Figura 33 -	Imagem da superfície do filme 50% num aumento de 50X.	83
Figura 34 -	Imagem de um grumo de colágeno na superfície de um filme num aumento de 50X.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Tabela 1 -	Esquema do equipamento utilizado para teste de permeabilidade ao vapor de água.	39
Tabela 2 -	Relação dos sais e respectivas atividades de água utilizadas para determinação das isotermas de adsorção.	44
Tabela 3 -	Valores das aberturas das peneiras utilizadas para determinação granulométrica.	46
Tabela 4 -	Composição centesimal da fibra e do pó de colágeno.	53
Tabela 5 -	Resultado do aminograma do colágeno.	54
Tabela 6 -	A. Parâmetros da equação de GAB para o pó. B. Parâmetros da equação de GAB para a fibra.	60 60
Tabela 7 -	Resultados da análise granulométrica da fibra de colágeno.	63
Tabela 8 -	Representações das bandas do espectro de infravermelho do colágeno.	66
Tabela 9 -	Parâmetros reológicos da Lei da Potência da solução formadora de filme em função da concentração de fibra de colágeno (g de fibra/ g de colágeno na solução).	68
Tabela 10 -	Equação das retas de índice de consistência (k) e comportamento (n) em função da concentração de fibra de colágeno na solução filmogênica.	69
Tabela 11 -	Resultado do teste de cor e opacidade dos filmes de colágeno.	80

LISTA DE SÍMBOLOS

- Δa^* , variação da escala cromática de verde (-) ao vermelho (+).
 Δb^* , variação da escala cromática do azul (-) ao amarelo (-).
 ΔE^* , diferença de cor.
 ΔH_{VAP} , calor de vaporização (kJ/ mol).
 $\Delta l/l_0$, deformação na ruptura (%).
 ΔL^* , variação da escala cromática do preto (0) ao branco (100).
 Δp , diferencial de pressão de vapor da água através do filme (Pa).
 Φ , diâmetro da célula de teste (m).
 ϵ , a elongação máxima (%).
 σ , tensão máxima de ruptura (MPa).
 σ^* , tensão máxima específica (Nm/g).
 σ_C , tensão de cisalhamento (Pa).
 $\dot{\gamma}$, taxa de deformação (s^{-1}).
 γ , deformação resultante.
 a , área exposta do filme (m^2).
 a_w , atividade de água.
 c , gradiente de concentração do penetrante.
 C , constante de GAB relacionada à monocamada.
 D , deslocamento (m).
 D_m , difusividade mássica (m^2/s).
 E , módulo de Young (MPa).
 E^* , módulo de Young específico (KN m/g).
 F , resistência à ruptura (Pa).
 J , quantidade de penetrante difundindo através do filme por unidade de área por unidade de tempo.
 k , índices de consistência (Pa.s).
 K , constante de GAB relacionada à multicamada.
 m_f , massa final da amostra (g).
 m_i , massa inicial da amostra (g).
 MS , material solubilizado (%).
 n , índice de comportamento (adimensional).
 N , dispersão (mm).
 p , pressão parcial do penetrante no ar adjacente (Pa).
 P , permeabilidade ($g \cdot mm \cdot h^{-1} \cdot m^{-2} \cdot Pa^{-1}$).
 p_{A0} , pressão de vapor (Pa).
 q_{st} , calor isostérico líquido de sorção (kJ/mol).
 Q_{st} , calor isostérico de sorção (kJ/mol).
 R , constante universal dos gases (kJ/ mol K).
 T , temperatura absoluta (K).
 UR = umidade relativa (%).
 x , espessura média de cada biofilme (mm).
 X , umidade de equilíbrio (b.s.).
 X_m , conteúdo de umidade (b.s.).
 X_r , diâmetro médio da fibra (mm).

SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO 16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
2.1	Biofilmes 19
2.2	Componentes dos filmes 21
2.3	Formação e Métodos de Aplicação do Filme 22
2.4	Propriedades dos Filmes 23
2.4.1	<i>Permeabilidade ao vapor de água</i> 23
2.4.2	<i>Propriedades mecânicas</i> 27
2.4.3	<i>Solubilidade</i> 28
2.4.4	<i>Isotermas de sorção de vapor de água</i> 29
2.4.5	<i>Reologia</i> 31
2.5	Biofilmes a base de proteínas 32
2.6	Colágeno 33
2.6.1	<i>Estrutura do colágeno</i> 37
2.6.1.1	Composição e distribuição de aminoácidos 37
2.6.1.2	Solubilidade, elasticidade e propriedade de absorção de água do colágeno 39
2.6.2	<i>Geleificação protéica</i> 40
3	OBJETIVOS 42
3.1	Objetivo geral 42
3.2	Objetivos Específicos 42
4	MATERIAIS E MÉTODOS 43
4.1	Matéria-prima 43
4.1.1	<i>Composição Centesimal</i> 43
4.1.2	<i>Solubilidade</i> 43
4.1.3	<i>Isotermas de sorção de vapor de água</i> 44
4.1.4	<i>Aminograma</i> 45
4.1.5	<i>Granulometria</i> 45
4.1.6	<i>Análise térmica</i> 47

4.1.7	<i>Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	47
4.1.8	<i>Reologia da Solução Filmogênica</i>	47
4.2	Produção e caracterização dos filmes	48
4.2.1	<i>Solubilidade dos Filmes</i>	49
4.2.2	<i>Propriedades de Tensão e Elasticidade</i>	50
4.2.3	<i>Propriedades de Barreira à Umidade</i>	50
4.2.4	<i>Cor e opacidade</i>	51
4.2.5	<i>Microscopia</i>	51
4.3	Análise Estatística	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	Composição centesimal da fibra e do pó de colágeno	53
5.2	Aminograma	53
5.3	Solubilidade do pó e da fibra de colágeno	55
5.4	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	56
5.5	Isotermas de sorção de vapor de água	58
5.6	Granulometria	62
5.7	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	65
5.8	Reologia da solução filmogênica	67
5.9	Filmes	69
5.9.1	<i>Espessura média e umidade</i>	70
5.9.2	<i>Tração</i>	73
5.9.3	<i>Solubilidade</i>	76
5.9.4	<i>Permeabilidade ao vapor de água (PVA)</i>	77
5.9.5	<i>Cor e opacidade</i>	80
5.9.6	<i>Microscopia</i>	81
6	CONCLUSÕES	86
6.1	Sugestões para Trabalhos Futuros	87
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
	ANEXOS	100

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos materiais é uma área de pesquisa que ganha cada vez mais importância nos meios acadêmicos. Essa área é vital para a adequação dos materiais existentes às necessidades que são submetidas, pois estas estão sempre em constante mudança. Preocupados com a questão ambiental, alguns pesquisadores estão mudando seu foco e se concentrando no progresso de materiais elaborados a partir de compostos biodegradáveis.

Um exemplo concreto de aplicação que tem sido muito pesquisado nesta área é o biofilme. Inúmeras pesquisas são relatadas ressaltando a importância da sua utilização (JONGJAEONRAK et al., 2006; DAVANÇO, 2006; MECITOĞLU et al., 2005; FAMÁ et al., 2004; THOMAZINE et al., 2005), sendo as indústrias alimentícias as grandes interessadas nessas embalagens, principalmente devido à sua biodegradabilidade e ao fato de poderem ser produzidas a partir de biopolímeros renováveis como proteínas e polissacarídeos (KROCHTA; MULDER-JOHNSTON, 1997).

Filme comestível é definido como uma camada fina e contínua, de um material comestível, o qual pode estender a vida útil e melhorar a qualidade da maioria dos alimentos, servindo como uma barreira aos danos mecânicos e à transferência de massa (McHUGH, 2000).

Os biofilmes são utilizados como um material de reforço aos alimentos, melhorando suas propriedades mecânicas, sendo necessárias menos embalagens para acondicioná-los, aumentando, assim, a eficiência econômica de materiais (KESTER; FENNEMA, 1986).

Os materiais mais utilizados para a elaboração de filmes são misturas de lipídeos, proteínas, carboidratos, plasticizantes, surfactantes, aditivos e solventes (AMARANTE; BANKS, 2001), sendo necessário, pelo menos, um biopolímero que tenha a capacidade de formar uma matriz contínua, homogênea e coesa (GONTARD; GUILBERT, 1996). Para a formação desta matriz, as proteínas apresentam a característica de possuírem em sua estrutura até 20 monômeros diferentes (aminoácidos), com um alto potencial de ligações intermoleculares (GUILBERT; GRAILLE, 1995). Além disso, as proteínas são capazes de formar estruturas tridimensionais amorfas, estabilizadas principalmente por interações não covalentes (CUQ et al., 1998).

Geralmente, biofilmes a base de proteínas apresentam propriedades mecânicas (resistência e principalmente flexibilidade) de considerável qualidade e baixa resistência ao transporte de vapor de água e gases. Estudos sobre filmes de gelatina foram propostos para a preservação de carnes e de outros produtos alimentícios com base nessas propriedades (HARVARD; HARMONY, 1869 e MORRYS; PARKER, 1895, apud KROCHTA, 1994).

O colágeno possui uma gama de aplicações industriais, sendo normalmente utilizado em produtos cárneos, farmacêuticos, de panificação, como complemento alimentar, em alimentos funcionais e como espessante para molhos e bebidas. Estudos mostram que essa proteína também já foi utilizada para a elaboração de filmes biodegradáveis, como por exemplo, envoltórios de embutidos cárneos desenvolvidos pelo método de extrusão (HOOD, 1987), e análises das propriedades de filmes de colágeno misturados com gelatina (ARVANITOYANNIS, 1999).

Também devido à sua vasta aplicabilidade, a produção mundial de colágeno e/ ou gelatina possui números impressionantes. Anualmente são produzidos cerca de 296 toneladas de gelatina, o que dá um faturamento superior à 1 bilhão de euros. Desse total de gelatina produzido, 68% são gelatina comestível, 24% são destinados a fotos ou aplicações especiais e 8% para microcápsulas. As matérias-primas dessas gelatinas podem ser provenientes da pele, ossos e tendões de porcos, bois e peixes. De toda a gelatina produzida no mundo, 28% é proveniente do colágeno da pele bovina, o que dá cerca de 83 toneladas de colágeno sendo produzidas por ano (GELITA, 2007).

A extração do colágeno pode ser realizada de tal forma que se obtenha a fibra, e seu sub-produto, o pó, ambos em estado bruto e com a mesma composição. Com esse tipo de extração, o colágeno pode apresentar características desejáveis para a sua utilização em biofilmes, já que possui uma disposição física alongada e uma maior granulometria. Além disso, pelo fato de provir da região cutânea do boi, é esperado que o colágeno apresente uma porcentagem de lipídios, que atuaria na diminuição da permeabilidade ao vapor de água, propriedade com altos valores em filmes a base de proteína.

Filmes nos quais são adicionados compósitos para melhorar as propriedades mecânicas também estão sendo muito pesquisados. Avérous et al. (2001), estudaram as interações entre fibras de celulose e filmes com matriz a base de amido de trigo obtendo filmes mais resistentes do que aqueles formulados apenas com o amido de trigo. Já Natarajan (2005) caracterizou filmes com fibrina, quitosana e gelatina voltados mais para aplicações

médicas, e as características dos filmes variaram de acordo com as porcentagens de cada composto.

Isto posto, o presente trabalho tem como objetivo estudar as propriedades físico-químicas da fibra e do pó de colágeno, obtidos a partir de pele bovina, bem como avaliar a influência da proporção entre pó e fibra de colágeno sobre as características mecânicas e de permeabilidade ao vapor de água de biofilmes produzidos com diferentes proporções desses materiais. A fibra e o pó de colágeno avaliados neste trabalho se apresentam como produtos não purificados, contendo uma pequena quantidade de componentes não protéicos. A diferença entre a fibra e o pó de colágeno reside principalmente no tamanho e formato das partículas. Com base nessa diferença, surgiu a idéia de avaliar a utilização da fibra como um compósito reforço da matriz filmogênica formada a partir do pó de colágeno, sendo este o aspecto inédito deste trabalho, uma vez que a matriz e o compósito são provenientes da mesma matéria-prima.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biofilmes

Para suprir a crescente demanda de materiais com caráter renovável, biodegradável e sustentável, biomateriais estão sendo cada vez mais importantes para esse desenvolvimento, particularmente com adição de compósitos em sua formulação (GROS; KALRA, 2002 e MOHANTY et al., 2002 apud GINDL, 2006).

Biofilmes são utilizados para reforçar os alimentos, resultando na melhoria da durabilidade durante processamento, estocagem e distribuição (KESTER; FENNEMA, 1986). Compósitos são partículas rígidas adicionadas aos polímeros ou outras matrizes filmogênicas para produzir algum efeito desejável ao filme como, por exemplo: aumento da resistência mecânica e fornecimento de resistência à elongação e a fratura (AHMED; JONES, 1990).

Os compósitos em forma de fibras estão sendo extensivamente utilizados nas indústrias plásticas para alcançar propriedades desejáveis ou para reduzir o preço dos artigos finais. Comparado aos compósitos inorgânicos, os orgânicos possuem as seguintes vantagens: ser provenientes de fontes renováveis naturais, ter grande disponibilidade, menor consumo de energia, menor custo, baixa densidade e superfície relativamente reativa, que pode ser usada para introduzir grupos específicos (ANGLÈS et al., 1999). Além disso, apresentam, não no mesmo nível dos compostos inorgânicos, mas de considerável atributo, altos valores de módulo elástico e de resistência.

Embora o uso de biofilmes em produtos alimentícios possa parecer recente, sua aplicação vem ocorrendo há muitos anos. Durante os séculos XII e XIII, praticou-se na China o recobrimento de laranjas e limões com ceras para retardar a perda de umidade (DONHOWE; FENNEMA, 1994). Um processo de recobrimento de alimentos envolvendo gelatina foi desenvolvido no início do século XIX (GUILBERT, 1986).

As pesquisas em filmes e coberturas comestíveis têm sido intensas nos últimos anos na área alimentícia (MALI et al., 2006, LUKASIK; LUDESCHER, 2006, MARTELLI et al., 2006, GARCÍA; SOBRAL, 2005, VEIGA-SANTOS et al., 2005), além de motivações provenientes de diferentes direções para o desenvolvimento neste campo. O número de consumidores interessados em saúde, qualidade, conveniência e segurança tem

aumentado, ao mesmo tempo em que surgem processos alimentícios com novos desafios, para os quais o conceito de filmes e coberturas comestíveis oferece potenciais soluções.

A maioria dos filmes ou coberturas comestíveis contém, no mínimo, um componente que, em geral, é um polímero de alto peso molecular. Estruturas poliméricas de cadeia longa são requeridas para formar uma matriz filmogênica com força de coesão apropriada quando dispersas em um solvente adequado. A força de coesão de um filme é formada devido a estrutura química e polimérica natural do sistema e do solvente, a presença de aditivos, como os agentes de ligação cruzada (cross-linking), e as condições ambientes durante a formação dos filmes. Quando o comprimento da cadeia polimérica e sua polaridade aumentam, a coesão é aumentada. Isso geralmente resulta na redução da flexibilidade do filme, da porosidade e, conseqüentemente, da permeabilidade aos gases, vapores e solutos. Uma distribuição uniforme dos grupos polares ao longo da cadeia polimérica aumenta a coesão por aumentar a probabilidade de pontes de hidrogênio intermoleculares e interação iônica (KESTER; FENNEMA, 1986).

O uso de biopolímeros na elaboração de embalagens é condicionado pelas suas características físicas e pelas propriedades dos biofilmes obtidos, que são resultado de uma relação entre as características físico-químicas da macromolécula e a formulação utilizada (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000). O Quadro 1 apresenta as possíveis utilizações dos filmes, de acordo com sua natureza.

<i>Uso</i>	<i>Tipo de filme apropriado</i>
Retardar migração de umidade	Lipídio, composto ^a
Retardar migração de gás	Hidrocolóide, lipídeo, ou composto
Retardar migração de óleo e gordura	Hidrocolóide
Retardar migração de soluto	Hidrocolóide, lipídeo, ou composto
Fornecer integridade estrutural ou propriedades de manuseio	Hidrocolóide, lipídeo, ou composto
Reter compostos voláteis (<i>flavor</i>)	Hidrocolóide, lipídeo, ou composto
Carregar aditivos alimentícios	Hidrocolóide, lipídeo, ou composto

^a um filme composto consiste de componentes combinados de lipídeos e hidrocolóides para formar uma bicamada ou conglomerado.

Fonte: DONHOWE e FENNEMA, 1994.

Quadro 1. Possíveis usos de filmes e coberturas comestíveis.

2.2 Componentes dos Filmes

Os componentes dos filmes e coberturas comestíveis podem ser divididos em três categorias, de acordo com os seus componentes principais: a base de hidrocolóides, de lipídeos e os compostos. Hidrocolóides incluem proteínas, derivados de celulose, alginato, pectinas, amidos e outros polissacarídeos. Lipídeos incluem ceras, acilglicerol e ácidos graxos. Os compostos contêm os dois componentes. Filmes a base de hidrocolóides podem ser aplicados onde o controle de migração de vapor de água não é o objetivo. Estes filmes possuem boa propriedade de barreira ao oxigênio, dióxido de carbono e lipídeos. A maioria destes filmes possui propriedades mecânicas desejáveis para alguns tipos de aplicações. Filmes de lipídeos são frequentemente utilizados como barreira ao vapor de água devido à sua natureza hidrofóbica (DONHOWE; FENNEMA, 1994). Já os filmes compostos, a base de proteínas e lipídeos, podem reunir as melhores propriedades mecânicas e físico-químicas de cada um deles.

Um outro composto que pode ser encontrado na formulação de biofilmes é o ajustador de pH, o qual deve ser utilizado, principalmente, em filmes a base de proteínas, por atuar diretamente na solubilidade das mesmas. O ajustador de pH faz com que as proteínas permaneçam solúveis (distantes de seus pontos isoeletricos), permitindo, portanto, sua geleificação. Normalmente, nos casos das proteínas, usa-se o ácido acético glacial como tal componente.

Filmes biodegradáveis feitos apenas com soluções ou dispersões de proteínas, sem qualquer aditivo, tendem a ser quebradiços e difíceis de manusear. A adição de plasticizantes é uma alternativa para aumentar a flexibilidade dos filmes, devido à habilidade destes em reduzir pontes de hidrogênio internas entre as cadeias poliméricas, reduzindo as forças de atração inter e intramoleculares da proteína e ao mesmo tempo aumentando o espaço intermolecular entre as cadeias poliméricas (SCHROOYEN et al., 2001) e diminuindo a temperatura de transição vítrea (BANKER, 1966). Com isso, ocorre um aumento da resistência mecânica do filme e diminuição de possíveis descontinuidades e zonas quebradiças (KROCHTA et al., 1994). Exemplos de plasticizantes são: glicerol, monoglicerídeo acetilado, polietileno glicol, sacarose, dentre outros.

A adição de plasticizante hidrofílico usualmente aumenta a permeabilidade ao vapor de água do filme devido a sua afinidade pela água (DONHOWE; FENNEMA, 1994). O plasticizante deve ser compatível com o polímero e o solvente utilizado, ou seja,

deve ser miscível para que não ocorra uma separação prematura durante o processo de secagem do filme (GUILBERT, 1986). Sua composição, tamanho e forma influenciam a habilidade em interagir com cadeias protéicas e em se ligar com moléculas de água, causando, assim, maior poder plasticizante, uma vez que a água também possui um efetivo plasticizante em filmes a base de biopolímeros hidrofílicos (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2001 apud THOMAZINE et al., 2005).

Em estudos onde quatro tipos de plasticizantes (glicerol, propileno glicol, etileno glicol e o dietileno glicol) foram utilizados em filmes de gelatina, em diferentes concentrações, o glicerol ($C_3H_8O_3$, peso molecular = 92g/ gmol) mostrou, de maneira geral, o maior efeito e eficiência plasticizante (VANIN et al., 2004). O aumento da sua concentração proporcionou aumento na deformação à ruptura do filme.

As propriedades funcionais, sensoriais e nutricionais de filmes comestíveis também podem ser alteradas pela adição de vários aditivos em pequenas quantidades, como aromatizantes, corantes, vitaminas e agentes antimicrobianos.

2.3 Formação e Métodos de Aplicação do Filme

Quando todos os componentes necessários para a formação do filme estão em forma de solução, esta é denominada solução formadora de filme ou solução filmogênica. O filme pode ser formado diretamente na superfície do alimento ou em suportes próprios. No primeiro caso chama-se comumente de cobertura (DONHOWE; FENNEMA, 1994).

Muitas técnicas podem ser usadas para formar filmes ou coberturas comestíveis (DEASU, 1984, KONDO; VAN VALKENBURG, 1979). Para filmes a base de hidrocolóides as técnicas disponíveis incluem:

- a) *precipitação simples* – quando uma macromolécula em dispersão aquosa é precipitada, ou sofre uma mudança de fase (de primeira ordem), por evaporação do solvente, por adição de um outro solvente onde a macromolécula é insolúvel, por adição de um eletrólito (“salting-out” ou interação iônica) ou por modificação do pH;

- b) *Precipitação complexa* – quando duas soluções ou dispersões de macromoléculas de cargas opostas são combinadas, provocando interação e precipitação do complexo de polímeros;
- c) *Geleificação* – quando ocorre uma transição sol-gel causada por resfriamento de uma dispersão de hidrocolóide ou por coagulação térmica, devido à desnaturação de certas proteínas.

Dos três mecanismos apresentados, a precipitação simples é a mais amplamente utilizado na fabricação de filmes a base de proteínas.

Os filmes desenvolvidos com uma das técnicas citadas acima podem ser aplicados utilizando os seguintes métodos: *dipping*, *spraying* e *casting*.

Dipping e *spraying* baseiam-se na formação do filme no próprio produto que será recoberto; no primeiro caso devido a um prévio mergulho na solução formadora de filme e no segundo, à aspersão desta solução sobre o produto.

A técnica *casting*, útil por formar filmes não fixos, é baseada em métodos desenvolvidos para filmes não comestíveis e por isso representa um menor investimento em pesquisas, além de ser a mais utilizada para analisar as propriedades filmogênicas dos biomateriais. Ela consiste na aplicação da solução formadora de filme em moldes, permitindo o controle da espessura dos filmes através da quantidade de matéria seca depositada nos suportes (GONTARD, 1994) e da variação da “espessura aparente” das soluções quando acondicionadas nos moldes (CUQ et al., 1996). A espessura dos filmes, apesar de ser uma característica pouco estudada, é importante para controlar sua uniformidade (SOBRAL, 1999).

2.4 Propriedades dos Filmes

2.4.1 Permeabilidade ao vapor de água

O transporte de um gás ou vapor através de uma membrana pode ocorrer por dois mecanismos: difusão ativa e difusão capilar. A difusão capilar está mais presente em materiais porosos ou com imperfeições, enquanto que a difusão ativa envolve solubilização do

gás penetrante, sua difusão e finalmente sua liberação no lado oposto do filme. Desta forma, na ausência de imperfeições, quebras, furos ou outras falhas, o mecanismo primário para o fluxo de gás ou vapor através de um filme ou cobertura comestível é a difusão ativa. Se o gás é insolúvel no filme e já o penetrou, o mecanismo predominante é o fluxo capilar (DONHOWE; FENNEMA, 1994).

A difusão depende do tamanho, formato e polaridade das moléculas penetrantes, assim como do movimento segmentado da cadeia polimérica na matriz do filme. Os fatores que afetam o movimento segmentado de cadeias poliméricas incluem forças atrativas intermoleculares como pontes de hidrogênio e interações de Van der Waals, grau de ligações cruzadas e grau de cristalinidade. As etapas de dissolução e evaporação são influenciadas pela solubilidade do penetrante no filme.

Na obtenção do fluxo em estado estacionário (regime permanente) do gás ou vapor através do filme, aplica-se a Lei de Fick (Equação 1). A Lei de Fick mostra que a quantidade de penetrante difundindo através do filme por unidade de área por unidade de tempo, J , é proporcional ao gradiente de concentração do penetrante, c , ao longo da espessura do filme, x . A constante de proporcionalidade é definida como difusividade mássica, D_m .

$$J = -D_m \frac{dc}{dx} \quad (1)$$

Se a lei da solubilidade de Henry (Equação 2) é obedecida, a concentração do penetrante no filme é igual ao produto do coeficiente de solubilidade, S , pela pressão parcial do penetrante no ar adjacente, p :

$$c = S \cdot p \quad (2)$$

Combinando as duas equações:

$$J = -D_m \cdot S \frac{dp}{dx} \quad (3)$$

Define-se permeabilidade, P , como o produto da difusividade pelo coeficiente de solubilidade, produzindo a seguinte equação (DONHOWE; FENNEMA, 1994):

$$Dm.S = -J \frac{dx}{dp} = P \quad (4)$$

A permeabilidade está relacionada ao fluxo do penetrante através de um material resistente e não deve ser confundida com transporte através de poros (MANNHEIM; PASSY, 1985). O uso da Equação 4 para calcular a permeabilidade como uma propriedade universal de um filme ou cobertura comestível é baseada na hipótese de que D_m e S sejam independentes da concentração do penetrante. Isso ocorre quando não há interação significativa entre o filme e a substância penetrante. Entretanto, quando um gás ou vapor penetrante interage fortemente com o material do filme, ocorrem desvios na Lei de Fick (BANKER et al., 1966, KUMINS, 1965, PASCAT, 1986, SCHULTZ et al., 1949). Este é o caso de vapor de água permeando através de filmes compostos por polímeros hidrofílicos, onde, D_m e S são dependentes da pressão parcial de vapor de água e, nesse caso, a permeabilidade não é uma propriedade universal do filme e não pode ser usada no senso geral para descrever sua propriedade de barreira, tornando-se uma característica do filme sob dadas condições ambientais de umidade relativa, temperatura etc. (KESTER; FENNEMA, 1986).

Experimentalmente a permeabilidade pode ser determinada de acordo com a expressão:

$$permeabilidade = \frac{\text{peso do penetrante} \times \text{espessura}}{\text{área} \times \text{tempo} \times \text{diferença da pressão parcial}} = \frac{g.cm}{m^2.dia.mmHg} \quad (5)$$

A permeância (Equação 6) é simplesmente a expressão da permeabilidade (ou coeficiente de permeabilidade) dividida pela espessura do filme. A permeância é uma “avaliação de desempenho”, não uma propriedade inerente do filme (ASTM, 1989).

$$permeância = \frac{\text{massa do penetrante}}{\text{area} \times \text{tempo} \times \text{diferença da pressão parcial}} \quad (6)$$

A taxa de transmissão (Equação 7), outra propriedade que se pode obter de filmes, é derivada da expressão da permeabilidade, porém, sem a espessura do filme e o

gradiente de pressão parcial. A pressão parcial do penetrante e a espessura do filme não são consideradas, mas devem ser mencionadas quando conhecidas.

$$\text{Taxa de transmissão} = \frac{\text{massa penetrante}}{\text{área} \times \text{tempo}} \quad (7)$$

A permeabilidade ao vapor de água é usualmente medida pelo método gravimétrico. Um filme é selado na abertura superior de um recipiente contendo um dessecante, e então, o recipiente é colocado numa câmara à temperatura e umidade relativa (UR) constantes (ASTM, 1989). O dessecante mantém a UR ambiente baixa e constante (usualmente 0% UR) dentro do recipiente (DONHOWE; FENNEMA, 1994). A célula teste contém água destilada ou solução saturada de sal. Pesagens periódicas determinam a taxa de transmissão de água através do filme. As pesagens devem ser realizadas após a taxa constante de transporte de umidade ser alcançada no interior da câmara. Oito pesagens geralmente são suficientes (ASTM, 1989).

A Figura 1 descreve um modelo de célula-teste, a qual deve ser confeccionada em um material não corrosível e impermeável à água. Além disso, a área superficial do dessecante ou da água não deve ser menor que a área da abertura da célula.

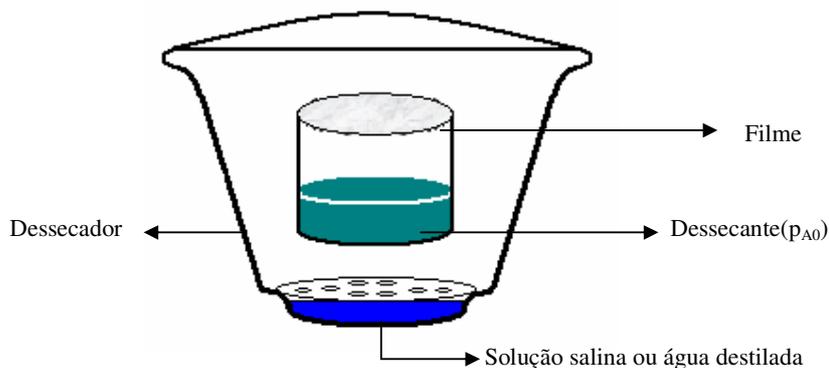


Figura 1. Esquema do equipamento utilizado para teste de permeabilidade ao vapor de água.

O controle da temperatura e da UR na câmara de teste é crucial para a correta determinação da permeabilidade ao vapor de água. É importante, também, que a pressão de vapor, p_{A0} , na superfície da solução de teste ou dessecante dentro do recipiente permaneça constante ao longo do teste (McHUGH; KROCHTA, 1994).

Alguns fatores, como a natureza química e estrutural do polímero, afetam a permeabilidade ao vapor de água. Por exemplo, polímeros altamente polares, como a maioria das proteínas e polissacarídeos, exibem altos graus de pontes de hidrogênio, resultando em pobres barreiras à umidade. Por outro lado, materiais a base de hidrocarbonetos não-polares, como os lipídeos, exibem o efeito inverso, agindo como excelentes barreiras à umidade e sendo menos efetivos como barreira a gases. Os plasticizantes, que são polióis em sua maioria, acabam rompendo pontes de hidrogênio das cadeias poliméricas e tendem a aumentar a permeabilidade ao vapor de água dos filmes (McHUGH; KROCHTA, 1994).

2.4.2 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas de um biofilme estão entre as características mais estudadas, pois elas afetam diretamente sua utilização. Tais propriedades incluem a tensão máxima de ruptura (σ , dada em MPa), a elongação máxima (ϵ , dada em %) e o módulo de Young (E , dado em MPa/%). O módulo de Young é uma característica de cada material, que representa a constante de proporcionalidade entre a tensão e a deformação de um corpo (VAN DE VELDE e KIEKENS, 2002). Tensão expressa a força máxima desenvolvida por um filme durante um teste elástico em unidades de área de sua secção transversal, enquanto valores de elongação representam a habilidade do filme em se distender. Essas propriedades mecânicas estão diretamente relacionadas com a natureza do material filmogênico utilizado e com a coesão da matriz polimérica formada que, por sua vez, está relacionada com a distribuição e a concentração de interações inter e intramoleculares na estrutura filmogênica (CUQ; GONTARD e GUILBERT, 1998). A magnitude da tensão e da elongação está altamente associada com a quantidade de plasticizante presente no filme. Geralmente, o aumento da quantidade de plasticizante resulta em filmes com menor resistência à tensão e maior elongação (VANIN et al., 2004).

Para determinados tipos de filmes, requer-se uma alta resistência à tensão, enquanto que o valor da elongação depende do tipo de sua aplicação, já que para manter a sua integridade e propriedades de barreira, um filme deve tolerar a tensão normal encontrada durante a sua aplicação, além do transporte e manuseio. Um filme com propriedade de barreira adequada pode ser ineficiente se as propriedades mecânicas não permitirem a

manutenção da integridade do filme durante o processo de manipulação, empacotamento e transporte (DAVANÇO, 2006).

É evidente que as propriedades mecânicas dos filmes compósitos são afetadas por vários parâmetros: tamanho, formato e distribuição do compósito reforço. No caso de partículas não-esféricas, o grau de orientação com respeito à tensão aplicada também é importante. Wu (1966) mostrou, teoricamente, que partículas em formato de discos reforçam melhor do que partículas em formato de esferas ou de agulhas (AHMED; JONES, 1990).

Recentemente, foi mostrado que filmes de celulose têm sua força significativamente aumentada pela incorporação de celulose não dissolvida (GINGL; KECKES, 2005 apud GINDL et al., 2006). Os mesmos autores ressaltaram que um reforço celulósico em escala nanométrica permite a produção de filmes compósitos com excelentes resistências a força de tração, acima de 400 MPa, e um módulo elástico acima de 28 GPa. A tensão é transferida da matriz para a fibra através da tensão interfacial, que se concentra no final da fibra. Com o aumento da tensão, estes sítios são os locais onde a interface falha primeiro e a separação da fibra na matriz começa (ANGLÈS et al., 1999).

As propriedades mecânicas específicas são obtidas através da razão entre as propriedades originais e a densidade do polímero (g/cm^3), e são úteis, por exemplo, no caso de se utilizar biopolímeros como elemento estrutural sem o uso de outro reforço, onde as propriedades específicas determinarão as dimensões necessárias para determinadas firmeza e resistência desejadas. A tensão máxima específica (σ^*) é dada em Nm/g e o módulo de Young específico (E^*) em KN m/g. A densidade do filme indica o grau de compactação e tem influência nas propriedades mecânicas e de barreira e é usada no cálculo das propriedades mecânicas específicas dos materiais (VAN DE VELDE; KIEKENS, 2002).

2.4.3 Solubilidade

A solubilidade em água é uma propriedade importante dos filmes biodegradáveis no que se refere ao seu emprego, pois algumas aplicações requerem insolubilidade em água para manter a integridade do produto (PEREZ-GAGO; KROCHTA, 2001).

A obtenção de filmes com boas propriedades de barreira ao vapor de água, isto é, com baixa permeabilidade dentro de uma grande faixa de umidade relativa, implica na utilização de um material de baixa solubilidade em água, ou seja, de caráter mais hidrofóbico (SARMENTO, 1999).

Filmes formados a partir de hidrocolóides hidrofílicos, com plasticizantes hidrofílicos tendem a ser, obviamente, mais solúveis do que aqueles em que se utilizam componentes hidrofóbicos. Contudo, em filmes onde são incorporados compósitos, mesmo eles sendo hidrofílicos, a solubilidade tende a diminuir devido ao tamanho das partículas que esses compósitos apresentam.

2.4.4 Isotermas de sorção de vapor de água

As isotermas de sorção consistem de uma representação gráfica do conteúdo de umidade de equilíbrio de um produto em função de sua atividade de água, sendo a maneira mais utilizada para reportar valores de atividade de água (LOPES FILHO et al., 2001). Desta forma, as isotermas fornecem informações sobre as interações entre os componentes dos alimentos e a água. O conhecimento das isotermas de sorção e do calor isostérico de sorção é de essencial importância para vários processos alimentícios como secagem, armazenamento e empacotamento (TELIS et al., 1999).

Vários pesquisadores têm determinado isotermas de sorção de água para vários produtos e temperaturas, selecionando as faixas de atividade de água. Equações empíricas e semi-empíricas têm sido propostas para correlacionar a umidade de equilíbrio com a atividade de água de produtos alimentícios. Van den Berg e Bruin (1981) coletaram e classificaram 77 equações. Alguns dos modelos são baseados em teorias do mecanismo de sorção, outras são puramente empíricas ou semi-empíricas. A equação Guggenheim-Anderson-deBoer (GAB) é considerada como o mais versátil modelo disponível na literatura. Essa equação é apresentada da seguinte forma (TELIS et al., 1999):

$$X_{eq} = \frac{(C-1) K a_w X_m}{1 + (C-1) K a_w} + \frac{K a_w X_m}{1 - K a_w} \quad (8)$$

onde X_m é o conteúdo de umidade (base seca) correspondente à monocamada de moléculas de água, C é a constante de GAB relacionada à monocamada e K é a constante de GAB relacionada à multicamada; X_{eq} e a_w são a umidade de equilíbrio e a atividade de água do material analisado, respectivamente.

O calor isostérico de sorção é a quantidade de energia necessária para dessorver ou adsorver a água em alimentos. Ele pode ser determinado a partir dos dados de sorção, usando a Equação 9, a qual é derivada da equação de Clausius-Clapeyron (KAYMAK-ERTEKIN; GEDIK, 2004):

$$q_{st} = -R \frac{\partial \ln a_w}{\partial (1/T)} \quad (9)$$

E:

$$q_{st} = Q_{st} - \Delta H_{VAP} \quad (10)$$

onde q_{st} é o calor isostérico líquido de sorção (kJ/mol), Q_{st} o calor isostérico de sorção (kJ/mol), ΔH_{VAP} o calor de vaporização (kJ/mol), R é a constante universal dos gases (kJ/mol K) e T é a temperatura absoluta (K).

As propriedades funcionais dos filmes sofrem grande influência das condições ambientais, temperatura e umidade relativa. Polímeros hidrofílicos, como filmes a base de proteína, podem absorver água do ambiente ou ainda do material embalado (KIM; USTUNOL, 2001). As isotermas de sorção de biofilmes comestíveis, produzidos com proteína de amendoim e glúten de trigo, variam de acordo com suas propriedades de permeabilidade ao vapor de água e natureza hidrofílica (JANGCHUD; CHINNAN, 1999).

Geralmente, sistemas com alto teor protéico apresentam maior incidência de isotermas da forma sigmoideal (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1993). Lim, Mine e Tung (1999), relataram que o formato sigmoideal das isotermas de adsorção de umidade sugere a formação de agrupamentos de moléculas de água na matriz polimérica com o aumento da atividade de água, seguido de um intumescimento da matriz, o que pode ocasionar a exposição de um número maior de sítios de ligação para a sorção de água.

2.4.5 Reologia

A relação específica que se desenvolve entre a tensão aplicada e a deformação resultante para um determinado material pode ser expressa em termos de suas propriedades reológicas. Assim, sob o ponto de vista reológico, esses dois parâmetros mecânicos formam a base para a classificação dos materiais em três grupos principais: elásticos, plásticos e viscosos (VÉLEZ-RUIZ, 2002).

O comportamento reológico dos fluidos pode ser investigado pelo uso de equipamentos cuja geometria produz um escoamento cisalhante simples, em estado estacionário. Pode-se, assim, obter uma relação entre a tensão de cisalhamento aplicada e a taxa de deformação, de acordo com a Equação 11:

$$\sigma_c = f(\dot{\gamma}) \quad (11)$$

onde σ_c é tensão de cisalhamento aplicada ao fluido e $\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação que, por sua vez, é definida como $\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt}$, onde γ é a deformação resultante.

No caso de fluidos não-Newtonianos, a relação entre tensão de cisalhamento e taxa de deformação passa a ser função da própria taxa de deformação (STEFFE, 1996).

Restringindo-se aos fluidos puramente viscosos, independentes do tempo, deve-se considerar a presença ou não de tensão residual. Não havendo tensão residual, os fluidos seguem uma relação potencial, da forma:

$$\sigma_c = k\dot{\gamma}^n \quad (12)$$

onde k e n são os índices de consistência e de comportamento do fluido, respectivamente.

A obtenção dos parâmetros reológicos mantendo-se a taxa de deformação constante é a maneira mais utilizada para o cálculo na engenharia de processos.

As proteínas possuem comportamento viscoelástico (CUQ, 1996) e a determinação dos parâmetros reológicos da solução formadora de filme protéico é importante para aplicações diretamente sobre os alimentos.

2.5 Biofilmes a base de proteínas

A habilidade de muitas substâncias de formar filmes tem sido utilizada em diversas aplicações industriais. A gelatina foi um dos primeiros materiais empregados na formação da parede de cápsulas poliméricas, em métodos de microencapsulação. Duas aplicações comerciais incluem a extrusão de colágeno reconstituído, para envoltório de produtos cárneos, e o uso de cobertura de zeína de milho para nozes e artigos de confeitaria (McHUGH; KROCHTA, 1994).

Dentre todas as proteínas, a gelatina tem atraído a atenção para o desenvolvimento de filmes comestíveis devido à sua abundância (BIGI et al., 2002). Os principais parâmetros que afetam as propriedades de filmes formados por gelatina são a fonte da matéria-prima, o método de extração, o peso molecular, o método de preparação do filme e o grau de hidratação ou presença de plasticizante.

Filmes protéicos melhoram as propriedades mecânicas dos alimentos e minimizam a perda de aromas voláteis (LEE et al., 2004). No entanto, de acordo com Bertan et al. (2005), os filmes feitos de proteínas são sensíveis à umidade. Desta forma, inúmeros estudos têm sido conduzidos com a intenção de melhorar a performance desses filmes. Um método extensivamente utilizado para aumentar a barreira ao vapor de água dos filmes tem sido a incorporação de compostos hidrofóbicos, como lipídeos, na solução formadora de filmes (CHAMBI; GROSSO, 2005).

Quando uma matéria-prima não preenche alguns requisitos para determinadas aplicações dos filmes que ela forma, há duas alternativas a serem tomadas: modificar sua cadeia estrutural ou adicionar outras matérias-primas capazes de suprir as deficiências necessárias. Neste último caso, em que o elemento adicionado tem como objetivo melhorar as propriedades mecânicas, os filmes formados são denominados de Filmes Compósitos. Avérous et al. (2001) citam muitos estudos e aplicações (ex. mercado automotivo) que possuem interesse na utilização de fibras como reforço na matriz termoplástica. Os mesmos autores relatam que outros pesquisadores (AMASH, 2000, DUFRESNE, 2000) mostraram que fibras de celulose ou microfibrilas em matriz a base de amido aumentam a resistência à ruptura e melhoram a resistência à água em até 15%.

Pesquisas recentes mostram que o desenvolvimento de biofilmes a base de proteína se baseia na utilização de uma grande diversidade de matérias-primas, para diferentes aplicações diretas. Seydim e Sarikus (2006), por exemplo, estudaram a incorporação de

orégano, alecrim e alho em filmes de proteína de trigo com o objetivo de atribuir propriedades antimicrobianas aos filmes.

Um número grande dessas pesquisas está voltada para a melhoria das características mecânicas dos biofilmes, o que se traduz no aumento na resistência à tensão e diminuição da permeabilidade ao vapor de água. Lee et al. (2004) estudaram a influência de raios gama em filmes de glúten, obtendo valores de tensão uma vez e meia maior e diminuição na permeabilidade ao vapor de água de 29%, em relação aos filmes sem o tratamento radioativo. Lee et al. (2003) avaliaram a proporção de gelatina/gelana e a concentração de NaCl nas propriedades mecânicas dos filmes, encontrando uma diminuição da solubilidade em água e da força de tensão e um aumento da elongação para ruptura, durante o aumento da proporção de gelatina.

Wang e Pádua (2005) incorporaram óleo de linhaça e óleo de tungue em filmes de zeína e avaliaram as forças de tensão e propriedades de barreiras à água. Chamb e Grosso (2005) adicionaram transglutaminase em filmes de gelatina e caseína, variando a proporção dessas duas proteínas, e examinaram suas propriedades mecânicas e de barreira, encontrando diminuição na permeabilidade ao vapor de água.

2.6 Colágeno

O colágeno é o maior componente protéico dos tecidos conjuntivos dos animais (SWAN; TORLEY, 1991, WHITING, 1989), chegando a representar cerca de 25% das proteínas nos vertebrados (RAW, 1989). O termo colágeno deriva das palavras gregas *KOLLA* (cola) e *GENNO* (produção), e literalmente tem sido empregado como matéria-prima na produção de cola animal (OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2001). Ele constitui uma grande família de proteínas de matriz extracelular, tendo a propriedade estrutural como sua função primária.

Em um mesmo animal é possível encontrar colágenos geneticamente distintos. Muitos deles têm sido caracterizados bioquimicamente, observando que cada tipo de tecido contém uma composição específica de colágeno (BANDMAN, 1994).

O colágeno tipo I é o mais abundante, sendo o maior constituinte da pele (80% da matéria seca da pele adulta), tendões (90% da matéria seca), ligamentos e ossos (90% da matéria seca). É uma proteína macromolecular, constituída por três cadeias

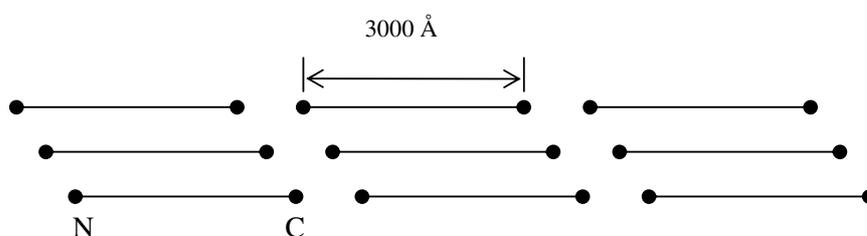
polipeptídicas de tamanhos iguais que, em sua porção central, estão sob a forma helicoidal e, nas extremidades amínicas e carboxílicas, permanecem na forma globular (SWAN; TORLEY, 1991). Nestas porções globulares se localizam as pontes cruzadas intermoleculares, que estabilizam a estrutura das fibrilas colagenosas e promovem o aumento da dureza da carne na medida em que o animal envelhece (OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2001).

A diversidade biológica do colágeno é baseada em variações da seqüência primária, juntamente com um pequeno número de modificações na cadeia lateral (SWAN; TORLEY, 1991, BARLEY, 1990). Os aminoácidos não-essenciais (glicina, prolina, hidroxiprolina, arginina e alanina) constituem dois terços dos resíduos e os aminoácidos essenciais (metionina, tirosina e histidina) entram em pequena quantidade. Cistina e triptofano estão comumente ausentes. Portanto, o colágeno contém apenas metade da média do teor de aminoácidos essenciais comum em proteínas não colagenosas (SWAN; TORLEY, 1991).

Pontes intra e intermoleculares se formam na matriz colagenosa devido a ligações cruzadas covalentes. Possíveis ligações covalentes presentes na matriz incluem ligações de éster, de amida e ligações peptídicas envolvendo grupos carboxílicos de cadeias laterais dos ácidos aspártico e glutâmico, além de grupos amino da lisina (HARRINGTON, 1966). Pontes dissulfeto, embora não numerosas devido ao baixo conteúdo de cisteína no colágeno, também têm um papel na estrutura protéica (TANZER, 1976).

Proteínas colagenosas usualmente formam agregados supramoleculares (fibrilas, filamentos ou redes), sozinhas ou em conjunto com outras matrizes extracelulares. Sua principal função é contribuir na integridade estrutural da matriz extracelular ou ajudar a fixar células na matriz. Todas as proteínas colagenosas têm domínios com conformação de tripla hélice, proporcionando colágenos com regiões de estruturas moleculares rígidas e com aspecto de bastões cilíndricos (NEKLYUDOV, 2002). Tais domínios são formados por três subunidades (cadeias α), cada uma contendo uma seqüência repetitiva $(\text{Gly-X-Y})_n$, onde X e Y são quaisquer resíduos de aminoácidos, mas são normalmente prolina e hidroxiprolina (KREIS; VALE, 1999, BARLEY, 1987). Além disso, muitos resíduos de prolina e lisina no colágeno são modificados covalentemente a 4-hidroxiprolina (Hyp) e 5-hidroxilisina (Hyl), respectivamente. Estes resíduos de aminoácidos alterados representam cerca de 25% do total da composição aminoacídica. Estes aminoácidos são incorporados nas cadeias polipeptídicas como prolina e lisina e são hidroxilados depois da proteína ter sido sintetizada (RAW, 1989). Existem regiões nos extremos que não apresentam essa periodicidade e são designadas como telopeptídeos. Por exemplo, o colágeno bovino tem 1014 resíduos com uma glicina a cada três posições, porém, tem 16 aminoácidos no extremo amino terminal (telopeptídeo N) e 25 no

extremo carbóxi terminal (telo-peptídeo C) sem esta regularidade (Figura 2). Supõe-se que a estrutura dos telopeptídeos seja globular (BANDMAN, 1994).



Fonte: BANDMAN, 1994.

Figura 2. Esquema da organização das moléculas que resulta no aspecto estriado das fibras de colágeno. Os peptídeos -N e -C são representados como círculos.

As diferentes constituições de colágeno têm diversas funções e formas. O resíduo de prolina é vital para a estrutura do tropocolágeno (unidade fundamental do colágeno). Pela prolina possuir pouca flexibilidade conformacional, a cadeia polipeptídica do tropocolágeno é bastante rígida. Moléculas de tropocolágeno associadas formam microfibrilas de colágeno. Não somente as pontes de hidrogênio entre as hélices de polipeptídeo das triplas hélices, mas também as ligações covalentes entre e dentro das triplas hélices das microfibrilas de tropocolágeno, contribuem para a força e rigidez da fibra de colágeno. Ao contrário da maioria das proteínas, as quais possuem ligações cruzadas por resíduos de cistina, o colágeno, que não contém cistina nem resíduo de cistina, possui ligação cruzada pela lisina lateral na cadeia. Alguns dos resíduos Hyl do colágeno são covalentemente ligados a carboidratos, fazendo do colágeno uma glicoproteína. Uma unidade comum de carboidrato encontrada no colágeno é um dissacarídeo constituído de resíduo de glicose, ligado pela ligação glicosídica ($\alpha 1 \rightarrow 2$) ao resíduo de galactose (RAW, 1989).

A alta resolução da estrutura cristalina dos peptídeos das triplas hélices do colágeno mostra que as mesmas são cercadas por um cilindro de hidratação; um extensivo entrelaçamento de pontes de hidrogênio entre moléculas de água e grupos aceptores dos peptídeos, estabilizam a estrutura. Resíduos de 4-hidroxiprolina na posição Y da seqüência repetida (Gly-X-Y)_n, desempenham um papel crítico na estrutura para as pontes de hidrogênio. A hidroxilação dos polipeptídeos do colágeno causa, portanto, um aumento

significante na desnaturação térmica (*melting*) das triplas hélices do colágeno (KERIS; VALE, 1999).

A hidroxiprolina (Figura 3) é usada para indicar o teor de colágeno uma vez que não é encontrada comumente entre as proteínas não colagenosas (VAN; TORLEY, 1991, WOESNER, 1961). De acordo com França e Waszczynskyj (2002), a hidroxiprolina se apresenta em quantidades constantes no colágeno, representando 13 a 14% do seu conteúdo total. A hidroxiprolina é determinada quantitativamente como uma medida de material colagenoso em carnes e produtos cárneos. Colágeno de tecido conectivo contém 14% de hidroxiprolina, quando se usa fator de determinação protéica específica para o colágeno de 5,55 (AOAC, 1995).

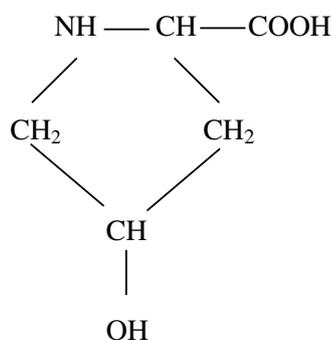


Figura 3. Representação molecular da hidroxiprolina.

Entre as principais características que distinguem o colágeno, podem ser citadas as suas propriedades mecânicas singulares, o fato de ser quimicamente inerte, sua composição incomum de aminoácidos e sua habilidade para se transformar em gelatina, isto é, o colágeno é a matéria-prima para produção de gelatina. Esta, a gelatina, possui baixo peso molecular e maior solubilidade, sendo resultante do aquecimento do colágeno em água ou em soluções aquosas de ácidos ou bases (NEKLYUDOV, 2002).

As imagens apresentadas nas Figuras 4 e 5 foram obtidas no Laboratório de Microscopia e Microanálise da Unesp/Campus de São José do Rio Preto e representam, respectivamente, a fibra de colágeno inteira e uma secção da mesma para melhor visualização das cadeias entrelaçadas.



Figura 4. Fibra de colágeno vista num microscópio com objetiva de aumento de 4X.



Figura 5. Fibra de colágeno numa objetiva de aumento de 20X.

2.6.1 Estrutura do colágeno

2.6.1.1 Composição e distribuição de aminoácidos

Devido à sua importância, vários tipos de colágeno foram estudados usando diferentes métodos físico-químicos. A microscopia eletrônica demonstrou que a maioria das fibras de colágeno possui estrutura estriada característica. Na Figura 6 é possível observar a

representação das triplas hélices entrelaçadas, responsáveis pela característica estriada do colágeno, e como essas moléculas se reúnem para formar diferentes estruturas até chegar na fibra de colágeno.

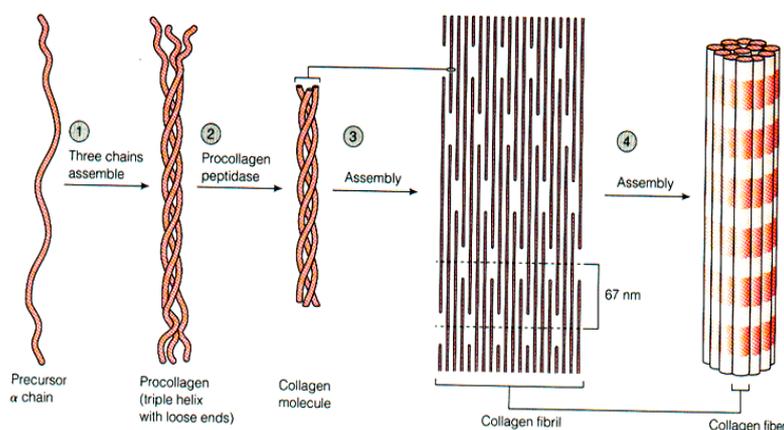


Figura 6. Representação das estruturas que formam a fibra de colágeno.

A composição aminoacídica do colágeno (Tabela 1), isto é, sua estrutura primária, é caracterizada pelo alto conteúdo de glicina, prolina e hidroxiprolina. O total de glicina é próximo de um terço dos aminoácidos presentes, enquanto que o conteúdo de prolina e hidroxiprolina é cerca de um quarto (RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN, 1976, apud KROCHTA et al., 1994). Também é uma das poucas proteínas que contém hidroxilisina. O colágeno é uma proteína hidrofílica devido ao maior conteúdo ácido, básico e de aminoácido hidroxilado do que resíduos lipofílicos, além de sua estrutura secundária não favorecer a formação de cadeias α -hélice pelo grande número de resíduos prolil e hidroxiprolil (ARVANITTOYANNIS, 1999). Este mesmo autor cita que Carver e Blout, 1967, relataram que as cadeias colagenosas são macromoléculas helicoidais com a tendência de se ligar intermolecularmente, ao invés das intra-ligações e pontes de hidrogênio. A estrutura terciária é formada por duas ou três cadeias de tropocolágeno ligadas covalentemente e a quaternária refere-se à formação de pequenos agregados de moléculas de tropocolágeno. Moléculas de colágeno ligam-se entre si para formar a fibra de colágeno. O peso molecular do colágeno varia de 5×10^4 a 1×10^5 Da (ROSE, 1987).

Tabela 1. Composição aminoacídica (resíduos por 100 resíduos de aminoácidos) de colágeno bovino .

Amino ácido	Colágeno do córeo bovino ¹
Lisina	2,5
Histidina	0,5
Arginina	4,8
Ácido aspártico	4,7
Treonina	1,7
Serina	3,9
Ácido glutâmico	7,2
Prolina	12,9
Glicina	33,7
Alanina	10,7
Cisteína	0,0
Valina	2,0
Metionina	0,4
Isoleucina	1,1
Leucina	2,4
Tirosina	0,5
Fenilalanina	1,3
Hidroxiprolina	9,4
hidroxilisina	0,5

¹ Veis (1964), dados foram arredondados ao mais próximo 0,1.

Fonte: GENNADIOS et al., 1994.

2.6.1.2 Solubilidade, elasticidade e propriedade de absorção de água do colágeno

De acordo com Neklyudov (2003), o colágeno é solúvel em tampão ácido diluído e, sob condições normais, as fibras de colágeno são ligeiramente extensíveis. Em aquecimento de 60°C, o colágeno úmido submete-se a uma redução drástica em seu comprimento (para 1/3-1/4 do tamanho original) e adquire elasticidade (provavelmente devido à distribuição das pontes de hidrogênio cruzadas entre as cadeias do colágeno). Em presença de ácido, álcalis e soluções aquosas salinas, o colágeno absorve considerável quantidade de água. O ponto isoelétrico do colágeno se encontra na faixa de 6,5 a 8,5.

2.6.2 Geleificação protéica

A geleificação envolve associações ou ligações cruzadas intermoleculares de cadeias poliméricas para formar uma matriz semi-rígida e tridimensional, que captura e imobiliza (no nível macroscópico) o solvente (KESTER; FENNEMA, 1986).

Gel é definido como uma malha de dimensões macroscópicas, imersa em um meio líquido, e que não exibe um escoamento estável constante (ZIEGLER; FOEGEDING, 1990). Durante a geleificação ocorre a transformação de uma proteína do estado SOL para uma estrutura do tipo GEL, por aquecimento ou outro agente (DAMODARAN, 1991), levando a um sólido viscoelástico (FOEGEDING, 1989).

A geleificação protéica é uma propriedade funcional muito importante, envolvendo a formação de uma rede tridimensional que exibe certo grau de organização, constituída por moléculas desnaturadas ou não.

Durante o processo de geleificação, a dissociação e/ou o desdobramento das moléculas protéicas geralmente aumentam a exposição de grupos reativos, especialmente hidrofóbicos. As interações proteína-proteína são assim favorecidas e, em geral, são as principais causas da subsequente agregação, descrita como todas as interações proteína-proteína, com formação de complexos de alto peso molecular. Interações hidrofóbicas são aumentadas com altas temperaturas e a formação de pontes de hidrogênio é favorecida durante o resfriamento. O aquecimento também pode expor os agrupamentos sulfidrílicos (QUINT, 1987). Na maioria dos casos é indispensável um tratamento térmico para se conseguir a geleificação, podendo necessitar um resfriamento posterior (CHEFTEL et al., 1989). Praticamente todos os estudos mostram a necessidade de uma desnaturação e desdobramento da proteína como passos prévios para interações ordenadas proteína-proteína e formação de agregados protéicos (QUINT, 1987).

A incidência da geleificação pode variar em função da natureza da proteína, das condições do meio e das diversas etapas do processo, como as condições termodinâmicas, concentração, pH e força iônica (CHEFTEL et al., 1989, ZIEGLER; FOEGEDING, 1990).

As proteínas podem ter transições de primeira e de segunda ordem. A transição de primeira ordem mais importante é a desnaturação, caracterizada por um rearranjo espacial da molécula que se manifesta por um pico endotérmico em um termograma DSC (*Differential Scanning Calorimetric*), com uma quantidade de calor latente envolvido na mudança (RÖOS, 1995 apud SOUZA, 2001). O colágeno desnatura quando aquecido a 65-

68°C, com a subsequente formação da gelatina (ASHGAR; HENRICKSON, 1982^a, BAILEY; LIGHT, 1989, BARBUT; MITTAL, 1991, GORDON; BARBUT 1992). Sessenta por cento dos resíduos de colágeno são hidrofóbicos e, em consequência da desnaturação térmica, a gelatina é parcialmente solúvel em gordura (BAILEY; LIGHT, 1989).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho é o desenvolvimento de filme compósito comestível utilizando-se o colágeno em pó como macromolécula responsável pela formação da matriz contínua, e a fibra de colágeno, como material de reforço daquela matriz.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a fibra e o pó de colágeno quanto à composição química e propriedades físico-químicas e algumas propriedades funcionais;

- Analisar a influência da relação fibra/pó de colágeno nas propriedades físico-químicas e mecânicas dos filmes formados, partindo de uma formulação básica de solução filmogênica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima

A fibra e o pó de colágeno foram fornecidos pela empresa NOVAPROM FOOD INGREDIENTS Ltda, situada na cidade de Guaíçara, interior do estado de São Paulo. Essas duas matérias-primas diferem principalmente no tamanho e formato das partículas.

4.1.1 *Composição Centesimal*

Foi determinada a composição centesimal da fibra e do pó de colágeno. A umidade foi determinada pelo método gravimétrico, em estufa a vácuo (Tecnal TE-395), a 60°C até peso constante. As cinzas foram determinadas por incineração em mufla a 550°C por 10 horas. A determinação de proteína foi realizada pelo método de Kjeldahl, utilizando 5,55 como fator de conversão para o colágeno (AOAC, 1995). Os lipídeos foram determinados pelo método de Bligh-Dyer com extração a frio, utilizando uma mistura de clorofórmio e álcool metílico (CECCHI, 1999).

4.1.2 *Solubilidade*

A solubilidade do pó de colágeno foi determinada seguindo a metodologia citada por Stefabssoon e Hultin (1994). Dois gramas de pó de colágeno foram dispersos em 30 mL de água destilada. Em seguida, o pH foi ajustado de acordo com o requerido (de 2 a 12) com ácido acético glacial (Synth PA – ACS) ou hidróxido de sódio (Vetec NaOH – PA), usando, para medida, um pHmetro de bancada (TECNAL – TEC 2). A massa total da suspensão foi completada para 100 gramas com água destilada. Em seguida, a suspensão foi agitada em temperatura ambiente (25°C) durante 30 minutos e centrifugada posteriormente (SORVALL® Mod. RC5BPlus) a 8000 rpm, por 20 minutos, a 4°C. O teor de proteína das

soluções centrifugadas (proteína total) e dos sobrenadantes (proteína solúvel), foi determinado, em duplicata, pelo método de Kjeldahl (n x 5,55). A solubilidade foi calculada como a relação entre a proteína solúvel e a proteína total expressa em porcentagem (g de proteína solúvel/ 100 gramas de proteína total).

A solubilidade da fibra de colágeno foi determinada utilizando o mesmo método descrito acima, porém apenas no pH 3,00, por ser esse o valor estabelecido para a matriz filmogênica.

4.1.3 Isotermas de sorção de vapor de água

As isotermas de sorção de vapor de água para a fibra e para o pó de colágeno foram determinadas pelo método estático gravimétrico (SPIESS; WOLF, 1983). Foram usadas oito soluções salinas saturadas que fornecem ambientes de diferentes atividades de água, nas temperaturas de 15, 25, 35 e 45 °C, conforme mostra a Tabela 2:

Tabela 2. Relação dos sais e respectivas atividades de água utilizadas para determinação das isotermas de adsorção.

Sal	Nome	Marca	aw				Referência
			15°C	25°C	35°C	45°C	
MgCl ₂	Cloreto de magnésio	Dinâmica	33,7	32,7	32,1	31,6	Young, J.F., 1967
K ₂ CO ₃	Carbonato de potássio	Vetec	45,0	44,2	43,5	42,9	Labuza et al., 1985
NaBr	Brometo de sódio	Synth	60,6	57,8	54,6	51,7	Wink e Sears 1950
NaNO ₂	Nitrito de sódio	Vetec	66,5	64,5	62,5	60,7	Young, J.F., 1967
NaCl	Cloreto de sódio	Quimex	75,4	75,5	75,5	74,9	Young, J.F., 1967
KCl	Cloreto de potássio	Synth	86,2	84,3	82,7	81,4	Young, J.F., 1967
BaCl ₂	Cloreto de bário	Synth	90,8	90,4	89,7	88,9	Young, J.F., 1967
CuSO ₄	Sulfato de cobre	Synth	97,2	97,2	96,6	95,5	Young, J.F., 1967

Após as amostras atingirem peso constante, o seu teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico, usando estufa a vácuo a 60°C por 12 horas. Depois que os gráficos de atividade de água *vs* umidade de equilíbrio foram obtidos, foi feito ajuste do modelo de GAB (Guggenheim-Anderson-deBoer) aos dados experimentais.

4.1.4 Aminograma

O aminograma do colágeno foi determinado no laboratório LAB TEC – Laboratório de Alta Tecnologia localizado na cidade de Campinas-SP, através do método AOAC 994.12 (1995). A determinação do perfil de aminoácidos do colágeno foi feita por cromatografia de troca iônica com derivatização pós-coluna com ninidrina. O método consiste na hidrólise da proteína em meio ácido seguido da eliminação do ácido e dissolução dos aminoácidos, na forma livre, em tampão ácido. Os aminoácidos, em sua forma protonada, são introduzidos na coluna de troca iônica. As cargas positivas dos aminoácidos deslocam os íons sódicos ficando os aminoácidos adsorvidos à resina pelos grupos amínicos protonados ($-N^+H_3$). Os aminoácidos mais básicos são absorvidos mais fortemente pelas cargas negativas da resina, sendo eluídos da coluna por último à medida que se elevam os pH's dos tampões eluentes. São eluídos inicialmente os aminoácidos dicarboxílicos ácidos e neutros, e por último os de natureza básica. Ao saírem da coluna, os aminoácidos misturam-se com um fluxo de ninidrina. O produto de reação é quantificado num colorímetro. As áreas dos picos obtidos a partir da amostra desconhecida são quantificadas em comparação com as de uma mistura padrão de aminoácidos (SGARBIERI, 1996 apud MONTERREY-QUINTERO, 2000).

4.1.5 Granulometria

A granulometria da fibra do colágeno foi determinada partindo-se de 100 gramas de amostra, que foram dispersas em 4 litros de água por agitação em um agitador magnético (Nova Técnica) durante 10 minutos. Essa dispersão foi submetida ao peneiramento sucessivo em uma série de peneiras com aberturas decrescentes. A cada passagem, o material retido na peneira foi transferido para um Becker e seco em estufa a vácuo, aumentando a

temperatura em 10°C a cada dia, começando por 30°C alcançando 60°C, até peso constante, enquanto a suspensão passante era submetida a novo peneiramento. Foi necessário fazer a granulometria pela via úmida porque as fibras formam muitos grumos que não se desfazem pela vibração que o equipamento produz, onde normalmente essa análise é realizada.

Foram utilizadas sete peneiras, sendo a razão de abertura entre peneiras consecutivas fixada em $\sqrt{2}$, exceto para a sétima peneira que possuía a menor abertura entre as peneiras existentes no laboratório. Os valores das aberturas das peneiras estão na Tabela 3:

Tabela 3. Valores das aberturas das peneiras utilizadas para determinação granulométrica.

Abertura da Peneira (mm)
2,83
2,38
1,68
1,19
0,84
0,59
0,42
0,037*

* A peneira com essa abertura foi considerada como fundo.

É provável que se pense que possa haver um erro de medida da massa acumulada em cada peneira devido à umidade inicial que a fibra possuía antes de se realizar a análise granulométrica. Porém, considerando que a equação utilizada para prever o diâmetro médio da partícula leva em conta a fração mássica retida em cada peneira, esse erro não ocorre, porque em todas as peneiras, ou seja, em todas as determinações de massa a umidade foi negligenciada, o que leva a um mesmo resultado em fração.

O diâmetro médio (X_r) e a dispersão (N) da fibra foram calculados através do ajuste da equação de Rosin-Rammler (Equação 13) aos dados experimentais.

$$\varphi = 1 - \exp\left[-\left(\frac{t}{X_r}\right)^N\right] \quad (13)$$

Onde ϕ representa a fração mássica acumulada de diâmetro menor do que a partícula de tamanho t .

4.1.6 Análise térmica

Dispersões aquosas de colágeno em pH natural (7,8) e pH 3,0 (ajustado com ácido acético glacial) foram submetidas à análise térmica em um calorímetro diferencial de varredura (DSC) para estudo sobre a desnaturação do colágeno. Esse termo, pH natural, diz respeito ao valor de pH que o colágeno possui quando dispersado apenas em água destilada.

Para a análise de DSC, amostras com cerca de 10 mg de colágeno foram colocadas em cápsulas herméticas de alumínio TA, aquecidas numa taxa de 10°C/min, entre 0 e 100°C, em atmosfera inerte (45mL/min de N₂) em um DSC TA2010 controlado por um módulo TA5000 (TA Instruments, New Castle, DE, USA). A referência foi uma cápsula de alumínio vazia. As propriedades térmicas foram calculadas usando o *software* Universal Analysis V1.7F (TA Instruments). As análises foram feitas em triplicata e toda pesagem foi realizada em micro-balança ($\pm 0,01$ mg).

4.1.7 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Essa análise foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro Spectrum-One (Perkin-Elmer) provido com o acessório UATR, de acordo com Vicentini et al. (2005). Os espectros foram obtidos na faixa espectral de 400 a 4000 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹, com sobreposição de 20 varreduras. Os dados foram analisados com o programa FT-IR Spectrum Software (Perkin Elmer).

4.1.8 Reologia da Solução Filmogênica

A caracterização reológica das soluções formadoras de filme foi feita em um

reômetro de cilindros concêntricos (Rheotest 2.1, MLW, Alemanha), equipado com camisa para circulação de fluido termostático.

As soluções foram formuladas da seguinte maneira: pH 3,0; concentração de colágeno de 2,0% (g/100 g de solução); concentração de glicerol de 30% (g de glicerol/ 100 g de proteína). Todas as medidas foram feitas em temperatura de 30°C.

Variou-se a relação de fibra e pó de colágeno nos 2% correspondentes à concentração de colágeno da solução. Para constituir esses 2% de colágeno foram testadas soluções em que a razão entre a quantidade de fibra em relação ao total de colágeno foi de 0, 25, 50 e 75%.

4.2 Produção e caracterização dos filmes

Na formulação dos filmes foram utilizados 2 gramas de proteína (2,3530 gramas de colágeno)/ 100mL de água, 30 gramas de glicerol (Synth P.A.-ACS)/ 100 gramas de proteína e pH 3,00, usando para isso ácido acético glacial (Synth P.A.-ACS).

As soluções formadoras de filme foram preparadas dispersando o pó de colágeno em água destilada junto com o glicerol, ajustando para pH = 3,00, e foram mantidas em banho-maria por 81°C/ 1 min, e em seguida, sofriam resfriamento. Quando a solução alcançava temperatura ambiente, aproximadamente 25°C, era adicionada a proporção correspondente de fibra, para os filmes que a continha, seguida de agitação magnética por 15 min. Antes de serem adicionadas às soluções, as fibras foram mantidas sob agitação magnética por 30 min com o intuito de forçá-las a se separarem ao máximo uma das outras. A solução, então, foi aplicada em placas de plexiglass de 144 cm², as quais eram secas em estufas com circulação e renovação de ar (30°C/ 24 h). Os filmes tiveram suas espessuras controladas pela fixação da quantidade de matéria-seca (proteína + glicerol) presente em cada placa. Depois de secos, todos os filmes ficaram acondicionados em dessecadores com umidade relativa e temperatura controlada, 58% e 22°C, respectivamente, durante sete dias antes de serem submetidos aos testes. As caracterizações foram realizadas em cada um dos experimentos. Suas espessuras foram medidas através de um micrômetro digital ($\pm 0,001$ mm) com diâmetro da sonda de 6,4 mm, sendo adotado o valor médio de 10 medidas. Cada formulação foi feita em duplicata.

Inicialmente foi estudado o efeito do *casting* sobre a espessura dos filmes, ou seja, a gramatura que os filmes iriam possuir em função da quantidade de solução filmogênica aplicada nas placas. Depois, foram realizados seis diferentes tratamentos para analisar o efeito que a concentração de fibra de colágeno possui nas propriedades mecânicas e funcionais nos filmes elaborados. Para isso, variou-se apenas a proporção entre fibra e pó de colágeno, permanecendo a quantidade total de proteína. Os filmes foram denominados com relação à concentração de fibra presente na matriz, 0, 10, 20, 30, 40 e 50%.

É importante salientar que as fibras usadas na preparação dos filmes sofreram uma pré-seleção baseada no tamanho das partículas. Isso foi necessário porque, após alguns ensaios preliminares, observou-se que o uso de fibras muito grandes resultava em filmes com superfícies muito irregulares, prejudicando a determinação de suas propriedades. Assim, após sucessivos testes, determinou-se que as fibras utilizadas na formulação de todos os filmes seriam aquelas que passassem por uma peneira de abertura igual a 0,79 mm.

4.2.1 Solubilidade dos Filmes

Os testes de solubilidade dos filmes foram realizados segundo a metodologia proposta por Gontard et al. (1992). Três discos de cada amostra de filme, com 2 cm de diâmetro, previamente pesados, foram imersos em 50 mL de água destilada, contendo azida sódica (0,02% p/v), um agente antimicrobiano, a 25°C, e mantidos por 24 horas sob agitação de 63 rpm, após o qual, foi determinado o conteúdo de matéria seca não solubilizada por secagem a 105 °C por 24 horas. A solubilidade foi calculada conforme a Equação 14:

$$\%MS = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad (14)$$

onde: %MS: porcentagem de material solubilizado.

m_i : massa inicial da amostra.

m_f : massa final da amostra

4.2.2 Propriedades de Tensão e Elasticidade

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas por testes de tração, utilizando-se um texturômetro TA.XT2i (*Stable Micro Systems*). Os filmes foram cortados em tiras de 15 por 100 mm e cada extremidade foi fixada numa pequena placa de acrílico, a qual foi presa no *Probe* próprio para o teste de tração, onde as garras estão à 80 mm uma da outra (l_0) e foram tracionados a uma velocidade de 0,9 mm/s até a ruptura, onde possuíam comprimento igual a l . Nesse teste, foi determinado a força e a alongação máxima na ruptura, respectivamente em MPa e em % (l/l_0) e o módulo de elasticidade (MPa/ %), calculado na parte linear da curva obtida.

4.2.3 Propriedades de Barreira à Umidade

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos biofilmes em função da relação fibra e pó de colágeno foi determinada com base na norma E 96-80 da ASTM (ASTM, 1989). Os filmes foram fixados em células de permeabilidade contendo sílica-gel, mantendo-se uma distância superior a 6 mm entre o filme e a sílica. As células foram mantidas a 22 °C dentro de dessecadores contendo água destilada. O peso das células foi registrado em intervalos de 24 horas durante 7 dias. A permeabilidade ao vapor de água foi calculada empregando-se a Equação 15, que é o produto da permeância pela espessura do filme:

$$PVA = \frac{w}{t} \cdot \frac{x}{A \cdot \Delta p} \quad (15)$$

A relação w/t foi calculada por regressão linear dos pontos experimentais de ganho de massa (w) da célula de medida em função do tempo (t). A espessura média de cada biofilme, x , foi tomada como a média de 9 pontos; A é a área exposta do filme (12,566 cm²); Δp é o diferencial de pressão de vapor da água através do filme (Pa), considerando nula a pressão parcial da sílica-gel e 2643 Pa para a água pura a 22°C. A permeabilidade expressa em g.mm⁻¹.h⁻¹.m⁻²Pa⁻¹ foi medida em triplicata.

4.2.4 Cor e opacidade

Foi utilizado um colorímetro Miniscan (HUNTERLAB XE) para a determinação da cor e da opacidade de cada filme, trabalhando com iluminante D₆₅ (luz do dia), ângulo de incidência de 10°, abertura da célula de medida de 30 mm de diâmetro, usando a escala de cores dos parâmetros do sistema CIELab que se baseiam na percepção tricromática de uma visão normal, isto é, as cores são obtidas pelas combinações dos estímulos causados pelas três cores primárias (FERREIRA, 1991 citado por SARMENTO, 1999): L*, do preto (0) ao branco (100); a*, de verde (-) ao vermelho (+); e b*, do azul (-) ao amarelo (+) (SOBRAL, 1999, 2000).

Os parâmetros L*, a* e b* determinados diretamente pelo colorímetro num espectro varrido de 400 a 800 nm, foram utilizados para calcular a diferença de cor (ΔE^*) de acordo com a Equação 16 (GENNADIOS *et al.*, 1996)

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (16)$$

Para cada variação foram utilizados os seguintes padrões brancos: L* = 94,67; a* = 0,76; b* = 1,56.

A opacidade (Y) foi calculada utilizando o mesmo equipamento da medida de cor e seu cálculo foi realizado automaticamente pelo programa *Universal software 3.2* (HunterLab Associates Laboratory, 1997) de acordo com a relação entre a opacidade de cada amostra sobre o padrão preto (Y_p) e padrão branco (Y_b), conforme a Equação 17:

$$Y = (Y_p/Y_b) \times 100 \quad (17)$$

A escala de opacidade varia de 0 a 100%.

4.2.5 Microscopia

As análises da superfície dos filmes a base de colágeno foram realizadas

usando um esteromicroscópio Olympus (SZ 11), com aumento de 50X e com o objetivo de avaliar a interação entre as fibras de colágeno com a matriz filmogênica nas suas diferentes concentrações. Foram obtidas imagens dos filmes 0, 10, 30 e 50%.

4.3 Análise Estatística

Na comparação das médias dos valores obtidos em cada análise e para todos os ensaios, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) pelo teste F, e o teste de Tukey, para diferenciação das médias, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição centesimal da fibra e do pó de colágeno

O resultado da composição centesimal da fibra e do pó de colágeno é mostrado na Tabela 4. Esses dois compostos apresentaram teor de proteína, em base úmida (b.u.) na faixa de 86%. Esse resultado de porcentagem de proteína é superior aos resultados apresentados por Olivo e Shimokomaki (2001) em relação à análise centesimal de Isolado de Colágeno (I.C.), produto em formato de fibra obtido por liofilização seguida de trituração de colágeno de tendão bovino. Esses pesquisadores encontraram a porcentagem de $78,84 \pm 2,57$ para o produto pesquisado. É possível também notar na tabela que os valores de umidade se encontram na mesma faixa, em torno de 10%. Esses teores de proteína e umidade foram levados em conta para a formulação dos filmes.

Tabela 4. Composição centesimal da fibra e do pó de colágeno.

Componente	Fibra de colágeno	Pó de colágeno
	Conteúdo (g/ 100 g de colágeno b.u.)	Conteúdo (g/ 100 g de colágeno b.u.)
umidade	$9,25 \pm 0,07$	$10,67 \pm 0,3$
proteína	$85,61 \pm 0,59$	$85,84 \pm 0,55$
gordura	$0,81 \pm 0,06$	$1,6 \pm 0,14$
cinzas	$0,98 \pm 0,02$	$2,34 \pm 0,02$
TOTAL	96,65	100,45

5.2 Aminograma

A fibra e o pó de colágeno apresentam a mesma composição aminoacídica e o resultado está representado na Tabela 5. Glicina, prolina e ácido glutâmico são os três aminoácidos em maiores quantidades. O valor da glicina está bem próximo da quantidade esperada para o colágeno, que apresenta a conformação de uma glicina a cada três resíduos aminoacídicos. O percentual de hidroxiprolina está contido nos valores de prolina. Aminoácidos essenciais como a isoleucina, leucina, lisina, treonina e valina estão presentes na

amostra, mesmo que em pequenas quantidades (total de 12,586 g/ 100 g de proteína). Apesar do colágeno ter apresentado esses tipos de aminoácidos, não é possível atribuir-lhe valor nutricional, uma vez que é digerido pelo nosso organismo. O colágeno é tido como fibra alimentar e, portanto, atravessa nosso sistema digestivo sem sofrer hidrólise, não liberando, assim, seus aminoácidos, inclusive os essenciais. A cisteína também é outro aminoácido contido nesta amostra que não apresentou valores no I.C. e nem em colágeno do córeo bovino estudado por Gennadios et al. (1994). A cisteína é um aminoácido polar neutro com $pK_a=10,8$ que mesmo fazendo parte da proteína pode se oxidar formando cistina, composta por duas cisteínas ligadas por pontes dissulfeto. Está presente, dentre outras fontes, em pêlos dos animais. Esse fato nos leva a concluir que o colágeno analisado, que se apresenta em estado bruto, possivelmente continha alguns folículos pilosos que faziam parte da pele do animal que forneceu a matéria-prima.

O produto desenvolvido por Olivo e Shimokomaki (2001) apresentou um aminograma muito similar ao determinado neste trabalho. A glicina também foi o aminoácido com maior conteúdo na amostra ($18,13 \pm 2,10$ g/ 100 g de proteína). Ácido glutâmico e prolina obtiveram valores altos, porém, a arginina foi o aminoácido, depois da glicina, com maior concentração.

Tabela 5. Resultado do aminograma do colágeno.

	Aminoácido	g aminoácido por 100 g proteína
HFO	Alanina	9,336 \pm 0,066
HFI	Arginina	8,682 \pm 0,544
HFI	Ácido aspártico	5,630 \pm 0,481
HFO	Glicina	29,734 \pm 0,508
HFO	Isoleucina	1,562 \pm 0,044
HFO	Leucina	3,065 \pm 0,03
HFI	Ácido glutâmico	11,868 \pm 0,114
HFI	Lisina	3,613 \pm 0,151
HFI	Cisteína	0,232 \pm 0,037
HFO	Metionina	0,643 \pm 0,018
HFO	Fenilalanina	2,260 \pm 0,04
HFO	Tirosina	0,523 \pm 0,035
HFO	Treonina	1,873 \pm 0,111
HFO	Prolina	13,027 \pm 0,255
HFO	Valina	2,473 \pm 0,008
HFI	Histidina	0,703 \pm 0,062
HFO	Serina	2,980 \pm 0,122
	TOTAL	98,200

LEGENDA

HFI – Aminoácido hidrofílico

HFO – Aminoácido hidrofóbico

Como se pode observar, o colágeno apresentou seis aminoácidos hidrofílicos, dentre os dezessete analisados, o que dá, aproximadamente, 35%. Esse valor será importante nas discussões do próximo item.

5.3 Solubilidade do pó e da fibra de colágeno

A dependência da fração de proteína solúvel em relação ao pH pode ser observada na Figura 7, onde cada ponto representa a média de três medidas. A solubilidade variou consideravelmente na extensão do pH analisado, variando entre 28,9% e 52,5% de proteína solúvel, para o pó de colágeno.

No pH 2, a curva apresentou a solubilidade máxima, enquanto que na faixa de pH entre 6,0 e 8,0 a solubilidade foi mínima. Essa é a região onde se encontra o ponto isoelétrico do colágeno. A região de solubilidade crescente (pH 5 a 2) coincide com a quantia crescente de próton combinada com o pó de colágeno, conforme Boki e Kawasaki (1994).

Quando comparada à outras proteínas animais avaliadas para formação de filmes, como proteínas miofibrilares de tilápia do Nilo que apresentaram uma solubilidade máxima de 96,9% ao redor do pH 3, a solubilidade das proteínas de colágeno pode ser considerada baixa. Por outro lado, esta pode ser uma característica positiva, pois produtos feitos de colágeno solúvel apresentam menor resistência do que os feitos a partir de colágenos nativos (FIGUEIRÓ et al., 2004).

O pH 3,00 foi o escolhido para a formulação básica dos filmes avaliados neste trabalho. Isso porque, nesse valor, praticamente metade do pó de colágeno presente na solução filmogênica estará solúvel e a outra metade poderá atuar como um reforço na matriz. Tudo isso em se tratando dos filmes formulados apenas com o pó de colágeno.

Com o pH de preparação dos filmes fixado, ensaios de solubilidade para a fibra de colágeno só foram realizados no pH = 3,00, onde se observou que apenas pouco mais de 10% de fibra são solúveis nessa condição.

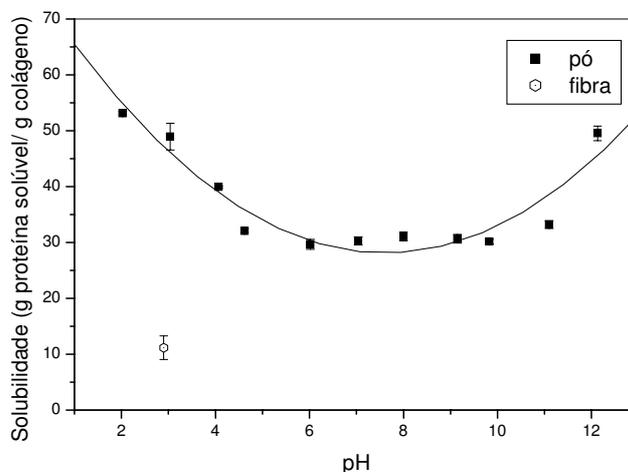


Figura 7. Solubilidade em água (g de proteína solúvel/ 100g de colágeno total na suspensão), do pó e fibra de colágeno.

Voltando aos dados da composição aminoacídica do colágeno, em que aproximadamente 35% dos aminoácidos que o compõe é hidrofílico, observa-se, na figura acima, que a região onde a solubilidade apresentou seus menores valores, próximo ao pH natural, para o pó de colágeno, está próxima dos 35% de solubilidade.

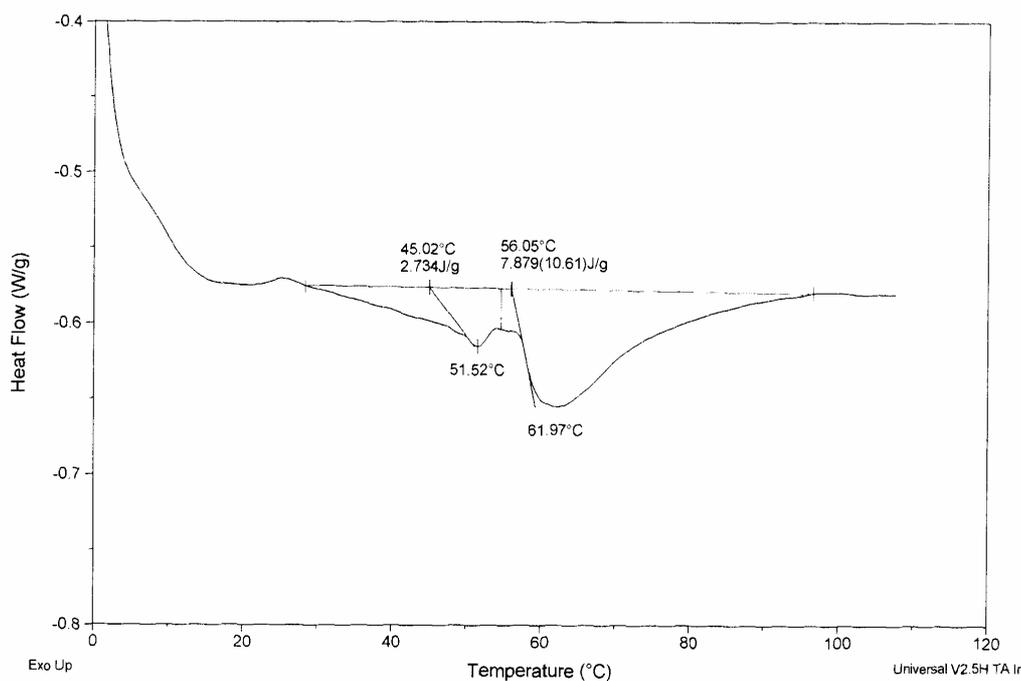
5.4 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Termogramas representativos do colágeno em pH natural e em pH 3,0, obtidos por calorimetria diferencial de varredura são mostrados nas Figuras 8A e 8B. Foram encontradas largas endotermas durante aquecimento, as quais indicavam a desnaturação das proteínas das fibras de colágeno. A temperatura de desnaturação dessas proteínas foi considerada a temperatura onde os picos endotérmicos foram observados (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000).

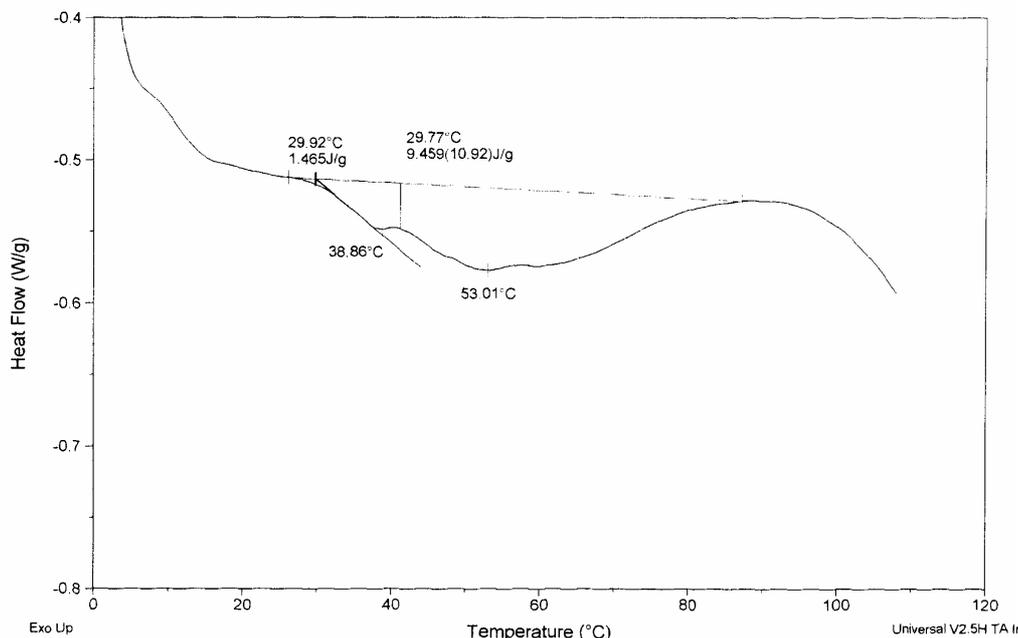
Ao pH natural (Figura 7A), foram descobertos dois picos, nas temperaturas $51,48 \pm 3,04$ °C e $63,42 \pm 1,41$ °C. Também foram observados dois picos endotérmicos para colágeno a pH 3,0 (Figura 7B), mas as temperaturas de pico foram mais baixas: $39,52 \pm 1,84$ °C e $52,54 \pm 2,88$ °C, respectivamente. Em pH baixo os picos apresentaram menor definição que ao pH natural. A diminuição na temperatura de desnaturação a baixo pH indica mais baixa estabilidade térmica de proteínas, o que pode ser uma consequência da mudança de

conformação induzida pelas interações entre moléculas de proteína e os íons de hidrogênio presente no meio ácido. Estas interações conduzem à uma maior hidratação do colágeno, como já foi indicado pela alta solubilidade observada em baixos pH's.

Friess e Lee (1996) observaram a desnaturação de colágeno insolúvel extraído de tendões bovinos e dispersado em água em pH 3,5 com um pico endotérmico que se iniciava em 35°C, com um máximo a 43°C. Durante aquecimento e subsequente resfriamento da amostra, não foi descoberto nenhum pico correspondente, indicando que a desnaturação havia sido completa e irreversível. Termogramas de matrizes de colágeno mostraram uma redução na temperatura de desnaturação, de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho. Figueiró et al. (2004) mediram uma temperatura de desnaturação de 52,2 °C para filmes feitos com colágeno preparado por solubilização de pele bovina e homogeneizados em solução a pH 3,5.



A)



B)

Figura 8. Termogramas do colágeno em pó: A) pH natural, B) pH 3,0.

5.5 Isotermas de sorção de vapor de água

Os dados de umidade de equilíbrio em base seca (b.s.) para o pó e para a fibra de colágeno, na faixa de atividades de água de 0,316 a 0,972, nas temperaturas de 15, 25, 35 e 45°C são apresentados na Figura 9. Os valores são médias de três amostras, as quais permaneceram, em média, cinco semanas nos recipientes com umidade relativa correspondente para alcançar a umidade de equilíbrio.

É possível notar que o colágeno é uma proteína bastante higroscópica, alcançando valores próximos a 65% (b.s.) de umidade de equilíbrio e que em todas as temperaturas, a fibra atingiu maior umidade de equilíbrio do que o pó, exceto no ponto referente ao sal CuSO_4 (a_w variando de 0,955 a 0,972). Sablani et al. (2002), determinaram as isotermas de sorção para gelatinas obtidas através da hidrólise ácida do colágeno de porco, com pesos moleculares diferentes (317,700, 228,900 e 197,400 Da) na temperatura de 50°C, observando que as gelatinas com menores pesos moleculares, ou seja, com menor número de moléculas em sua estrutura, apresentaram menores umidades de equilíbrio.

Como esperado, a umidade de equilíbrio aumentou com o aumento da atividade de água. Os valores reais das umidades de equilíbrio para as duas determinações encontram-se no Anexo 1. É possível notar que os valores da umidade de equilíbrio a 45°C foram superiores aos valores de 35°C, em se tratando do pó de colágeno, caracterizando um comportamento diferente do observado nas outras duas temperaturas (25 e 35°C) quando comparadas com as subjacentes. Entretanto, a análise estatística dos valores de cada temperatura para as oito diferentes atividades de água mostrou que exatamente metade desses pontos não apresentou diferença significativa ($\alpha=0,05$) entre as temperaturas de 35°C e 45°C. Portanto, sugere-se que possa haver indícios de modificações na estrutura do colágeno que começam a ocorrer a partir de 45°C, as quais podem ser observadas nos resultados dos ensaios de calorimetria diferencial de varredura (Figura 8).

Por outro lado, a fibra não apresentou o mesmo comportamento, ou seja, não houve modificações em sua estrutura e conseqüente aumento da umidade de equilíbrio na temperatura de 45°C.

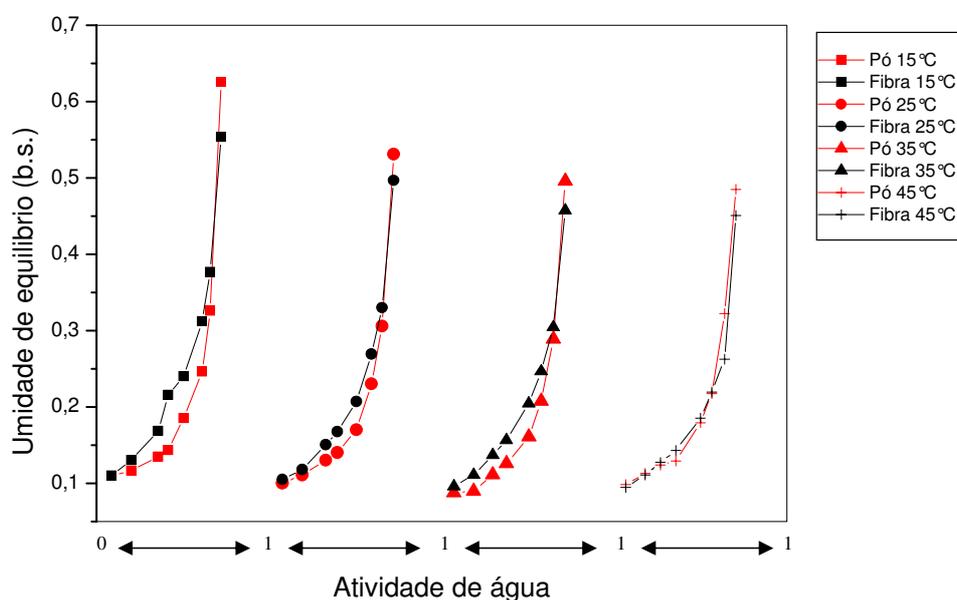


Figura 9. Isotermas de adsorção de vapor de água da fibra e do pó de colágeno.

O modelo de GAB (Guggenheim-Anderson-De Boer) (Equação 8) foi ajustado aos resultados obtidos e é apresentado na Tabela 6A e 6B, para o pó e fibra de

colágeno, respectivamente. Como esperado a umidade da monocamada diminuiu com o aumento da temperatura, exceto para o ensaio do pó de colágeno a 45 °C. Contudo, houve uma inversão da seqüência dos valores do parâmetro C. Enquanto que no pó de colágeno esse parâmetro diminui com o aumento da temperatura, na fibra, eles aumentaram.

Tabela 6A. Parâmetros da equação de GAB para o pó.

Temperatura (°C)	PARÂMETROS			R ²	RMS (%)
	C	K	X _m		
15	870	0,9194	0,0588	0,99	12,24
25	500	0,9223	0,0541	0,98	11,68
35	350	0,9303	0,0497	0,99	8,67
45	300	0,9191	0,0589	0,99	9,07

Tabela 6B. Parâmetros da equação de GAB para a fibra.

Temperatura (°C)	PARÂMETROS			R ²	RMS (%)
	C	K	X _m		
15	120	0,8783	0,0797	0,99	4,83
25	300	0,8814	0,0702	0,99	3,85
35	600	0,8791	0,0679	0,99	3,13
45	1000	0,9033	0,0593	0,97	9,83

O calor isostérico de sorção (q_{st}) da fibra e do pó de colágeno foi calculado através da equação de Clausius-Clapeyron para obtenção dos pontos da Figura 10A e 10B, respectivamente para fibra e pó de colágeno, e pela subsequente regressão linear. Para isso, algumas umidades de equilíbrio (X_{eq}) tiveram que ser escolhidas.

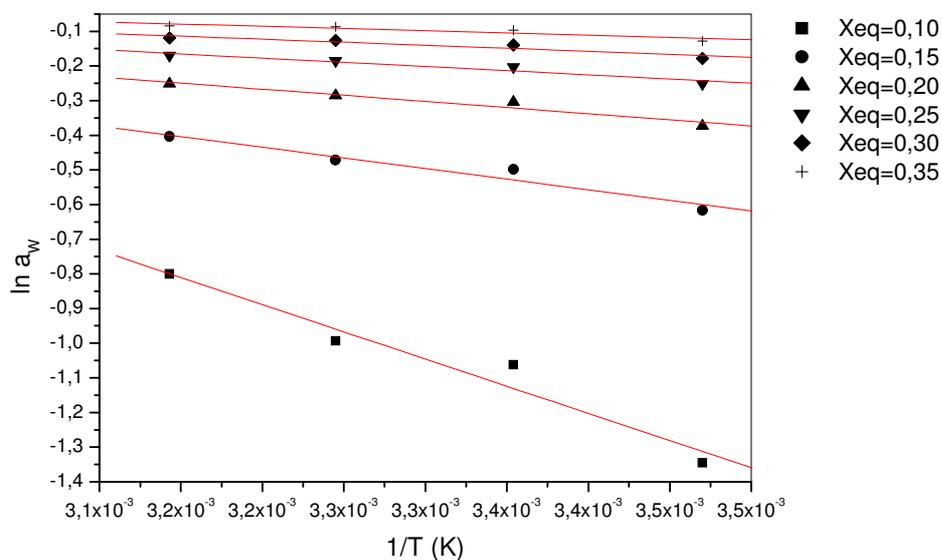


Figura 10A. Relação entre atividade de água e temperatura absoluta da fibra de colágeno.

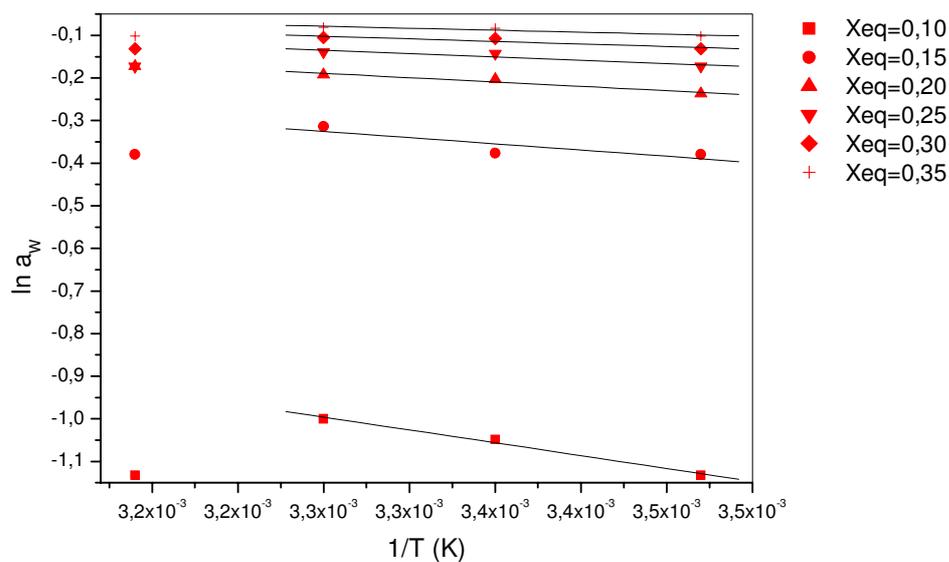


Figura 10B. Relação entre atividade de água e temperatura absoluta do pó de colágeno.

Devido à inversão dos valores observada na temperatura de 45°C para o pó de colágeno, o seu calor isostérico foi calculado apenas com base nas outras três temperaturas (15, 25 e 35°C). A influência da umidade sobre o calor de sorção da fibra e do pó de colágeno é apresentados na Figura 11, e como se pode observar, a fibra possui maiores valores para todas as umidades de equilíbrio estudadas.

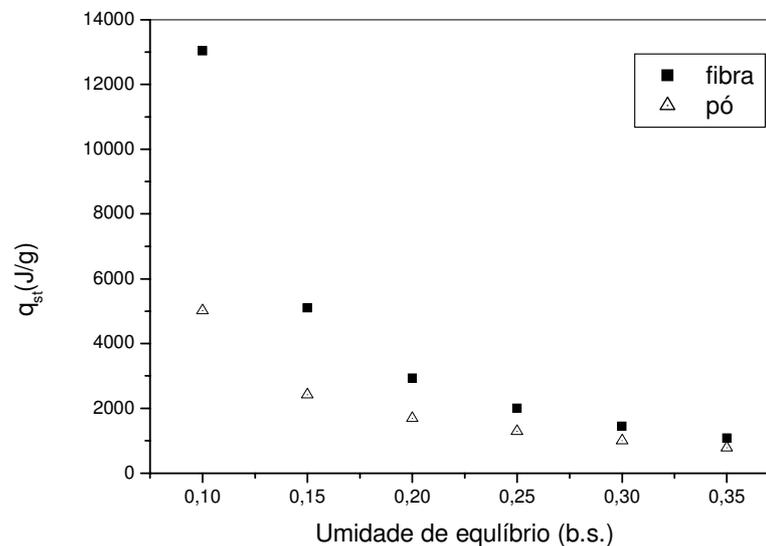


Figura 11. Influência da umidade no calor de sorção da fibra e do pó de colágeno.

Por ser a fibra mais higroscópica do que o pó de colágeno é natural que seu calor isostérico também seja maior. Isto quer dizer que é necessário maior quantidade de energia para se retirar a mesma quantidade de água da fibra do que no pó.

5.6 Granulometria

As análises granulométricas da fibra de colágeno foram realizadas em triplicata, e seus valores médios encontram-se na Tabela 7. Fração e massa retida nos respectivos diâmetros das peneiras fazem parte dessa tabela. A última peneira, de abertura 0,037 mm, foi considerada o fundo, e conseqüentemente a massa de fibra de colágeno retida foi acatada como finos. Isso porque, como se trata de uma determinação granulométrica via úmida, o fundo não poderia ser fechado.

Tabela 7. Resultados da análise granulométrica da fibra de colágeno.

Abertura da peneira (mm)	Massa retida (g)	Fração retida
2,83	-----	
2,38	16,98 ± 1,07	0,2014
1,68	21,44 ± 2,72	0,2544
1,19	22,82 ± 3,85	0,2707
0,84	10,66 ± 2,37	0,1265
0,59	4,98 ± 0,94	0,0591
0,42	3,82 ± 0,31	0,0453
0,037	3,59 ± 0,42	0,0426
Total	84,29	1,0000

Para essa análise partiu-se de 100 gramas de fibra de colágeno, sendo que a massa final retida foi de apenas 84,29 gramas. Levando em conta que a fibra possui aproximadamente 10% de umidade, pode-se considerar que na verdade foram 90 gramas iniciais, uma vez que para determinar a quantidade de massa retida foi necessário primeiramente secá-las. Com isso, obteve-se uma porcentagem de fibra recuperada próxima aos 94%. Esse valor é semelhante ao encontrado por Yan e Barbosa-Cánovas (1997) quando determinaram a distribuição granulométrica de leite em pó, açúcar e fubá. Os valores da distribuição granulométrica da fibra de colágeno é mostrada na Figura 12.

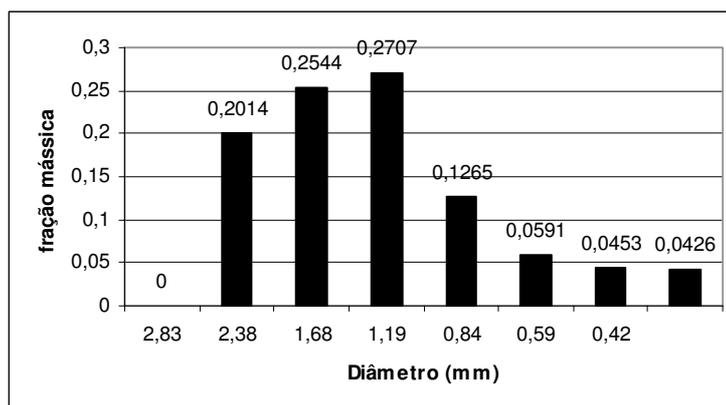


Figura 12. Distribuição granulométrica da fibra de colágeno.

Para determinar o tamanho médio da partícula, é necessário fazer a distribuição da fração de acumulados (Figura 13), que diz respeito à soma das massas acumuladas menores que a abertura da peneira.

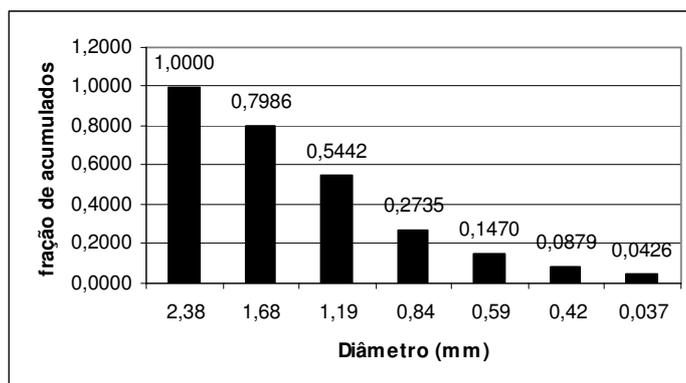


Figura 13. Fração mássica da fibra de colágeno.

Ajustando a equação de Rosin-Rammler (Equação 13) aos dados experimentais, é possível observar na Figura 14 que o diâmetro médio da fibra é de 1,34 mm (valor de X_r), e a dispersão é de 2,27 mm (valor N), para valores de $r^2=0,99$.

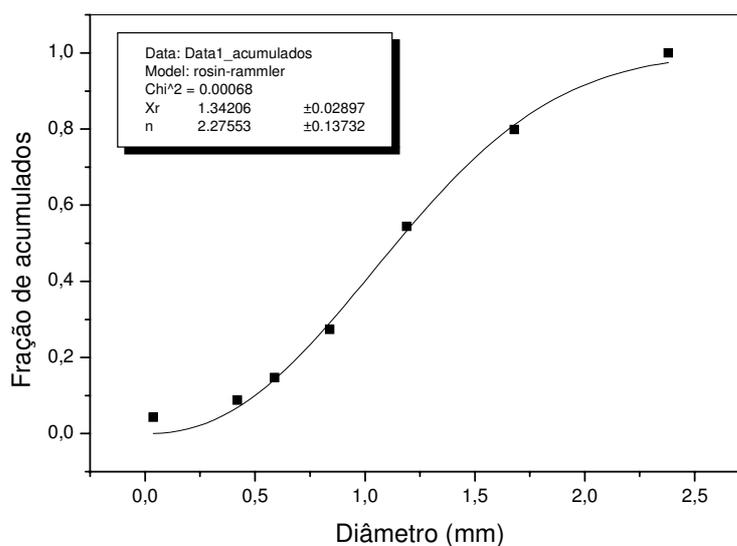


Figura 14. Ajuste da função Rosin-Rammler aos dados experimentais de granulometria.

Segundo Ahmed e Jones (1990), a distribuição das partículas com diferentes tamanhos podem preencher mais densamente do que partículas mono dispersadas porque as menores partículas preenchem os espaços intersticiais das maiores.

Apesar dessa análise granulométrica ter sido bastante esclarecedora, não foi possível utilizar nos filmes a fibra de colágeno com sua granulometria original. Nos testes em que as fibras faziam parte da formulação, muitos grumos apareciam nas superfícies dos filmes

e esse problema se intensificava à medida que a concentração de fibra aumentava, prejudicando, assim, a medição das espessuras dos filmes. Esses valores são levados em conta na determinação de outras propriedades, como por exemplo, a tração e a permeabilidade. Sendo assim, como mencionado no item 4.2, as fibras utilizadas na preparação dos filmes sofreram um peneiramento prévio, sendo utilizadas apenas aquelas que passaram por uma peneira de abertura igual a 0,79 mm.

5.7 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

O espectro do colágeno é mostrado na Figura 15 onde os eixos do gráfico são o número de onda em cm^{-1} pela absorbância da amostra (A). Fibra e pó de colágeno apresentam espectros muito próximos, uma vez que se trata da mesma molécula, e por isso só será mostrado um, válido para os dois compostos.

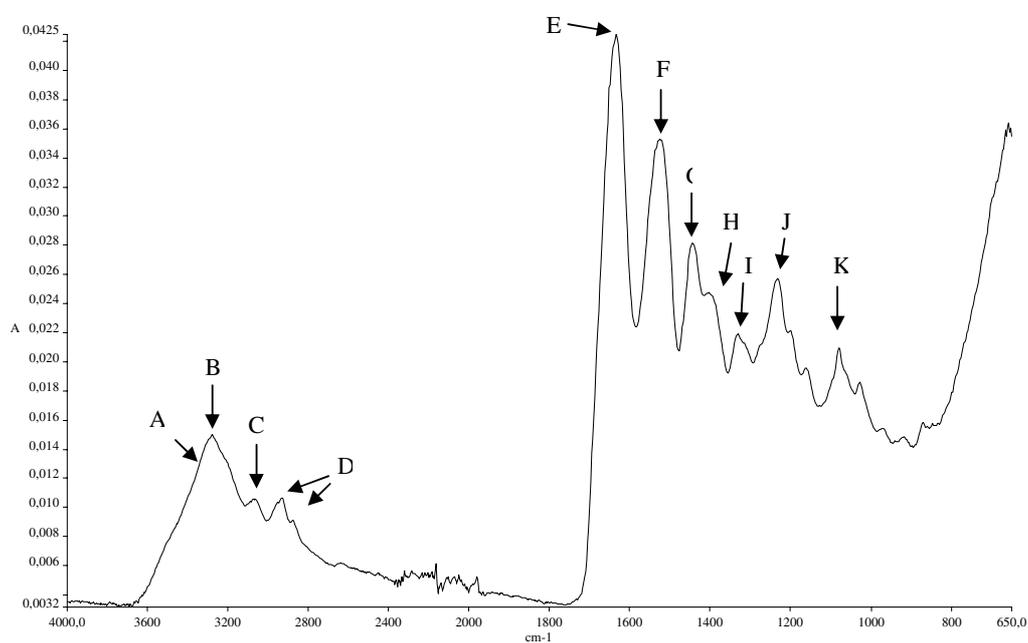


Figura 15. Espectro de absorção de infravermelho do colágeno.

Por causa da variabilidade dos espectros infravermelho serem limitados, proteínas podem ser facilmente distinguidas de outras moléculas biológicas, como

carboidrato, lipídeos e ácido nucléico. Yannas (1972) citado por Arvanitoyannis (1999) também determinou espectros para colágeno e gelatina, encontrando curvas muito próximas às apresentadas acima, e, segundo esses autores, as bandas que aparecem no gráfico, representadas pelas letras de A a K, correspondem às seguintes estruturas químicas:

Tabela 8. Representações das bandas do espectro de infravermelho do colágeno.

LETRA	REPRESENTAÇÃO
A	Água livre
B	Estiramento de N-H
C	Amida II
D	Estiramento de C-H
E	Estiramento de C=O (Amida I)
F	N-H (Amida II) e C-N
G	-CH ₂ e -CH ₃ (assimétrico)
H	-COO ⁻
I	Estiramento de -C-N e -N-H no plano (Amida III)
J	CO (vibrações de -OH)
K	Deformação de N-H

Fonte: Arvanitoyannis, 1999.

Os autores citados estudaram as variações que o colágeno sofre quando é hidrolisado e torna-se gelatina. Eles verificaram que algumas bandas sofrem pequenas diminuições, e esse efeito é mais acentuado na banda I (Estiramento de -C-N e -N-H no plano). Isto ocorre pelas mudanças estruturais que o colágeno sofre na sua conformação quaternária.

Neste trabalho, a técnica de FTIR foi aplicada com os objetivos de permitir a familiarização do autor com o equipamento utilizado e, acima de tudo, obter dados para comparações com a espectroscopia dos filmes de colágeno, o que se pretende obter em trabalhos futuros. A comparação desses espectros poderá fornecer detalhes sobre a existência de interações químicas entre os componentes dos filmes.

5.8 Reologia da solução filmogênica

As curvas de escoamento da solução formadora de filme apresentaram comportamento pseudoplástico em função da concentração de fibra de colágeno na solução, em condições isotérmicas e pH fixado em 3,00. Nas Figuras 16A, 16B, 16C e 16D pode-se ver, respectivamente, os resultados (duplicata) das soluções com 0, 25, 50 e 75% (g de fibra/ g de colágeno na solução). Observa-se que com o aumento da concentração de fibra a curva torna-se mais côncava, distanciando, assim, do comportamento Newtoniano.

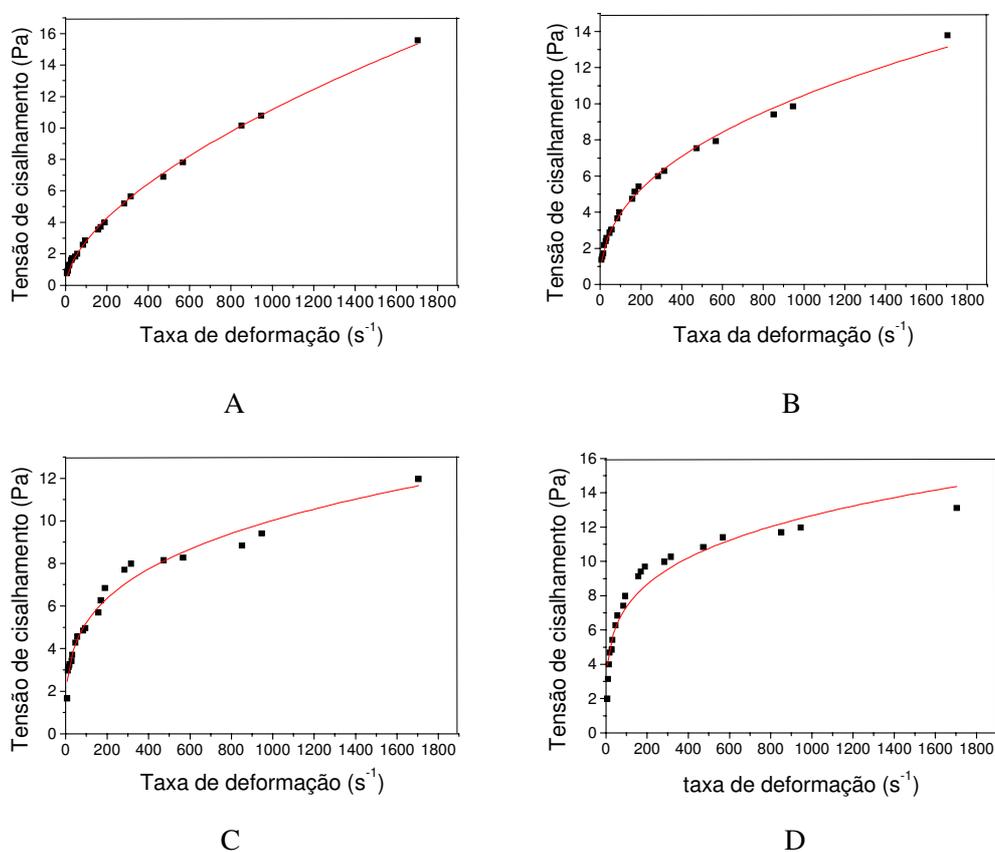


Figura 16. Comportamento reológico da solução formadora de filme em função da concentração de fibra: **A)** 0% de fibra (g/ 100 g de colágeno); **B)** 25% de fibra (g / 100 g de colágeno); **C)** 50% de fibra (g / 100 g de colágeno); **D)** 75% de fibra (g/ 100 g de colágeno).

Após o ajuste da Lei da Potência (Equação 11) aos resultados obtidos de cada ensaio, foram determinados os parâmetros k , índice de consistência, e n , índice de comportamento (Tabela 9).

Tabela 9. Parâmetros reológicos da Lei da Potência da solução formadora de filme em função da concentração de fibra de colágeno (g / 100 g de colágeno na solução).

índice	Relação g de fibra/ 100 g de colágeno na solução			
	0%	25%	50%	75%
consistência, k (Pa.s ⁿ)	0,19 ± 0,01	0,58 ± 0,05	1,44 ± 0,03	2,49 ± 0,01
comportamento, n	0,59 ± 0,01	0,40 ± 0,03	0,33 ± 0,07	0,23 ± 0,01

O valor de k aumenta e o de n diminui com o aumento da concentração de fibra de colágeno na solução formadora de filme, numa dependência linear mostrada nas Figuras 17 e 18. Isso mostra que à medida que a concentração de fibra aumenta, a viscosidade aparente da solução filmogênica também aumenta devido ao formato alongado e a baixa solubilidade que a fibra possui.

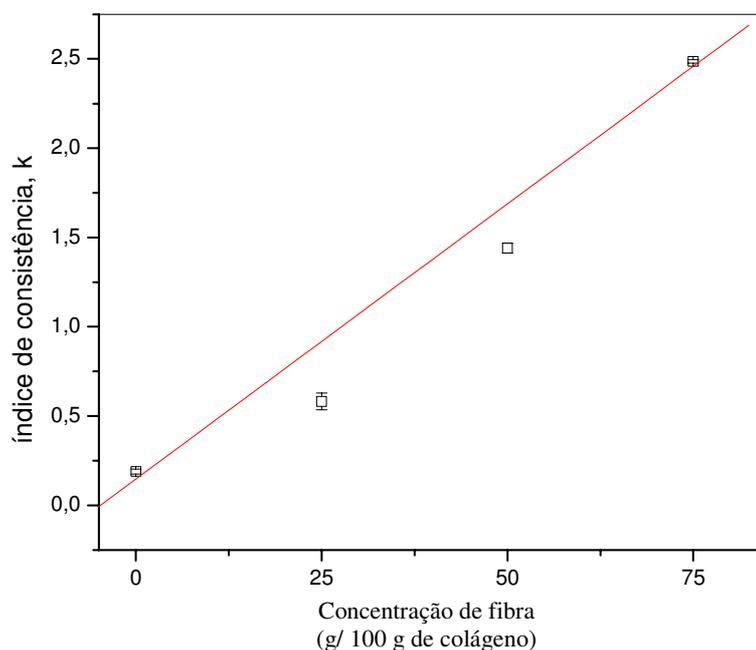


Figura 17. Variação do índice de consistência (k) da solução formadora de filme em função da concentração de fibra de colágeno (g/ 100 g de colágeno na solução).

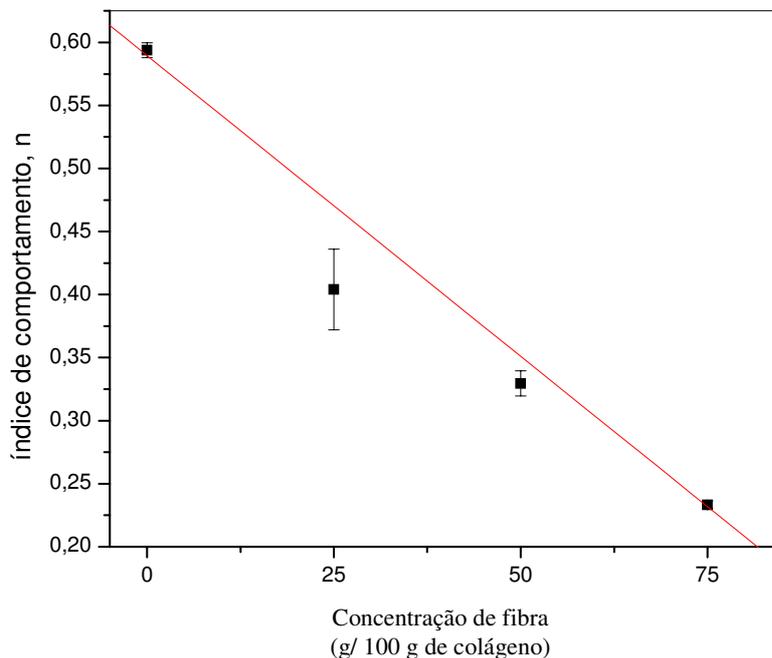


Figura 18. Variação do índice de comportamento (n) da solução formadora de filme em função da concentração de fibra de colágeno (g/ 100 g de colágeno na solução).

Após as respectivas regressões lineares dos pontos de índice de consistência e comportamento, foram determinadas as seguintes equações das retas (Tabela 10).

Tabela 10. Equação das retas de índice de consistência (k) e comportamento (n) em função da concentração de fibra de colágeno na solução filmogênica.

Parâmetro	Equação da reta	R ²
k	$y = 0,01214 + 0,03099x$	0,98
n	$y = 0,5635 - 0,00462x$	0,97

5.9 Filmes

Testes preliminares mostraram que o pó possui excelente capacidade filmogênica (Figura 19A) e que a formulação da solução formadora de filme composta apenas por fibra de colágeno não possuía a capacidade de formar filmes coesos e manipuláveis (Figura 19C), devido a baixa solubilidade da fibra. Por isso, determinou-se que seriam feitos

filmes a partir do pó de colágeno, usando como compósito reforço até 50% de fibras de colágeno em sua composição, ou seja, filmes com 50 gramas de fibras a cada 100 gramas totais de colágeno na matriz, sendo as 50 gramas restantes de pó de colágeno. As imagens deste filme pode ser observada na Figura 19B.

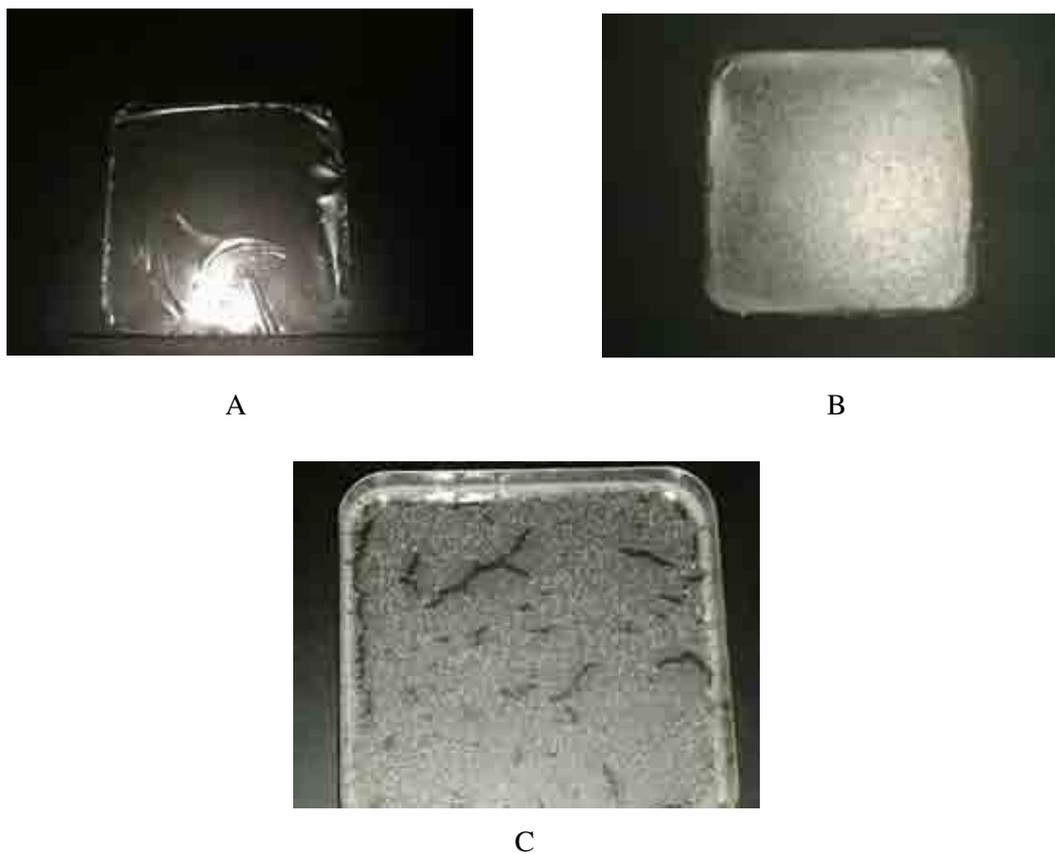


Figura 19. Imagens dos filmes de colágeno: A) 0% de fibra B) 50 % de fibra C) 100% de fibra.

5.9.1 Espessura média e umidade

Como mencionado anteriormente, o diâmetro da fibra foi um problema para obtenção de um filme com a superfície lisa. Portanto, para se determinar a quantidade de matéria seca por filme foi necessário varrer uma faixa de quantidade de solução formadora de filme aplicada em cada placa, obtendo as respectivas gramaturas. A Figura 20 mostra as

espessuras correspondentes à aplicação de 30, 40, 50, 70, 90 e 100 g de solução filmogênicas de filmes 50% dividido pela área da placa onde são formados (144 cm^2). Aumentando a quantidade de solução aplicada, conseqüentemente também aumenta a espessura. Como pode ser observado, em pequenas aplicações o desvio padrão é maior. Aplicações com 90 e 100 gramas de solução já conseguem encobrir as fibras de colágeno e diminuir o erro da espessura. Foi utilizado o filme de 50% de fibra porque neste torna-se mais evidente a influência que a fibra pode causar na superfície dos filmes.

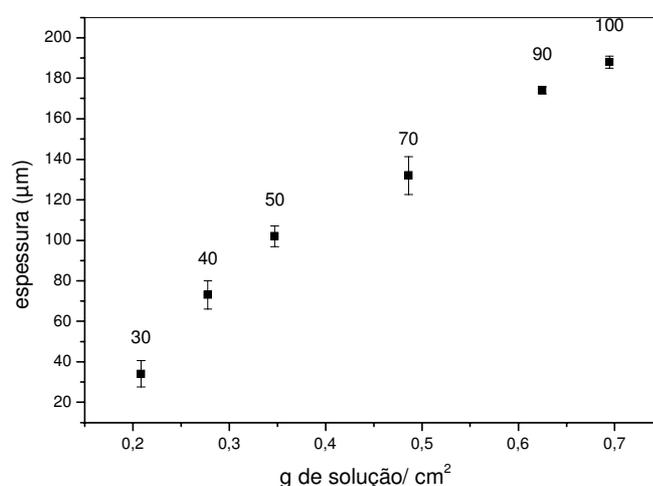


Figura 20. Espessuras dos filmes de acordo com a quantidade de solução filmogênica aplicada.

O segundo passo foi encontrar a quantidade de matéria seca presente em cada filme em todas as quantidades de solução aplicada. Isso resulta na transformação do eixo das abscissas em gramas de matéria seca por área. Para realizar este cálculo, foram considerados os conteúdos médios de 85% de proteína e 10% de umidade do colágeno. Considerando que a quantidade de glicerol faz parte da matéria seca presente nos filmes, então, cada filme contém 0,02639 g matéria seca/ g solução filmogênica, o que permite calcular a massa de matéria seca por unidade de área de cada filme (Figura 21).

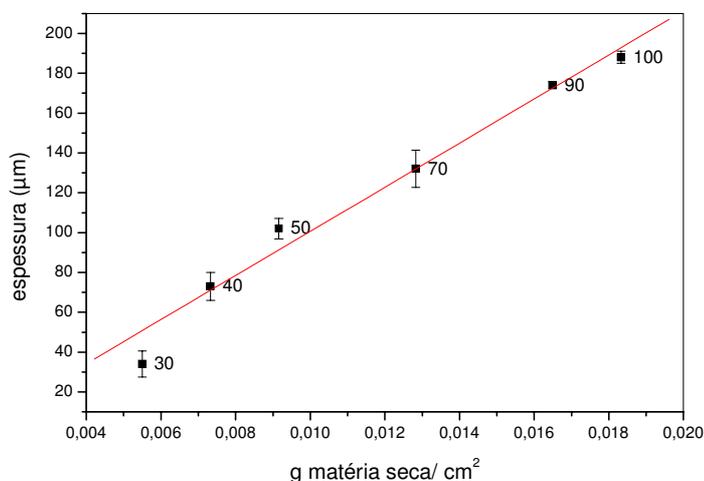


Figura 21. Quantidade de matéria seca por cm² dos filmes.

A regressão linear do gráfico acima ($r^2 = 0,99$) fornece uma equação da reta com o valor de:

$$Y = 11070,57x - 10,09 \quad (17)$$

Portanto, fixando a espessura dos filmes em 180 μm, chega-se à quantidade de matéria seca presente em cada placa em 17 mg/ cm². Esse valor de espessura foi adotado para que as fibras permanecessem completamente envoltas pela matriz filmogênica e não influenciassem erroneamente em suas medidas. Além disso, adotou-se um valor de 10% para o coeficiente de variação das espessuras de todos os filmes, de modo que apenas os filmes que se apresentavam dentro desse valor foram submetidos às análises.

Esse valor de espessura está próximo dos filmes desenvolvidos por Noishiki et al. (2002), que aplicaram uma fibra microcristalina de seda em filmes de celulose e obtiveram espessuras variando de 70 a 170 μm.

Na análise de umidade, realizada através de secagem em estufa a 105 °C/ 24 h, os filmes apresentaram um valor médio de $14,11 \pm 1,4\%$ de umidade. Esses valores de umidade estão próximos dos obtidos por Avérous et al. (2001), que utilizaram celulose como reforço para filmes de amido de trigo e obtiveram umidade igual a 12,0%.

5.9.2 Tração

Curvas ilustrativas dos resultados dos testes de tração são mostradas na Figura 22, onde a extremidade de cada curva representa o momento de ruptura do filme. A curva de cor vermelha, a que possui maior elongação e menor força na ruptura, refere-se ao filme 0%, ou seja, elaborado apenas com o pó de colágeno. Seguindo em direção ao eixo das ordenadas, encontra-se, em seqüência, as curvas dos filmes 0, 10, 20, 30, 40 e 50%.

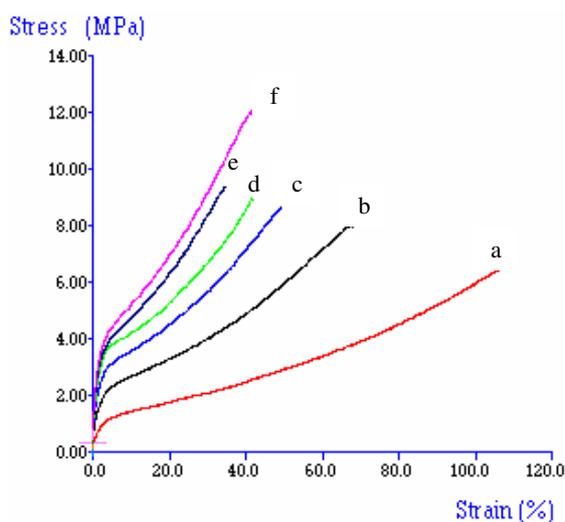


Figura 22. Curvas típicas dos resultados do teste de tração dos filmes de colágeno:

a) 0%; b) 10%; c) 20%; d) 30%; e) 40%; f) 50%.

Os resultados do teste de tração referentes à resistência a ruptura são apresentados na Figura 23, onde os valores são médias de 10 repetições. É possível observar que o aumento da concentração de fibra nos filmes aumenta a sua resistência à ruptura na faixa de 0 a 50%, alcançando um valor máximo de $12,53 \pm 0,73$ MPa. Estatisticamente os dois primeiros pontos do gráfico não diferem significativamente entre si, no nível de 5%, podendo-se atribuir à curva um caráter exponencial.

Esses valores encontrados no teste de tração são superiores àqueles obtidos por Sastry et al. (1998) para filmes compostos por fibrina e gelatina (1,25 MPa) plasticizados com etileno glicol e que também apresentavam o teor de umidade na faixa dos 14%.

O aumento da resistência à ruptura pode ser explicado pela adequada ligação interfacial entre a fibra e a matriz e à boa distribuição das fibras, que permite a efetiva

transferência de pressão da matriz para as partículas (Anglès et al., 1999; Sihna Ray; Okamoto, 2003, Abdelmouleh, Boufi, Belgacem, Dufresne; Gandini, 2005, Wetzal, et al., 2003; Ahmed; Jones, 1990).

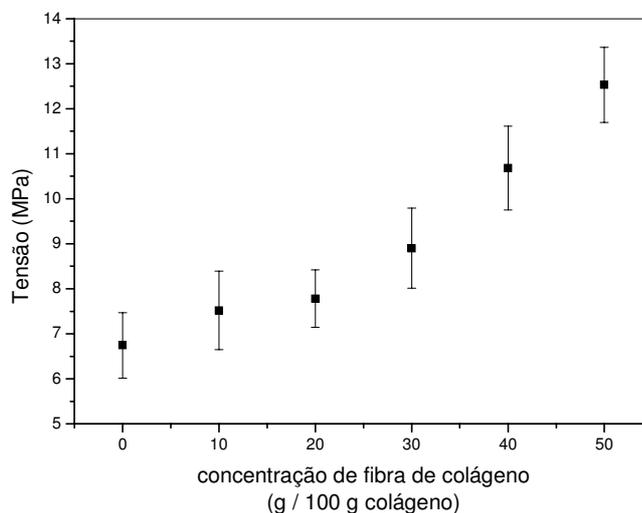


Figura 23. Resultado do teste de tração dos filmes de colágeno em função da variação da concentração de fibra.

Em alguns trabalhos, como por exemplo, o realizado por Abdelmouleh et al. (2005) que adicionaram fibras de celulose tratadas com silanos (SiH_4), compostos análogos ao metano, porém, derivado do silício, em filmes de resina epóxi e poliéster, a resistência à ruptura aumentou com o aumento da quantidade de fibra até um determinado ponto e depois começou a decair. Esses autores obtiveram uma resistência máxima para o filme com 45% de fibra e atribuíram a queda posterior em sua resistência, provavelmente ao recobrimento insuficiente da fibra pela resina. Esse comportamento não ocorreu no presente trabalho. Provavelmente se outros experimentos fossem realizados, com maior concentração de fibra, chegar-se-ia a um ponto em que a resistência à ruptura começaria a decair.

Na Figura 24 está o resultado para a elongação máxima desenvolvida pelos filmes de colágeno. Neste caso o comportamento foi inverso ao da ruptura, pois com o aumento da concentração de fibra a elongação diminuiu até a concentração de 40%, enquanto para filmes com 50% de fibra, houve um aumento estatisticamente significativo ($\alpha = 0,05$). Esse mesmo comportamento foi observado por Avérous et al. (2001) que formularam filmes a base de amido com adição de celulose, e os resultados referentes à elongação tiveram um decréscimo com o aumento da concentração da fibra até determinada porcentagem de adição.

De modo semelhante ao observado neste trabalho, na mesma concentração não houve diminuição na resistência máxima à ruptura. Isso indica que o filme ficou mais poroso, pois se distendeu mais, porém, as fibras ainda estavam fazendo parte da matriz e conseguiram resistir à ação da tensão à ruptura.

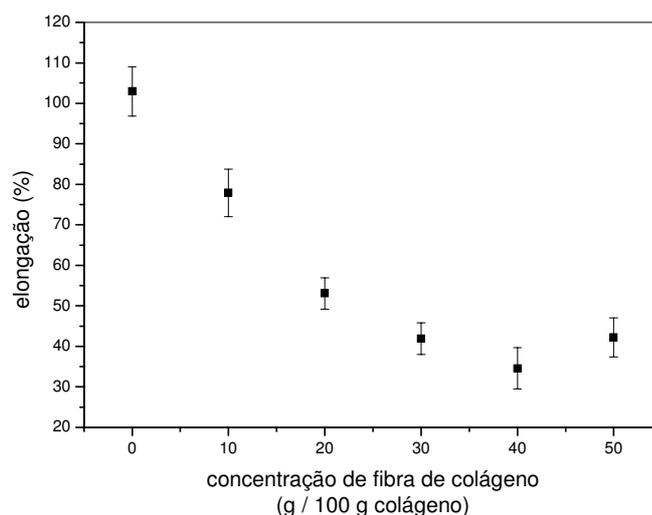


Figura 24. Resultado do teste de elongação dos filmes de colágeno em função da concentração de fibra.

Os resultados para o módulo elástico (Módulo de Young) são mostrados na Figura 25. Houve muita variação entre os valores obtidos, mas mesmo assim a curva tende a crescer com o aumento da concentração de fibra. Apesar de, no gráfico, o último ponto sofrer uma queda, estatisticamente ($\alpha = 0,05$) os valores correspondentes a 40 e 50% de fibra não diferem entre si, porém esses dois pontos diferem do anterior, ou seja, do ponto correspondente a 30%.

Anglès et al. (1999) estudaram a ação de serragem como reforço em filmes de polipropileno. Para isto, utilizaram dois tipos de fibra, acrescentando-as à matriz filmogênica numa proporção de 0 a 60%. Num primeiro teste, não houve adesão entre a fibra e a matriz e, portanto, os valores do módulo elástico ficaram independentes da concentração de fibra. Em outro teste, ocorreu a interação do reforço com a matriz e, conseqüentemente, os valores do módulo elástico cresceram, mas não linearmente.

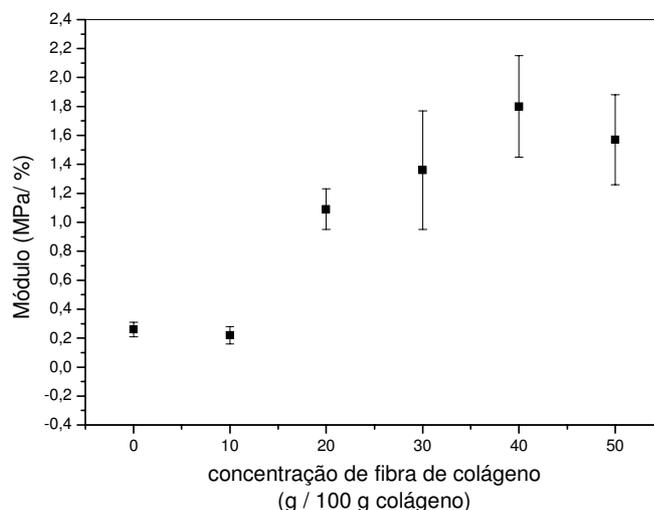


Figura 25. Módulo de elasticidade dos filmes de colágeno.

Nestes resultados apresentados na figura acima ocorre o mesmo comportamento do estudo dos autores citados anteriormente. Os valores do módulo elástico aumentam com o aumento da concentração de fibra presente na matriz e de forma não linear, indicando, portanto, que houve interação entre o reforço e a matriz filmogênica.

5.9.3 Solubilidade

Na Figura 26 são apresentados os efeitos do aumento da concentração de fibra de colágeno na solubilidade em água dos filmes. Os resultados estão em termos de gramas de matéria seca solúvel em relação ao filme total e variou de $29,07 \pm 0,8$ a $45,34 \pm 1,22\%$. Observa-se que, com o aumento da concentração de fibra, e conseqüentemente, mas muito importante nesse aspecto, com a diminuição da quantidade de pó no filme, a solubilidade dos filmes diminui de acordo com uma função aparentemente exponencial. Isto ocorre devido à menor solubilidade que a fibra possui em relação ao pó de colágeno, já que a fibra foi adicionada quando a solução filmogênica estava em temperatura ambiente e, portanto, não sofreu desnaturação e principalmente pela forte interação entre as duas fases, conforme demonstrado pelos resultados das propriedades mecânicas. Provavelmente se a fibra

de colágeno fosse adicionada antes do aquecimento da solução, sua solubilidade e, conseqüentemente, a dos filmes aumentariam.

O intumescimento de filmes e a sua integridade após o teste de solubilidade também são fatores importantes a serem observados. Todos os filmes testados permaneceram íntegros após as 24 h de imersão em água a que foram submetidos, o que indica que a rede protéica se manteve intacta (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000). Porém, o filme elaborado apenas com o pó de colágeno desmanchava-se facilmente e foi o que apresentou maior intumescência. Os demais filmes não sofreram grande intumescimento e não se desfizeram.

Filmes com plasticizantes hidrofílicos tendem a apresentar altos valores de solubilidade. Contudo, os resultados obtidos aqui são relativamente menores do que os encontrados por Lee et al. (2004), que elaboraram filmes compostos por gelatina e gelana em presença de NaCl e plasticizados por glicerol, variando suas proporções, e que apresentaram solubilidade de 30 a 52%.

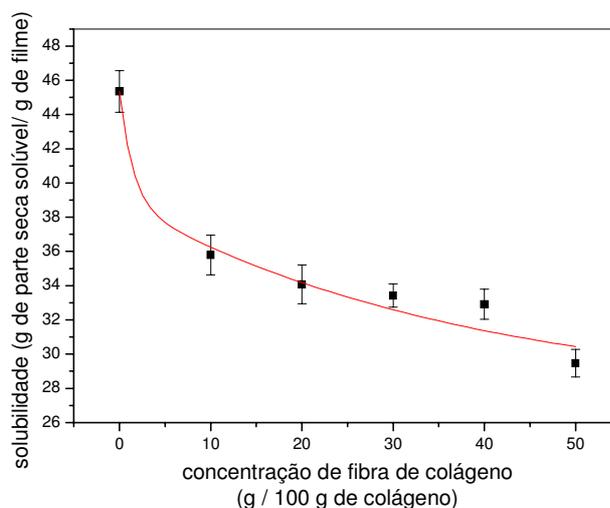


Figura 26. Solubilidade dos filmes de colágeno em função da concentração de fibra.

5.9.4 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Os resultados dos testes de PVA de filmes a base de colágeno são apresentados na Figura 27. É possível notar que o valor da PVA aumenta pouco mais de 30%

entre filmes apenas com o pó de colágeno e filmes com 10% de fibra. Esse fato pode ser explicado pelo formato e higroscopicidade da fibra, que levam à formação de pequenas entranças, que serviriam de canais condutores de umidade na matriz filmogênica. Com isso, o vapor de água teria canais que facilitariam sua transferência através da espessura do filme.

Entretanto, seguindo a curva, nota-se que aumentando ainda mais a concentração de fibra, até 40%, a PVA dos filmes diminui. De acordo com Shina Ray e Okamoto (2003), a presença de altas concentrações de compósito (neste caso a fibra de colágeno) provavelmente aumenta a tortuosidade do caminho que as moléculas de águas deverão percorrer para atravessar o filme, de modo que esse longo caminho difusivo que as moléculas penetrantes deverão viajar acarreta a redução da permeabilidade.

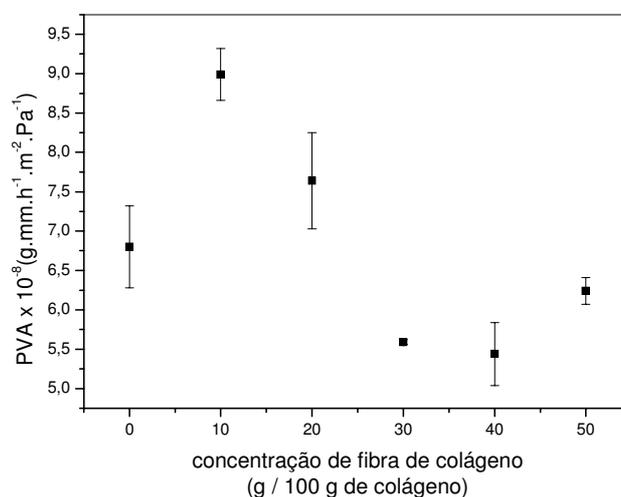


Figura 27. Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de colágeno.

Filmes com 50% de fibra em sua composição sofreram um aumento estatisticamente significativo ($\alpha = 0,05$) em sua PVA em relação aos filmes com 40%. Essa mudança é atribuída ao excesso de concentração de fibra presente no filme, indicando que possa ter ocorrido algumas falhas ou furos entre a fibra e a matriz (ABDELMOULEH et al., 2005).

Martelli (2005) determinou a permeabilidade ao vapor de água de filmes de queratina de frango, plasticizados por polietileno glicol (30 g/ 100 g de queratina) de massa molecular 400, com aproximadamente 21% de umidade e 0,175 mm de espessura, encontrando valores iguais a $2,358 \times 10^{-10}$ g/s.m.Pa. Passando esse resultado para as mesmas unidades que o presente trabalho utilizou, chega-se numa PVA igual a $8,48 \times 10^{-4}$ g.mm/

$\text{h.m}^2.\text{Pa}$. Comparado ao filme elaborado apenas com pó de colágeno, nota-se que o filme de queratina apresenta, praticamente, o dobro de permeabilidade ao vapor de água. Segundo Cuq et al. (1997) citados por Thomazine et al. (2005), o aumento do teor de plasticizante causa um aumento na permeabilidade ao vapor de água de filmes higroscópicos, devido à reorganização da matriz protéica e conseqüente aumento de volume livre.

Na Figura 28 encontram-se os valores da permeância, lembrando que permeância é a permeabilidade dividida pela respectiva espessura do filme. Para os cálculos, foram utilizados filmes com espessuras médias de $0,193 \pm 0,013$ mm. Nota-se o mesmo comportamento obtido na PVA, porém, devido ao grande desvio padrão encontrado nos filmes formulados apenas com o pó de colágeno, não houve diferença estatisticamente significativa ($\alpha=0,05$) entre os filmes 0 e 10%.

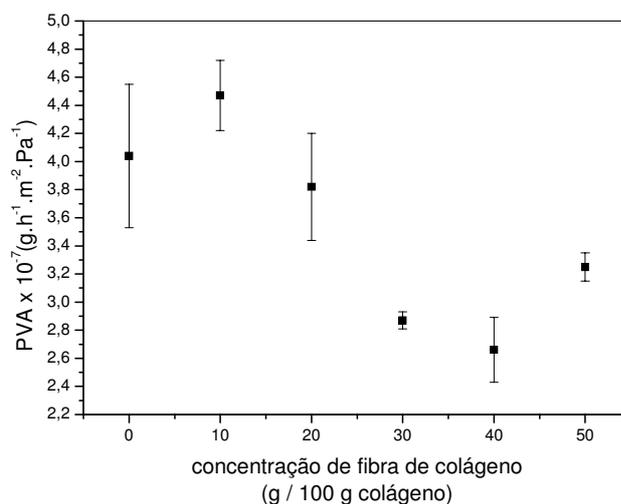


Figura 28. Permeância ao vapor de água dos filmes de colágeno.

A adição da fibra de colágeno aos filmes ocasionou uma redução de 20% na PVA e de 34,16% na permeância, levando em conta para esses cálculos os menores valores dos filmes, ou seja, 0 e 40%.

5.9.5 Cor e opacidade

Os resultados referentes aos testes de cor e opacidade são mostrados na Tabela 11. Nota-se que a luminosidade (L^*) não apresenta diferença estatisticamente significativa ($\alpha = 0,05$) entre todos os filmes testados. As cores dos filmes (ΔE^*) começaram a apresentar diferença significativa quando a concentração de fibra atingiu os 20% na formulação. Os valores do parâmetro a^* , que varia do verde ao vermelho, e b^* , que varia do azul ao amarelo apresentaram pequenas diferenças entre si. Filmes formulados sem a adição de fibra são os mais translúcidos, apresentando valores abaixo dos filmes produzidos por Paschoalick et al. (2003) produzidos a partir de proteínas musculares de peixe, em $pH=2,7$, com 30 g de glicerina/ 100 g de proteína sofrendo um tratamento térmico de 90 °C/ 30 min e que apresentaram opacidade igual a 4,69%. Nos filmes em que houve a menor adição de fibra, ou seja, filmes 10% já apresentaram valores de opacidade significativamente ($\alpha=0,05$) maiores do que filmes que não as continham, indicando a grande influência que ela possui em aumentar a barreira à luminosidade.

O parâmetro ΔE^* teve seu valor atribuído principalmente ao parâmetro b^* , conforme Equação 16 e foi bem inferior aos valores encontrados para filmes a base de gelatina de peixe com adição de ácidos graxos e sacarose (JONGJAREONRAK, 2005).

Tabela 11. Resultado do teste de cor e opacidade dos filmes de colágeno.

FILME ¹	PARÂMETRO				Opacidade (%)
	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*	
0%	-6,31 ^a	-0,71 ^{a,b}	12,37 ^a	13,90 ^a	3,46 ^c
10%	-5,07 ^a	-0,76 ^a	11,61 ^{a,b}	12,70 ^a	5,84 ^b
20%	-5,17 ^a	-0,75 ^a	11,07 ^{a,b,c}	12,24 ^{a,b}	5,85 ^b
30%	-5,29 ^a	-0,76 ^a	10,49 ^{b,c}	11,77 ^b	6,22 ^b
40%	-5,08 ^a	-0,59 ^b	11,18 ^{a,b,c}	12,29 ^{a,b}	8,83 ^a
50%	-5,15 ^a	-0,65 ^{a,b}	9,75 ^c	11,05 ^b	7,48 ^{a,b}

¹ % de fibra de colágeno em relação ao colágeno total.

Diferentes letras (a até c) denotam diferença significativa ($P < 0,05$) entre médias obtidas através do teste de Tukey para cada coluna.

Na Figura 29 podem ser observados alguns espectros padrões obtidos na análise de cor. Nota-se que a curva azul, que corresponde ao filme sem fibra, é a que se destaca das demais.

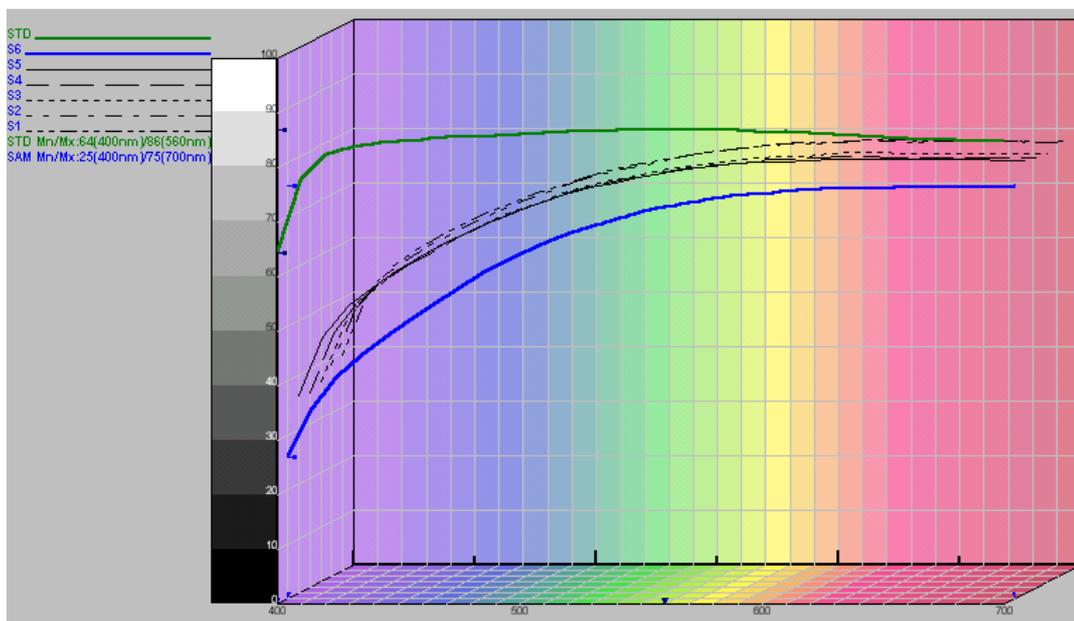


Figura 29. Espectros padrões dos resultados do teste de cor dos filmes de colágeno.

STD=Padrão; S6=0%; S5=10%; S4=20%; S3=30%; S2=40%; S1=50%

5.9.6 Microscopia

As imagens feitas pelo esteromicroscópio das superfícies dos filmes 0, 10, 30 e 50% são mostradas nas Figuras 30, 31, 32 e 33, respectivamente. Essa análise ajuda a entender o comportamento dos filmes quanto à permeabilidade ao vapor de água e porque os mesmos se tornaram mais opacos com o aumento da concentração de fibra em sua estrutura. Como se pode observar nas figuras que se seguem, filmes formulados apenas com pó de colágeno apresentaram superfície lisa, homogênea e translúcidas; pequenas marcas são provenientes dos moldes onde os filmes são formados. Em contrapartida, quando 10% de pó são substituídos por fibra (Figura 31), a superfície do filme apresenta irregularidades e alguns sulcos que favoreceram a permeabilidade ao vapor de água. No filme com 30% de fibra (Figura 32), sua superfície já é totalmente irregular e esse comportamento se repete no filme com 50%. Isso favoreceu a diminuição da permeabilidade ao vapor de água, como explicado no item 5.9.4 e no aumento da opacidade, uma vez que a maior parte das fibras não estão solubilizadas na matriz filmogênica.

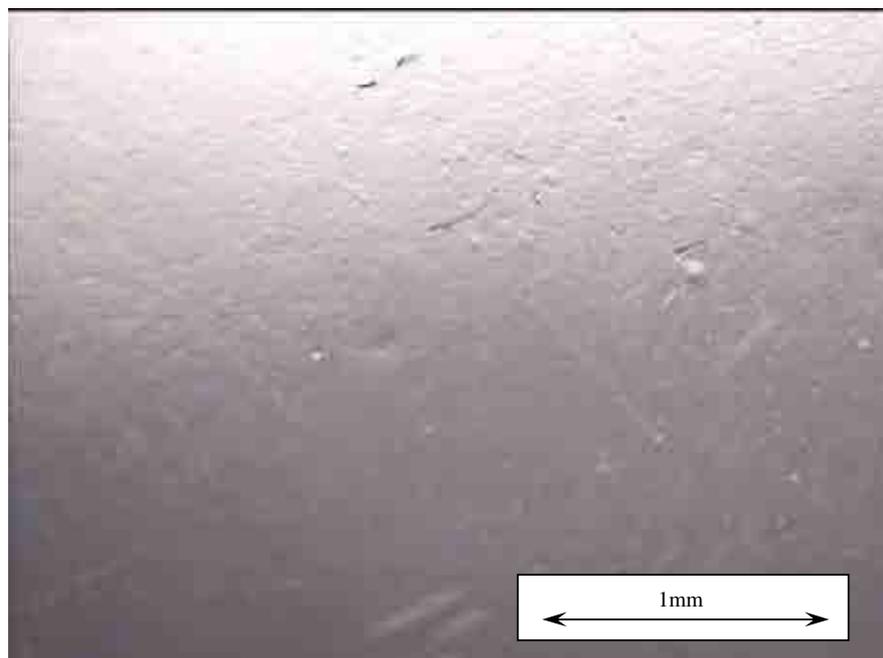


Figura 30. Imagem da superfície do filme 0% num aumento de 50X.

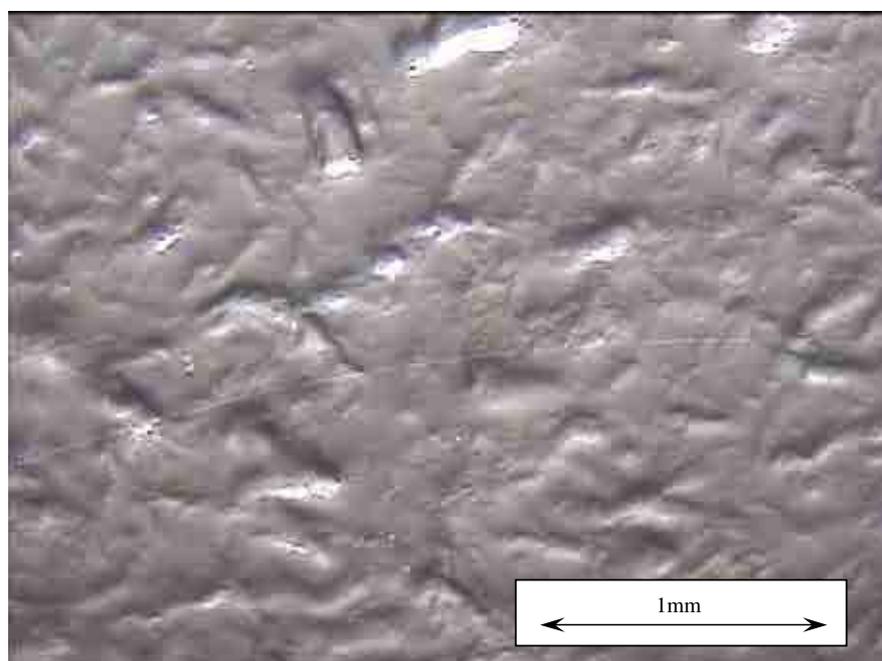


Figura 31. Imagem da superfície do filme 10% num aumento de 50X.

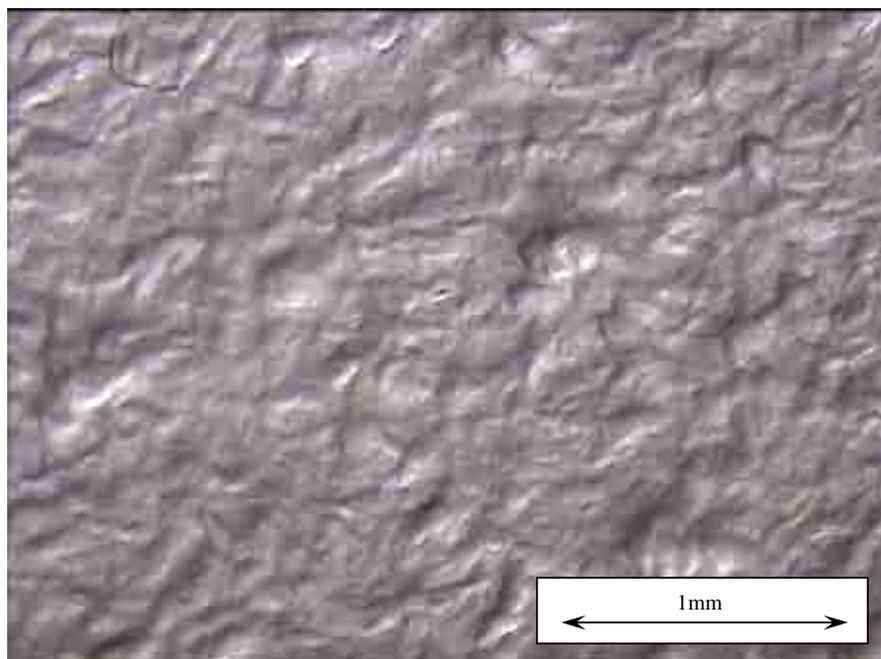


Figura 32. Imagem da superfície do filme 30% num aumento de 50X.

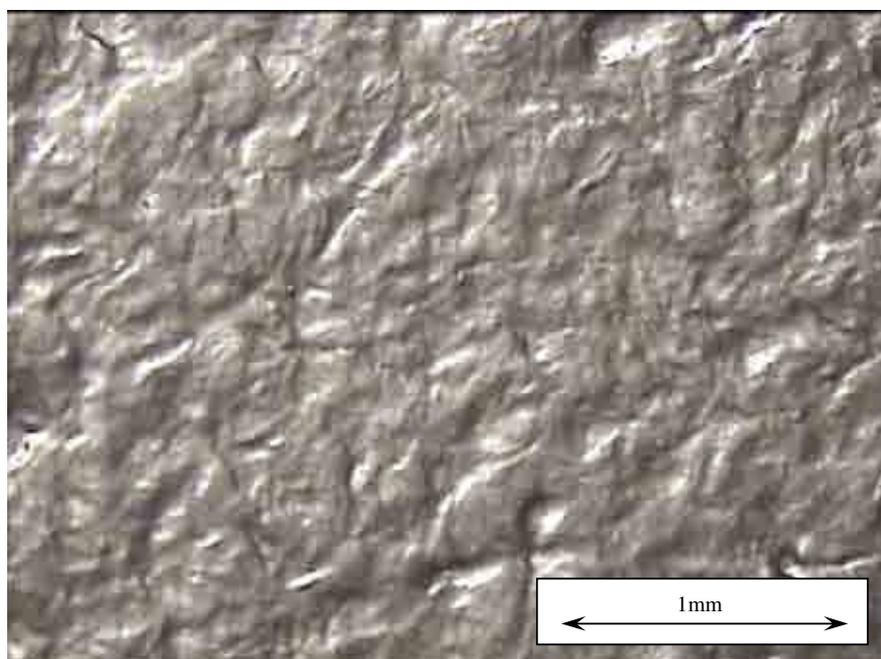


Figura 33. Imagem da superfície do filme 50% num aumento de 50X.

Imagens de filmes semelhantes às apresentadas aqui foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura por Sastry et al. (1998) que formulou filmes com gelatina e adicionou fibrina como reforço, encontrando também uma rede fibrilar na matriz filmogênica.

Na Figura 34 encontra-se a imagem de um grumo proveniente da fibra de colágeno, os quais são formados no processamento industrial da matéria-prima, pele bovina, e a sua separação completa é muito difícil de se conseguir. Contudo, após o peneiramento da fibra de colágeno para a formulação dos filmes, a contaminação dos mesmos por esses grumos diminuiu substancialmente. Sua presença não interfere nas propriedades dos filmes formados se estiverem totalmente submersos na matriz filmogênica, entretanto, se alguma parte, a menor que seja, dispuser-se acima da superfície, erros de medida de espessura podem ocorrer, afetando todas as outras propriedades que levam em conta essa medida.

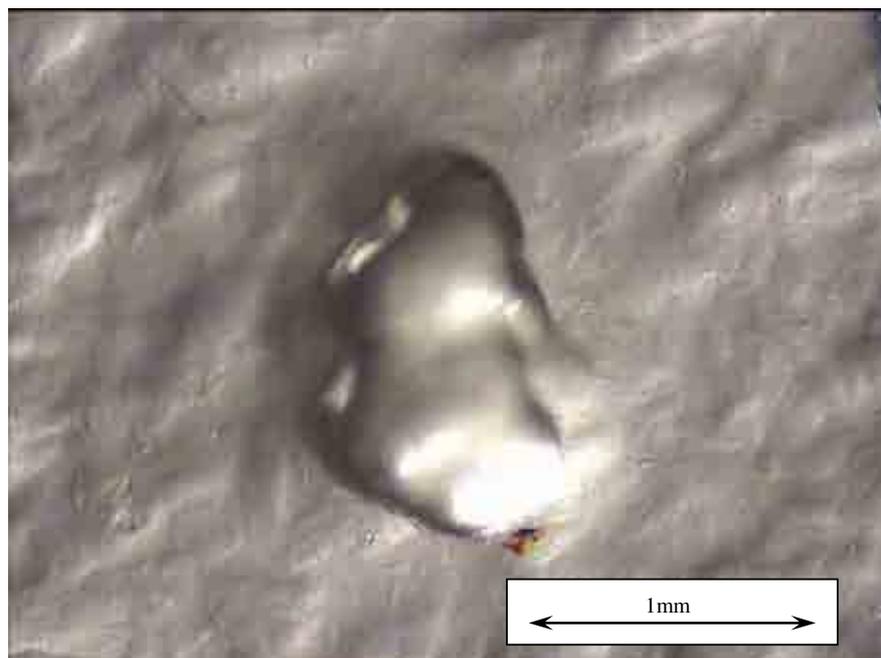


Figura 34. Imagem de um grumo de colágeno na superfície de um filme num aumento de 50X.

Nos estudos de Anglès et al. (1999) as figuras da microscopia eletrônica indicaram claramente que houve uma pobre adesão interfacial entre um tipo de compósito reforço testado e a matriz filmogênica, apesar de um pré-tratamento que a fibra sofreu. Isto foi verificado pela ausência de contato físico entre ambos componentes. A fibra se mostrava intacta e praticamente fora da matriz.

6 CONCLUSÕES

- O pó de colágeno se mostrou adequado para o desenvolvimento de filmes. Filmes formulados apenas com o pó de colágeno apresentaram boa coesão e habilidade em serem manipulados, além de se apresentarem lisos e homogêneos. A fibra de colágeno, por sua vez, não foi capaz de formar filmes contínuos quando usada isoladamente, mas a mistura dos dois componentes mostrou que as propriedades mecânicas dos filmes são melhoradas em relação àqueles formulados apenas com o pó.
- O aumento na concentração de fibra de colágeno nos filmes resultou no aumento da resistência à ruptura, do módulo de elasticidade, da opacidade e na diminuição da alongação e da solubilidade, provavelmente devido à ocorrência de uma efetiva interação entre o compósito reforço (a fibra de colágeno) e a matriz filmogênica (a base de pó de colágeno).
- A permeabilidade ao vapor de água dos filmes contendo 10% de fibras apresentou um aumento em relação aos filmes formados apenas por pó de colágeno. No entanto, à medida que foi adicionada maior quantidade de fibras aos filmes, até um total de 40%, a permeabilidade dos mesmos diminuiu. Finalmente, nos filmes com 50% de fibras, a permeabilidade voltou a subir, o que pode ter ocorrido devido à menor interação entre a matriz filmogênica e as próprias fibras, presentes em excesso.
- A formulação que resultou em filmes com melhores propriedades mecânicas e de barreira foi aquela que continha 40% de fibras de colágeno. Apesar de apresentar tensão à ruptura e solubilidade em torno de 12 e 6%, respectivamente, menores que filmes com 50% de fibras, os filmes com 40% apresentaram-se mais rígidos, com a menor alongação, o maior módulo elástico e, principalmente, com a menor permeabilidade ao vapor de água dentre todos os filmes analisados.

6.1 Sugestões para Trabalhos Futuros

- Alguns aspectos abordados neste trabalho ainda podem ser objeto de estudos mais detalhados, principalmente com o uso de outras análises que poderiam aumentar o grau de compreensão sobre os mesmos. Algumas sugestões:
 - Estudar as mesmas propriedades em filmes com maiores concentrações de fibra.
 - Utilizar outras substâncias como agentes para melhorar a ligação entre a matriz protéica e os compósitos.
 - Utilizar algum tipo de campo magnético antes dos filmes serem formados para deixar as fibras orientadas na matriz protéica.
 - Avaliar a produção de filmes de colágeno em processo semicontínuo ou contínuo.
 - Estudar o potencial de utilização dos filmes produzidos em produtos comerciais.
 - Confrontar a composição aminoacídica da matéria-prima dos filmes em relação aos aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos e suas conformações estruturais com a permeabilidade ao vapor de água.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMOULEH, M.; BOUFI, S.; BELGACEM, M.N.; DUFRESNE, A.; GANDINI, A. Modification of Cellulose Fibers with Functionalized Silanes: Effect of the Fiber Treatment on the Mechanical Performances of Cellulose-Thermoset Composites. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 98, p. 974-984, 2005.

AHMED, S.; JONES, F. R. A Review of particulate reinforcement theories for polymer composites. **Journal of Materials Science**, n. 25, p. 4933-4942, 1990.

AMARANTE, C.; BANKS, N.H.; GANESH, S. Relationship between character of skin cover of coated pears and permeance to water vapour and gases. **Postharvest Biology and Technology**, v. 21, n. 3, p. 291-301, 2001.

ANGELE, P.; ABKE, J.; KUJAT, R.; FALTERMEIER, H.; SCHUMANN, D.; NERLICH, M.; KINNER, B.; ENGLERT, C.; RUSZCZAK, Z.; MEHRL, R.; MUELLER, R. Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. **Biomaterials**, v. 25, p. 2831-2841, 2004.

ANGELLIER, H.; MOLINA-BOÏSSEAU, S.; DOLE, P.; DUFRESNE, A. Thermoplastic Starch-Waxy Maize Starch Nanocrystals Nanocomposites. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 531-539, 2006.

ANGLÈS, M.N.; SALVADÖ, J.; DUFRESNE, A. Steam-Exploded Residual Softwood-Filled Polypropylene Composite. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 74, p. 1962-1977, 1999.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16ª Edição. Washington: Association of Official Analytical Chemist, 1995.

AOKI, H.; TAGUCHI, T.; SAITO, H.; KOBAYASHI, H.; KATAOKA, H.; TANAKA, J.; Rheological evaluation of gelatin gels prepared with a citric acid derivative as a novel cross-linker. **Material Science & Engineering C**, v. 24, p. 787-790, 2004.

ARVANITOYANNIS, I. Unpublished data. Department of Agricultura. Crop and animal production, School of Technological Science, University of Thessalia, Nea Ioni, Magnesia, Greece, 1999.

ASTM. **Annual Book Standards**. Philadelphia, PA, 1989: American Society for Testing Material.

AUDIC, J.L.; CHAUFER, B. Influence of plasticizer crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. **European Polymer Journal**, v. 41, p. 1934-1942, 2005.

AVÉROUS, L.; FRINGANT, C.; MORO, L. Plasticized starch-cellulose interactions in polysaccharide composites. **Polymer**, v. 42, p. 6565-6572, 2001.

BADII, F.; HOWELL, N.K. Fish gelatin: structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 630-640, 2006.

BALDWIN, E.A.; NISPEROS-CARRIEDO, M.O.; BAKER, R.A. Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, n.6, p.509-524,1995

BANDMAN, E. Química de los tejidos animales. In. PRICE, J.F.; SCHWEIGERT, B.S. "Ciência de la carne y de los productos carnicos", Ed. Acribia, 2ª edição, Zaragoza (España), 1994.

BANERJEE, R.; CHEN, H.; WU, J. Milk protein-based edible film mechanical strength changes due to ultrasound process. **Journal of Food Science**, v. 61, n.4, p.824-828, 1996

BANKER, G.S. Films coating theory and practice. **Journal of Pharmaceutical Science**. V.55 n.1. p.81-89, 1966.

BARBUT, S.; MITTAL, G.S. Effect of heat processing delay on the stability of poultry meat emulsions containing 1.5 and 2.5-percent salt. **Poultry Science**, v. 70, n. 12, p. 2538-2543, 1991.

BARLEY, S.R. The alignment of technology and structure through roles and networks. **Administrative Science Quarterly**, v. 35, n. 1, p. 61-103, 1990.

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

BET, M.R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C.A. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis, of asparagines and glutamine carboxyamide side chain. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 1074-1079, 2001.

BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. **Biomaterials**, v. 23, n. 24, p. 4827-4832, 2002.

BOKI, K.; KAWASAKI, N. Moisture sorption characteristics of collagen fiber prepared in different acidic pH solutions. **Journal of Colloids and Interface Science**, n. 164, p. 364-369, 1994.

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

CARVALHO, R.M. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes a base de gelatina**. Campinas (SP): UNICAMP, 1997. 128p (Dissertação, mestrado em Engenharia de Alimentos).

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análises de alimentos**, v. 1, Campinas, SP, Ed. UNICAMP, 1999.

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

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

CROSS, H.R.; SMITH, G.C.; CARPENTER, Z.L. Quantitative isolation and partial characterization of elastin in bovine muscle tissue. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 716-721, 1974.

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

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Functional properties of myofibrillar protein-based biopackaging as affected by film thickness. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 3, p. 580-583, 1996.

DAVANÇO, T. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes a base de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou ácido capróico e surfactantes**. Campinas (SP): UNICAMP, 2006. 155p (Dissertação, mestrado em Engenharia de Alimentos).

DAMODARAM, S. Amino acids, peptides, and proteins. In: FENNEMA, O. (ED.). **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekker Inc., 1996. p.321-429

DOERSCHER, D.R.; BRIGGS, J.L.; LONERGAN, S.M. Effects of pork collagen on thermal and viscoelastic properties of purified porcine myofibrillar protein gels. **Meat Science**, v. 66, p. 181-188, 2003.

DONHOWE, G.; FENNEMA, O. Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions, and testing methods. In: KROCHTA, J.M.; BALDWIN, E.A.; NISPEROS-CARRIEDO, M. (Eds.). **Edible Films and Coatings to Improve Quality**. Lancaster: Technomic Publishing Co.; p.1-24, 1994.

FAMÁ, L.; ROJAS, A.M.; GOYANES, S.; GERSCHENSON, L. Mechanical properties of tapioca-starches edible films containing sorbates. **LWT**, v. 38, p. 631-639.

FIGUEIRÓ, S.D.; GÓES, J.C., MOREIRA, R.A.; SOMBRA, A.S.B. On the physico-chemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan-collagen films. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 313-320, 2004.

FRANÇA, J.M.; WASZCZYNSKYJ, N. Teor de hidroxiprolina em peles de frango submetidas à tratamento térmico. **B. CEPPA**, v.20, n. 1, p. 19-28, 2002.

FRIESS, W.; LEE, G. Basic thermoanalytical studies of insoluble collagen matrices. **Biomaterials**, v. 17, n. 23, p. 2289-2294, 1996.

GARCÍA, F.T.; SOBRAL, P.J.A. Effect of the thermal treatment of the filmogenic solution on the mechanical properties, color and opacity of films based on muscle proteins of two varieties of Tilapia. **LWT**, v. 38, p. 289-296, 2005.

GARCÍA, M.A.; PINOTTI, A.; MARTINO, M.N.; ZARITZKY, N.E. Characterization of composite hydrocolloid films. **Carbohydrates Polymers**, v.56, p.339-345, 2004.

GELITA. A produção de gelatina: a mais moderna tecnologia para produtos GELITA. Disponível em: <<http://www.gelita.com/DGF-portuguese/index.html>>. Acesso em: 9 jan 2007.

GENNADIOS, A.; PARK, H.J.; WELLER, C.L. Relative humidity and temperature effects on tensile strength of edible protein and cellulose ether films. **Transactions of the ASAE**, v.36, n.6, p.1867-1872, 1993b.

GENNADIOS, A.; McHUGH, T.H.; WELLER, C.L.; KROCHTA, J.M. Edible coatings and films based on proteins. In: KROCHTA, J.M.; BALDWIN, E.A.; NISPEROS-CARRIEDO, M. (Eds.) **Edible Films and Coatings to Improve Quality**. Lancaster: Technomic Publishing Co., 1994. p. 201-277

GENNADIOS, A.; WELLER, C.L.; GOODING, C.H. Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 21, p. 395-409, 1994.

GENNADIOS, A.; WELLER, C.L. Edible Films and Coatings from Soymilk and Soy Protein. **Cereal Foods World**, v. 36, n. 12, p. 1004-1009.

GIMÉNEZ, B.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; MONTERO, P. The role of salt washing of fish skins in chemical and rheological properties of gelatin extracted. **Food Hydrocolloids**, v. 19, 951-957, 2005.

GINDL, W.; MARTINSCHITZ, K.; BOESECKE, P. KECKERS, J. Changes in the Molecular Orientation and Tensile Properties of Uniaxially Drawn Cellulose Films. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 3146-3150, 2006.

GONTARD, N. Edible and biodegradable films: study of wheat gluten film-forming properties. C.R. **Acad. Agric. Eng.**, v. 80, p. 109-117, 1994.

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

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; & CUQ, J.-L. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 1, p. 190-195, 1992.

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

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

GUILBERT, S. Technology and application of edible protective films. In **"Food Packaging and Preservation. Theory and Practice"**, ed. M. Mathlouti, p.371. Elsevier Applied Science Publishing Co., London, England, 1986.

HOOD, L.L. Collagen in sausage casings. In “**A History of innovative collagen technology**”. V. 43, n. 2, p. 109-129, 1991.

IGNATIEVA, N.Y.; LUNIN, V.V.; AVERKIEV, S.V.; MAIOROVA, A.F.; BAGRATASHVILI, V.N.; SOBOL, E.N. DSC investigation of connective tissues treated by IR-laser radiator. **Thermochemica Acta**, v. 422, p. 43-48, 2004.

JANGCHUD, A.; CHINNAN, M.S. Properties of peanut protein film: Sorption isotherm and plasticizer effect. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 32, n. 2, p. 89-94, 1999.

JONGJAREONRAK, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; TANAKA, M. Effects of plasticizers on the properties of edible films from skin gelatin of bigeye snapper and brownstripe red snapper. **Eur Food Res Technol**, v.222, p. 229-235, 2006.

JONGJAREONRAK, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; TANAKA, M. Fatty acids and their sucrose esters affects the properties of fish skin gelatin-based film. **Eur Food Res Technol**, v. 222, p. 650-657, 2006.

JONGJAREONRAK, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; VISESSANGUAN, W.; PRODPRAM, T.; TANAKA, M. Characterization of edible films from skin gelatin of brownstripe red snapper and bigeyer snapper. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 492-501, 2006.

KAYMAK-ERTEKIN, F.; GEDIK, A. Sorption isotherms and isostérico heat of sorption for grapes, apricots, apples and potatoes. **LWT**, v. 37, p. 429-438, 2004.

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

KIM, S.J.; USTUNOL, Z. Thermal properties, heat sealability and seal attributes of whey protein isolate/lipid emulsion edible films. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 7, p. 985-990, 2001.

KREIS, T.; VALE, R. **Extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins**. 2ª Edição. Oxford, 1999.

KROCHTA, J.M.; BALDWIN, E.A.; NISPEROS-CARRIEDO, M. **Edible Films and Coatings to Improve Quality**. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co., 1994. 379p.

KUMINS, C.A. Transport through polymer films. **Journal of Polymer Science**, n. 10, p. 1-9, 1965.

KUNTE, L.A.; GENNADIOS, A.; CUPPETT, S.L.; HANNA, M.A.; WELLER, C.L. Cast films from soy protein isolates and fractions. **Cereal Chemistry**, v. 74, n. 2, p. 115-118, 1997.

LEE, K.Y.; SHIM, J.; LEE, H.G. Mechanical properties of gellan and gelatin composite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 51-54, 2004.

LEE, S.L.; LEE, M.S.; SONG, K.B. Effect of gamma-irradiation on the physicochemical properties of gluten films. **Food Chemistry**, v.92, p.621-625, 2005.

LEE, C.S.; HAN, S.; BEAG, Y.W.; Improvement of adhesion between polyaniline and ion assisted-reaction-treated polypropylene. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 88, n. 2, p. 258-265, 2003.

LONGARES, A.; MONAHAN, F.J.; O'RIORDAN, E.D., O'SULLIVAN, M. Physical properties of edible films made from mixture of sodium caseinate and WPI. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1255-1260, 2005.

LOPES-FILHO, J.F.; ROMANELLI, P.F.; BARBOZA, S.H.R.; GABAS, A.L.; TELIS-ROMERO, J. Sorption isotherms of alligator's meat (*Caiman crocodiles yacare*). **Journal of Food Engineering**, v. 52, p. 201-206, 2002.

LUCASIK, K.V.; LUDESCHER, R.D. Effect of plasticizer on dynamic site heterogeneity in cold-cast gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 88-95, 2006.

LUCASIK, K.V.; LUDESCHER, R.D. Molecular mobility in water and glycerol plasticized cold- and hot-cast gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 96-105.

MAACHE-REZZOUNG, Z.; REZZOUNG, S.A.; ALLAF, K. Development of a new drying process – dehydration by cyclical pressure drops (D.D.S.): application to the collagen gel. **Drying Technology**, v. 20, n. 1, p. 109-129, 2002.

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

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

MARTELLI, S.M.; MOORE, G.; PAES, S.S.; GANDOLFO, C.; LAURINDO, J.B. Influence of plasticizers on the water sorption isotherms and water vapor permeability of chicken feather keratin films. **LWT**, v. 39, p. 292-301, 2006.

MECITOĞLU, Ç.; YEMENICIOĞLU, A.; ARSLANOĞLU, A.; ELMACI, Z.S.; KOREL, F.; ÇETIN, A.E. Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein for antimicrobial food packaging. **Food Research International**, v. 39, p. 12-21, 2006.

MCHUGH, T.H.; KROCHTA, J.M. Milk-protein-based edible films and coatings-favorable barrier and mechanical properties of milk-protein films warrant exploration for controlling mass transfer in food systems. **Food Technology**, p. 97-103, 1994.

MCHUGH, T.H. Protein-lipid interactions in edible films and coatings. **Nahrung-Food**, v. 44, n. 3, p. 148-151, 2000.

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

NATARAJAN, N.; SHASHIRENKHA, S.E.; NOORJAHAN, S.E.; RAMESHKUMAR, M.; ROSE, C.; SASTRY, T.P. Fibrin-Chitosan-Gelatin Composite Film: Preparation and Characterization. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 42, p. 945-953, 2005.

NEKLYUDOV, A.D. Nutritive fibers of animal origin: collagen and its fractions as essential components of new and useful food products. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 3, 2003.

NIELSEN-MARSH, C.M.; HEDGE, R.E.M.; MANN, T.; COLLINS, M.J. A preliminary investigation of the application of differential scanning calorimetry to the study of collagen degradation in archaeological bone. **Thermochimica Acta**, v. 365, p. 129-139, 2000.

NISHI, Y.; UCHIYAMA, S.; DOI, M.; NISHIUCHI, Y.; NAKAZAWA, T.; OHKUBO, T.; KOBAYASHI, Y. Different effects of 4-hydroxyproline and 4-fluoroproline on the stability of collagen triple helix. **Biochemistry**, v. 44, p. 6034-6042, 2005.

NOISHIKI, Y.; NISHIYAMA, Y.; WADA, M.; KUGA, S.; MAGOSHI, J. Mechanical Properties of Silf Fibroin-Microcrystalline Cellulose Composite Films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 86, 3425-2429, 2002.

OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. **Carnes: no caminho da pesquisa**. 1ª Edição. 2001. Ed. Imprint.

OU, S.; WANG, Y.; TANG, S.; HUANG, C.; JACKSON, M.G. Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. **Journal of Food Engineering**, v. 70, p. 205-210, 2005.

PARRIS, N.; COFFIN, D.R.; JOUBRAN, R.F.; PESSEN, H. Composition factors affecting the water vapor permeability and tensile properties of hydrophilic films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p.1432-1435, 1995.

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

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

PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S.K.; SALOKHEV.M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **LWT**, v. 38, p. 859-865, 2005.

RAW, J.D. In: **Biochemistry**, international edition, cap. 4, ed. Neil Patterson Publishers, 1989.

ROSE, P.I. "Gelatin"em Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, 2º ed. Vol. 7, eds., Mark, H.F., Bikales, N.M., Overberger, C.G. e Menges, G., New York: John Wiley & Sons, p. 488-513, 1987.

SABLANI, S.S.; KASAPIS, S.; AL-RAHBI, Y.; AL-MUGHEIRY, M. Water sorption isotherms and glass transition properties of gelatin. **Drying Technology**, v. 20, n. 10, p. 2081-2092, 2002.

SAMENTO, A. **Elaboração e caracterização de biofilmes a partir de gelatina reticulada**. Campinas, 1999. 149 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SASTRY, T.P.; ROSE, C.; GOMATHINAYAGAM, S.; RADHAKRISHNAN, G. Chemically Modified Fibrin-Gelatin Composites: Preparation and Characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 68, p. 1109-1115, 1997.

SCHROOYEN, P.M.M.; DIJKSTRA, P.J.; OBERTHUR, R.C. Thermal and mechanical properties of films. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 221-230, 2001.

SEYDIM, A.C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, v. 39, p. 639-644, 2006.

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

SOARES, R.M.D.; LIMA, A.M.F.; OLIVEIRA, R.V.B.; PIRES, A.T.N.; SOLDI, V. Thermal degradation of biodegradable edible films based on xanthan and starches from different sources. **Polymer Degradation and Stability**, v. 90, p. 449-454, 2005.

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

SOBRAL, P.J.A.; HABITANTE, A.M.Q.B. Phase transitions of pigskin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 377-382, 2001.

SOBRAL, P.J.; MENEGALLI, F.C.; CARVALHO, R.A.; SOUZA, S.M.; MONTERREY-Q.E. Elaboração de filmes de proteínas para uso com impermeabilizante ou embalagem flexível. In: SGARBIERI, V.C. E TURATTI, J.M. (Eds). **Tópicos Especiais em Ciência e Tecnologia de Proteínas**, Campinas, 25-27 de novembro, 1997. ITAL, p.95-104.

SOBRAL, P.J.A.; SANTOS, J.S.; GARCÍA, F.T. Effect of protein and plasticizer concentrations in film forming solutions on physical properties of edible films based on muscle proteins of a Thai Tilapia. **Journal of Food Engineering**, v.70, p. 93-100, 2005

SOUZA, S.M.A. **Elaboração e Caracterização de Filmes Comestíveis Biodegradáveis a Base de Proteínas Miofibrilares de Origem Bovina**. Dissertação, Doutorado – UNICAMP, 2001.

SPIESS, W.E.L.; WOLF, W.R. The results of the COST 90 project on water activity. In Escher, F., Hallstrom, B., Meffert, H.S., Spiess, W.E.L. and Voss, G. (ed), **Physical Properties of Foods**, New York: Applied Science Publishers, pp. 65-87, 1983.

STEFANSSON, G.; HULTIN, H.O. On the solubility of cod muscle proteins in water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 2656-2664, 1994.

STEFFE, J.F. *Rheological Methods in Food Process Engineering*, Freeman Press, East Lansing, 418 p, 1996.

TELIS, V.R.N.; GABAS, A.L.; MENEGALLI, F.C.; TELIS-ROMERO, J. Water sorption thermodynamic properties applies to persimmon skin and pulp. **Thermochimica Acta**, v. 343, p. 49-56, 2000.

TELIS, V.R.N.; SOBRAL, P.J.A. Glass transitions for freeze-dried and air-dried tomato. **Food Research International**, v. 35, p. 435-443, 2002.

TELIS, V.R.N.; SOBRAL, P.J.A. Glass transitions and state diagram for freeze-dried pineapple. **LWT**, v. 34, p. 199-205, 2001.

THOMAZINE, M.; CARVALHO, R.A.; SOBRAL, P.J.A. Physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 172-176, 2005.

VAN DE VELDE, K.; KIEKENS, P. Development of a flax/polypropylene composite with optimal mechanical characteristics by fiber and matrix modification. **Journal of Thermoplastic Composite Materials**, v. 15, n. 4, p. 281-300, 2002.

VAN DEN BERG, C.; BRUIN, S. Water activity and its estimation in food systems: theoretical aspects. In L.B. ROCKLAND, & G.E. Stewart (Eds.), *Properties of water in foods* (pp. 119-135). Dordrecht, 1981.

VANIN, F.M.; SOBRAL, P.J.A., MENEGALLI, F.C.; CARVALHO, R.A.; HABITANTE, A.M.Q.B. Effects of plasticizers and their concentration on thermal and functional properties of gelatin-based films. **Food Hydrocolloids**, v.19, p. 899-907, 2005.

VEIGA-SANTOS, P.; OLIVEIRA L.M.; CEREDA, M.P.; ALVES, A.J.; SCAMPARINI, A.R.P. Mechanical properties, hydrophilicity and water activity of starch-gum films: effect of additives and deacetylated xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 341-349, 2005.

VÉLEZ-RUÍZ, J. Relevance of rheological properties in food process engineering. In: Welti-Chanes, J., Barbosa-Cánovas, G.V. e Aguilera, J.M. (ed.), **Engineering and Food for the 21st Century**, CRC Press, Boca Raton, p. 307-326, 2002.

WANG, Q.; PADUA, G.W. Properties of zein films coated with drying oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3444-3448, 2005.

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

WESS, T.J.; ORGEL, J.P. Changes in collagen structure: drying, dehydrothermal treatment and relation to long term deterioration. **Thermochimica Acta**, v. 356, p. 119-128, 2000.

WETZEL, B.; HAUPERT, F.; ZHANG, M.Q.; Epoxy nanocomposites with high mechanical and tribological performance. **Composites Science and Technology**, v. 63, p. 2055-2067, 2003.

YAN, H.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Size characterization of selected food powders by five particle size distribution functions. **Food Science and Technology International**, v. 3, p. 361-369, 1997.

YOSHIDA, C.M.P.; ANTUNES, A.C.B.; ALVEAR, C.; ANTUNES A.J. An absorption model for the thickness effect in hydrophilic films. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 40, p.41-46, 2005.

ZHAO, X.Y.; CAO, Q.; ZHENG, L.Q.; ZHANG, G.Y. Rheological properties and microstructures of gelatin-containing microemulsion-based organogels. **Colloids and Surfaces A**, v. 281, p. 67-73, 2006.

ANEXOS

Anexo 1. Umidade de equilíbrio do pó e da fibra de colágeno.

Pó de colágeno

Sal	ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE ÁGUA DO PÓ DE COLÁGENO							
	15°C		25°C		35°C		45°C	
	aw	Xeq	aw	Xeq	aw	Xeq	aw	Xeq
MgCl₂	0,337	10,96 ± 0,31	0,327	9,99 ± 0,51	0,321	8,75 ± 0,34	0,316	9,84 ± 0,37
K₂CO₃	0,45	11,69 ± 0,08	0,442	11,10 ± 0,31	0,435	8,98 ± 0,22	0,429	11,31 ± 0,08
NaBr	0,606	13,48 ± 0,07	0,578	13,03 ± 0,70	0,546	11,14 ± 0,06	0,517	12,37 ± 0,10
NaNO₂	0,665	14,35 ± 0,70	0,645	14,01 ± 0,16	0,625	12,57 ± 0,14	0,607	12,92 ± 0,08
NaCl	0,754	18,54 ± 0,22	0,755	17,01 ± 0,05	0,755	16,09 ± 0,08	0,749	17,94 ± 0,43
KCl	0,862	24,63 ± 0,45	0,843	23,03 ± 0,18	0,827	20,77 ± 0,13	0,814	21,74 ± 0,08
BaCl₂	0,908	32,59 ± 0,07	0,904	30,58 ± 0,21	0,897	28,88 ± 0,31	0,889	32,22 ± 0,88
CuSO₄	0,972	62,55 ± 1,04	0,972	53,09 ± 0,60	0,966	49,57 ± 1,46	0,955	48,52 ± 1,66

Fibra de colágeno

Sal	ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE ÁGUA DA FIBRA DE COLÁGENO							
	15°C		25°C		35°C		45°C	
	aw	Xeq	aw	Xeq	aw	Xeq	aw	Xeq
MgCl₂	0,337	11,00 ± 0,56	0,327	10,49 ± 0,20	0,321	9,59 ± 0,11	0,316	9,45 ± 0,09
K₂CO₃	0,45	13,03 ± 0,25	0,442	11,81 ± 0,07	0,435	11,10 ± 0,16	0,429	11,11 ± 0,19
NaBr	0,606	16,86 ± 0,10	0,578	15,06 ± 0,27	0,546	13,71 ± 0,08	0,517	12,74 ± 0,07
NaNO₂	0,665	21,58 ± 3,60	0,645	16,74 ± 0,08	0,625	15,65 ± 0,19	0,607	14,30 ± 0,21
NaCl	0,754	24,02 ± 0,21	0,755	20,72 ± 0,09	0,755	20,44 ± 0,16	0,749	18,56 ± 0,14
KCl	0,862	31,22 ± 0,16	0,843	26,94 ± 1,16	0,827	24,62 ± 0,34	0,814	21,95 ± 0,33
BaCl₂	0,908	37,70 ± 0,27	0,904	33,00 ± 0,35	0,897	30,45 ± 0,75	0,889	26,25 ± 2,71
CuSO₄	0,972	55,35 ± 0,14	0,972	49,68 ± 0,28	0,966	45,71 ± 0,94	0,955	45,07 ± 0,68

Xeq: umidade de equilíbrio (b.s.).

Anexo 2. Resultados da reologia da solução formadora de filme.

Taxa de deformação (s⁻¹)	Tensão de cisalhamento 0 (Pa)	Tensão de cisalhamento 25 (Pa)	Tensão de cisalhamento 50 (Pa)	Tensão de cisalhamento 75 (Pa)
7,01311	0,741	1,368	1,653	1,995
10,51966	0,912	1,539	2,964	3,135
15,77949	1,254	1,71	3,135	3,99
18,93539	1,311	2,166	3,249	4,674
28,40309	1,596	2,394	3,42	4,845
31,55898	1,71	2,565	3,705	5,415
47,33848	1,824	2,85	4,275	6,27
56,80617	1,995	3,021	4,56	6,84
85,20926	2,565	3,648	4,845	7,41
94,67695	2,85	3,99	4,959	7,98
157,79492	3,534	4,731	5,7	9,12
170,41852	3,705	5,13	6,27	9,405
189,35391	3,99	5,415	6,84	9,69
284,03086	5,187	5,985	7,695	9,975
315,58985	5,643	6,27	7,98	10,26
473,38477	6,897	7,524	8,151	10,83
568,06172	7,809	7,923	8,265	11,4
852,09258	10,146	9,405	8,835	11,685
946,76954	10,773	9,861	9,405	11,97
1704,18516	15,561	13,794	11,97	13,11