

Wanessa Ximenes Ribeiro

**CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILME À BASE DE ZEÍNA E ÁCIDO
OLÉICO ADICIONADO DE NANOCARBONATO**

**São José do Rio Preto - SP
2014**

Wanessa Ximenes Ribeiro

**CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILME À BASE DE ZEÍNA E ÁCIDO
OLÉICO ADICIONADO DE NANOCARBONATO**

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

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Lopes Filho.
Co-orientadora: Profa Dra. Carmen C. Tadini.

**São José do Rio Preto - SP
2014**

Ribeiro, Wanessa Ximenes.

Caracterização de biofilme à base de zeína e ácido oléico
adicionado de nanocarbonato / Wanessa Ximenes Ribeiro. -- São José
do Rio Preto, 2014

55 f. : il., tabs.

Orientador: José Francisco Lopes Filho

Coorientadora: Carmen C. Tadini

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Biofilme. 3. Zeína. 4. Carbonatos.
5. Nanopartículas. 6. Alimentos - Embalagens. 7. Plásticos
biodegradáveis. I. Lopes Filho, José Francisco. II. Tadini, Carmen C.
III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto
de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 547.962.7

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

Wanessa Ximenes Ribeiro

**CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILME À BASE DE ZEÍNA E ÁCIDO
OLÉICO ADICIONADO DE NANOCARBONATO**

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

Comissão Examinadora

Prof. Dr. José Francisco Lopes Filho
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Crislene Barbosa de Almeida
UNILAGO – São José do Rio Preto

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

São José do Rio Preto
02 de setembro de 2014

RESUMO

A zeína é uma proteína do glúten do milho muito utilizada na produção de filmes plásticos flexíveis e transparentes. O desenvolvimento de embalagens biodegradáveis à base de zeína tem um grande potencial para a melhoria da qualidade e aumento da vida de prateleira de alimentos, além de permitir a adição de compostos ativos, agregando assim, maior valor tecnológico aos biofilmes de zeína, tornando-os capazes de melhorar a qualidade dos alimentos e sua conservação. Este trabalho propôs o uso de nanocarbonato no desenvolvimento de filmes biodegradáveis à base de zeína para identificar a estrutura básica e as propriedades dos biomateriais. Os filmes foram elaborados pela técnica *casting* tendo como formulação base zeína, glicerol, ácido oléico, etanol e água, e incorporados com três concentrações de nanocarbonato (1, 2 e 3 g / 100 g de proteína) a fim de estudar sua estrutura. Os filmes foram avaliados quanto as suas propriedades mecânicas (resistência máxima à tração e porcentagem de alongação na ruptura), físico-químicas (umidade, solubilidade, atividade de água e espessura), microestrutura (Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Microscopia óptica (MO)), permeabilidade ao vapor de água, opacidade e cor.

Os filmes apresentaram-se homogêneos, livre de partículas insolúveis, flexíveis e espessura uniforme. A adição do nanocarbonato resultou em materiais mais elásticos e flexíveis, com maior estabilidade e manutenção da cor e também mais claros, no entanto, apresentaram-se mais hidrofílicos quando comparados ao filme padrão. Na análise da estrutura verificou-se uma dispersão aleatória das nanopartículas na matriz polimérica indicando que não houve intercalação destas com a matriz. Verificou-se também um aumento no tamanho de agregados de lipídeos quando aumentou-se a concentração de nanocarbonato.

Palavras-chave: zeína, embalagem biodegradável, nanocarbonato.

ABSTRACT

Zein is a corn gluten protein that is widely used in the production of flexible and transparent plastic films. The development of biodegradable packaging based on Zein has great potential to improve the quality and increase the shelf-life of a fruit product, as well as permit the addition of active compounds, this will add greater value to Zein-based biofilms, making them able to improve food quality and conservation. The purpose of this work is to produce Zein biofilms added with nanocarbonate (1%, 2% e 3%) to identify the basic structure and properties of the biomaterials. These films, made by employing a technique known as casting, consist of a basic formulation of Zein, glycerol, oleic acid, ethanol and water, combined with three concentrations of nanocarbonate (1, 2 e 3 g / 100 g of protein) to study their structure. These materials were assessed according to their mechanical properties (tensile strength at break and elongation at break percentage), physical and chemical properties (humidity, solubility, water activity and thickness), microstructure (Scanning Electron Microscopy (SEM) and Optical Microscopy (MO)), water vapor permeability, opacity and color change.

The films were homogenous, free of insoluble particles, flexible and uniform thickness. The addition of nanocarbonate resulted in more elastic and flexible material, more stability and maintenance of color and also lighter, however, were more hydrophilic compared with the standard film. The analysis of the structure there is a random dispersion of nanoparticles in the polymer matrix indicating no collation with the matrix. There was also an increase in size of the lipid when the concentration of nanocarbonate increased.

Key-words: Zein, biodegradable packaging, nanocarbonate.

*Dedico este trabalho
Aos meus pais, Cesar e Walkiria, pelo amor e incentivo constante.*

AGRADECIMENTOS

- À Deus, pelo seu infinito amor e por abençoar meu caminho todos os dias.
- Em especial ao professor Dr. José Francisco Lopes Filho a quem expresso minha enorme admiração como exemplo de trabalho e orientação.
- À professora Dra. Carmen Cecília Tadini pela confiança e motivação e por me permitir realizar parte deste trabalho no LEA. E também aos professores que muito gentilmente aceitaram fazer parte da banca examinadora.
- À minha família, pelo apoio, amor incondicional, dedicação e exemplos de vida.
- A Karina, Aline, Shirlei e Vanda, por todas as risadas e por sempre vibrarem com minhas conquistas.
- Às minhas avós, Therezinha e Elvira, pelas orações e exemplo de fé e amor.
- A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo, e à UNESP, pela enorme oportunidade de cursar o mestrado em tão honrosa instituição e permitir-me transformar um sonho em realidade.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da escala Cielab	21
Figura 2 – Curva de tensão x deformação de filmes flexíveis	23
Figura 3 – Equipamento ColorQuest XE utilizado para os testes de cor	28
Figura 4 - Representação esquemática da cápsula de alumínio contendo o filme e sílica gel, vedada com parafina	31
Figura 5 – Análise de tração dos filmes	33
Figura 6 – Curvas do parâmetro L* de cor dos filmes adicionados ou não de nanocarbonato	36
Figura 7 – Coloração dos filmes de zeína adicionados ou não de nanocarbonato	36
Figura 8 - Eletromicrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos filmes de zeína sem adição de nanocarbonato (0), e com 1 % (1); 2 % (2); e 3 % de nanocarbonato (3)	39
Figura 9 – Microscopias ópticas dos filmes (escala 1mm): sem adição de nanocarbonato (0), 1 % de nanocarbonato (1), 2 % de nanocarbonato (2) e 3 % de nanocarbonato (3)	40
Figura 10 – Microscopias ópticas dos filmes (escala 500 µm): sem adição de nanocarbonato (0), 1 % de nanocarbonato (1), 2 % de nanocarbonato (2) e 3 % de nanocarbonato (3)	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tempo de degradação de alguns materiais	17
Tabela 2 – Valores de espessura dos filmes de zeína adicionados ou não de nanocarbonato	34
Tabela 3 - Parâmetros de cor L^* , a^* e b^* dos filmes de zeína adicionados ou não de nanocarbonato	35
Tabela 4 - Parâmetros de cor L^* de filmes de zeína adicionados ou não de nanocarbonato em função do tempo	37
Tabela 5 - Opacidade dos filmes de zeína adicionados ou não de nanocarbonato	41
Tabela 6 – Valores de atividade de água dos filmes de zeína adicionados ou não de nanocarbonato	42
Tabela 7 – Valores de permeabilidade de água e desvios-padrão dos filmes de zeína padrão e adicionados de nanocarbonato	43
Tabela 8 – Teor de umidade e de solubilidade dos filmes à base de zeína e nanocarbonato	44
Tabela 9 – Resistência máxima à tração ($R_{m\acute{a}x}$) e Porcentagem de elongação (E) e desvios-padrão dos filmes à base de zeína e nanocarbonato	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 ZEÍNA	15
3.2 EMBALAGENS PLÁSTICAS	16
3.3 EMBALAGENS BIODEGRADÁVEIS	17
3.4 NANOCOMPÓSITOS	19
3.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DOS BIOPOLÍMEROS	20
3.5.1 Microestrutura	20
3.5.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)	20
3.5.3 Cor	21
3.5.4 Solubilidade	22
3.5.5 Propriedades mecânicas: Tensão de Ruptura ($R_{\text{máx}}$) e Porcentagem de alongação (E)	23
3.5.6 Opacidade	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 MATERIAIS	25
4.2 MÉTODOS	25
4.2.1 Preparação dos filmes de zeína	25
4.2.2 Caracterização geral dos filmes	26
4.2.3 Morfologia dos filmes	27
4.2.4 Propriedades físicas dos filmes	28
4.2.5 Propriedades de barreira dos filmes	30
4.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS	33
5 RESULTADOS	34
5.1 ESPESSURA	34
5.2 COR	35
5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	37

5.4 MICROSCOPIA ÓPTICA (MO)	39
5.5 OPACIDADE	41
5.6 ATIVIDADE DE ÁGUA (a_w)	42
5.7 PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA (PVA).....	43
5.8 SOLUBILIDADE E TEOR DE UMIDADE.....	44
5.9 PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	45
6 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1 INTRODUÇÃO

A qualidade de um produto alimentício está diretamente ligada à sua embalagem, pois este é o envoltório que irá proteger o produto até seu destino final, o consumidor. As embalagens são, muitas vezes, associadas a problemas de poluição ambiental, uma vez que tem sido bastante difícil, na prática, o controle de seu descarte apropriado e/ou aplicação de programas de reciclagem. Vários estudos têm sido realizados visando desenvolver e caracterizar biomateriais devido ao potencial de aplicação destes produtos nos setores alimentício e agrícola como envoltórios ou embalagens. Os compostos utilizados para a produção desses materiais são obtidos da biomassa (principalmente, proteínas e polissacarídeos); produzidos por microrganismos (goma xantana); ou por meio da síntese química a partir de monômeros biológicos renováveis, ou ainda, pela mistura de fontes da biomassa e petróleo (ácido polilático ou bio-poliéster).

Entre as fontes estudadas, encontram-se aquelas biodegradáveis e comestíveis, como por exemplo, amido, zeína e celulose.

A zeína é uma proteína do milho, solúvel em álcool, de caráter hidrofóbico e produz filmes com excelentes propriedades de barreira à umidade e tem sido utilizada comercialmente como filme comestível em vários alimentos. No entanto, os filmes a base de zeína são frágeis, necessitando, adição de platicizantes e outros componentes como glicerol, de forma que o material tenha flexibilidade e resistência desejável. Outros aditivos, como os nanocompósitos, podem ser utilizados para melhorar as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes de zeína. Em razão das propriedades diferenciadas que as nanopartículas apresentam, é possível obter materiais com características superiores quando comparados a compósitos produzidos com materiais micro particulados. Entretanto a adição de outros componentes na formulação do biomaterial, modifica sua estrutura e características funcionais.

As propriedades mais relevantes para a avaliação de embalagens para alimentos são suas propriedades mecânicas e de barreira. Sendo assim, a seleção das melhores formulações deste estudo será baseada nos resultados dessas propriedades.

É importante ressaltar que o principal requisito na escolha de uma formulação de embalagem é saber qual será seu uso final. Se o filme for utilizado em coberturas

superficiais para manusear o produto, as propriedades principais são as mecânicas e a aparência. Porém, se o objetivo for embalar produtos crocantes, é necessário um filme com a mais baixa permeabilidade ao vapor de água possível para evitar que o produto murche. Alta permeabilidade ao oxigênio é desejada para filmes utilizados no acondicionamento de carnes vermelhas frescas, pois o oxigênio é responsável pela formação da oximioglobina, pigmento que dá a cor característica do produto. Por outro lado, para alimentos ricos em lipídios, deseja-se uma embalagem com baixa permeabilidade ao oxigênio, pois o mesmo leva à formação de radicais livres e ao desenvolvimento de ranço.

Deste modo, todas as formulações elaboradas podem ser aproveitadas em usos diversos. Mesmo com a seleção de algumas formulações consideradas ideais, sabe-se que nenhuma formulação deve ser descartada, pois a mesma pode ser aproveitada para outros usos que não os deste trabalho.

Assim, o objetivo deste trabalho foi produzir filmes à base de zeína adicionados de nanocarbonato, identificar a estrutura base do biomaterial e caracterizá-lo quanto as suas propriedades mecânicas, de barreira, solubilidade e cor.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e caracterizar filmes biodegradáveis produzidos à base de zeína, ácido oleico e nanocarbonato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir filmes à base de zeína adicionados com, 1 %, 2 % e 3 % de nanocarbonato;
- Identificar a estrutura básica dos biomateriais;
- Caracterizar os materiais quanto às suas propriedades mecânicas, de barreira, solubilidade em água e cor.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ZEÍNA

O milho, juntamente com o trigo e o arroz, é um dos cereais mais importantes do mundo, fornece nutrientes para os seres humanos e animais e é uma matéria-prima básica para a indústria de transformação, na produção de amido, óleo e proteínas, bebidas alcoólicas, adoçante, alimentos e combustível (ROJAS; CABALLERO, 2010).

A zeína é uma proteína do milho, de caráter hidrofóbico, devido à elevada concentração de aminoácidos não-polares, como leucina, alanina e prolina, que a torna insolúvel em água mesmo em baixa concentração e assim, sendo solúvel em soluções alcoólicas de 60-95% de etanol. Em álcool, é aberta parcialmente a estrutura em hélice da zeína proporcionando sua dissolução. A água, por ser uma molécula pequena, migra para a molécula de zeína fechada permitindo sua abertura e a molécula do solvente forma pontes de hidrogênio com o polímero (serina e treonina), tornando-a solúvel (TAVARES, 2010).

Com a zeína pode-se produzir filmes com excelentes propriedades de barreira à umidade e formando cobertura insípida, dura e transparente com grande estabilidade em alta umidade e calor, sendo normalmente usados para coberturas de doces, frutas secas, nozes, arroz, sementes e farmacêuticos. Um benefício adicional da zeína é a sua resistência natural ao ataque bacteriano e de alguns insetos (VILLADIEGO et al., 2005).

Zeínas são consideradas proteínas globulares e constituídas de frações classificadas de acordo com sua massa relativa (Mr) e solubilidade, como zeínas α , γ , β e δ . As zeínas α são as mais abundantes constituindo aproximadamente 80 % de todas as zeínas e correspondente as proteínas com Mr = 19 kDa (Z19) e Mr = 22 kDa (Z22) (FORATO et al., 2013).

A zeína do milho tem sido utilizada comercialmente como filme comestível em vários alimentos devido suas propriedades de barreira. Filmes de zeína são usados na indústria farmacêutica como cápsulas de revestimento para proteção e controle da liberação de flavor e aromas (GENNADIOS et al., 1994 apud MAIA et al., 2000).

Filmes de zeína possuem boas características de permeabilidade ao vapor de água e conferem brilho aos produtos revestidos (ROJAS; CABALLERO, 2010).

Por conseguinte, filmes produzidos a partir da diluição de zeínas puras apresentam também caráter hidrofóbico, o que pode ser potencialmente interessante para aplicações como revestimentos ou barreiras à umidade e ao vapor de água (FORATO et al., 2013).

A zeína é produzida comercialmente, ainda de forma limitada, a partir do glúten do milho, subproduto da moagem úmida de pouco valor comercial. O processo de extração convencional da zeína é feito por solução aquosa de álcool que deve ser removido ao final por evaporação obtendo-se a fração protéica mais ou menos pura, dependendo da eficiência de remoção do solvente (ALMEIDA, 2010).

3.2 EMBALAGENS PLÁSTICAS

A qualidade de um produto alimentício depende de suas características sensoriais, nutricionais e higiênicas, que mudam durante a estocagem e a comercialização. Muitos processos químicos e físicos têm sido desenvolvidos para preservar a qualidade dos alimentos. Contudo, é necessária embalagem adequada para conservação e comercialização do produto, por ter um papel preponderante na manutenção da qualidade dos alimentos (VILLADIEGO et al., 2005).

Hoje são produzidas, no mundo, milhares de embalagens diferentes por indústrias que transformam os metais, a celulose, os plásticos, o vidro, a madeira e as fibras têxteis em embalagens que movimentam anualmente cerca de um trilhão de dólares. O consumo de embalagens no mundo é muito heterogêneo, estando concentrado nos países desenvolvidos, basicamente na Europa (US\$ 135 bilhões), EUA (US\$ 120 bilhões) e Japão (US\$ 40 bilhões). De acordo com a World Packaging Organization, o segmento de papel e de papelão lidera o mercado mundial (33 %), seguido do segmento de plásticos (26 %), metálicos (25 %), vidros (6 %) e outros (10 %). A indústria de plásticos foi um dos setores que apresentou as maiores taxas de crescimento no mundo nos últimos 25 anos, refletindo principalmente a expansão do mercado consumidor e o dinamismo do processo de

substituição de produtos e materiais tradicionais por bens baseados em petroquímica (MDIC, 2005).

No entanto, as embalagens são, muitas vezes, associadas a problemas de poluição ambiental, uma vez que sua degradação no ambiente é muito demorada (Tabela 1) e tem sido bastante difícil, na prática, o controle de seu descarte apropriado, bem como a aplicação de programas de reciclagem.

Tabela 1 – Tempo de degradação de alguns materiais.

Material	Tempo de degradação
Alumínio	200 a 500 anos
Isopor	Indeterminado
Cordas de nylon	30 anos
Aço	Mais de 100 anos
Papel e papelão	Cerca de 6 meses
Plásticos	até 450 anos
Embalagens PET	Mais de 100 anos
Embalagens longa vida	Até 100 anos
Vidro	Indeterminado
Pneus	Indeterminado

Fonte: Magalhães (2001)

3.3 EMBALAGENS BIODEGRADÁVEIS

Existe a preocupação técnica e científica em se desenvolver materiais com propriedades que atendam às finalidades das embalagens, mas que também sejam comestíveis e/ou biodegradáveis.

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

Várias fontes têm sido estudadas para a criação de envoltórios comestíveis, incluindo gomas, ceras, óleos, resinas e carboidratos, associadas ou não a outros componentes. Alguns exemplos são: zeína:glicerina, glúten:glicerina, proteína isolada de soja:glicerina, metilcelulose:polietileno glicol, amido, amido:acetato de celulose, pectina, celulose e outros (FELLOWS, 2006).

Para a elaboração de uma solução filmogênica são necessários constituintes básicos como agentes de alto peso molecular, denominados formadores de matriz (lipídios, proteínas e polissacarídeos), solventes (água e etanol), agentes plasticizantes (glicerol, sorbitol, triacetina e ácidos graxos) e quando necessário um ajustador de pH. Cada um desses componentes é utilizado em diferentes combinações buscando oferecer características distintas para o biopolímero (BATISTA, 2004). Segundo Zhong e Ikeda (2012), a melhor condição de formulação de biomaterial utilizando a zeína é com sua solubilização em etanol 90%.

Outra característica dos filmes de zeína é sua fragilidade e, assim, plasticizantes são necessários para aumentar sua flexibilidade (GHANBARZADEH et al., 2006).

Em filmes e revestimentos comestíveis de amido, os plastificantes mais indicados para serem empregados são os polióis, como o glicerol e o sorbitol, que vão proporcionar aos materiais uma melhoria nas suas propriedades mecânicas. Outros tipos de aditivos geralmente utilizados são os agentes antimicrobianos, vitaminas, antioxidantes, aromatizantes e pigmentos (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

São também muito usados, ácidos graxos como o oléico, linoléico, esteárico e palmítico na formulação de filmes e revestimentos. Segundo Ha, Padua (2001) esses ácidos graxos insaturados fornecem maior flexibilidade aos filmes. Na literatura encontram-se inúmeros trabalhos usando o ácido oléico (LAI; PADUA, 1997; LAI; GEIL; PADUA, 1999; SANTOSA; PADUA, 1999; WANG; CROFTS; PADUA, 2003; LAWTON, 2004; ALMEIDA et al., 2010).

Os aditivos são substâncias adicionadas aos polímeros em pequenas quantidades para alterar a propriedade do material e conferir sua estabilidade durante o processamento. De um modo geral, eles devem ser eficientes em sua função, estáveis nas condições de processamento, de fácil dispersão, serem atóxicos e de baixo custo (RABELLO, 2000 apud NAIME, 2010).

3.4 NANOCOMPÓSITOS

Os nanocompósitos biodegradáveis, também chamados de nanobiocompósitos, consistem em nanopartículas dispersas em matrizes de polímeros biodegradáveis (AVÉROUS; BOQUILLON, 2004). Há um elevado número de potenciais aplicações da nanotecnologia na indústria alimentar, sendo uma das quais a área dos filmes e revestimentos, visando a melhoria do seu desempenho (PINHEIRO et al., 2010).

A aplicação de nanocompósitos em embalagens promete abrir novas possibilidades para melhorar não só as propriedades, mas também a eficiência, contribuindo para a preservação de alimentos frescos ao estender sua vida útil, além de reduzir os resíduos de embalagens (SORRENTINO et al., 2007). Em virtude das partículas de tamanho nanométrico obtidas por dispersão, esses nanocompósitos podem apresentar acentuada melhora quando comparados com os polímeros convencionais (microescala) (ASSIS et al., 2012), como, por exemplo: os nanocompósitos melhoram as propriedades das embalagens em termos de flexibilidade, durabilidade, estabilidade a temperatura e umidade, e as propriedades de barreira a gás; embalagens ativas, às quais são incorporados nanomateriais com propriedades nutricionais e/ou antimicrobianas, e nanosensores, que são empregados em embalagens inteligentes (CHAUDHRY e CASTLE, 2011).

Entre os aditivos mais comuns em nanocompósitos de matriz polimérica, encontram-se os carbonatos, os sulfatos, os alumino-silicatos e alguns óxidos metálicos (FORINI, 2008). Alguns exemplos ainda da utilização de nanopartículas como aditivos para melhorar o desempenho e as propriedades de embalagens são nanofibras de celulose (MOHANTY et al., 2003) e nanoargilas (silicatos em camadas) (BAE et al., 2009).

3.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DOS BIOPOLÍMEROS

O conhecimento da estrutura dos biopolímeros auxilia no entendimento de suas propriedades funcionais. Os tópicos seguintes apresentam as técnicas aqui utilizadas para caracterização desse tipo de material.

3.5.1 Microestrutura

Uma análise importante para avaliar a microestrutura de biopolímeros é a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Segundo Batista (2004), a MEV permite a visualização e a identificação da incorporação dos materiais formando uma estrutura homogênea ou, ainda, a separação dos mesmos originando uma estrutura heterogênea.

Outra técnica muito importante para complementar a MEV sobre a homogeneidade da matriz dos biofilmes é a Microscopia Óptica (MO), pois permite a sua caracterização pela observação da cor e forma dos componentes da matriz filmogênica (ALMEIDA, 2010).

3.5.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade é um fluxo, medido em estado estacionário, que descreve em que extensão um soluto se difunde, e qual a taxa a que este composto se difunde através do filme, estando a difusão relacionada com a concentração do soluto nos dois lados do filme (PINHEIRO et al., 2010).

Em se tratando de alimentos embalados, a permeabilidade ao vapor de água dos filmes é um fator que afeta sua qualidade e sua vida de prateleira. A permeabilidade ao vapor de água é a quantidade, em gramas, de vapor de água que passa através de um metro quadrado de material, em 24 h, sob condições pré-estabelecidas de temperatura e umidade relativa.

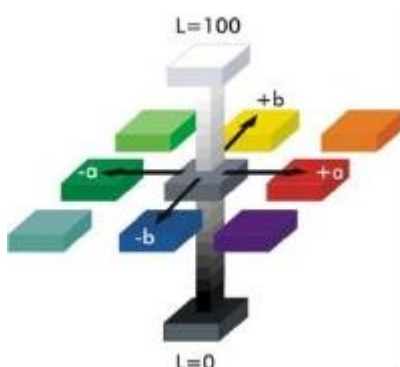
Segundo Brandelero, Grossmann e Yamashita (2013), a eficiência da substância hidrofóbica como barreira ao vapor de água pode estar relacionada com a razão entre as porções hidrofílicas e hidrofóbicas do filme e com as características da substância adicionada como polaridade, presença de insaturações ou ramificações.

Portanto, uma maior quantidade de glicerol diminui as forças intermoleculares entre as cadeias de macromoléculas adjacentes dos polímeros. Como efeito, ocorre a diminuição da temperatura de transição vítrea (T_g) e consequente aumento da flexibilidade do material (diminuindo sua resistência), o que afeta todas as propriedades funcionais dos biofilmes, inclusive a PVA (MALI et al., 2006).

3.5.3 Cor

Os padrões de medição de cor são definidos internacionalmente pela Comissão Internacional de Iluminação da seguinte forma: o espaço Lab. L^* , a^* e b^* representam os parâmetros espaciais (L , a , b), que são coordenadas associadas a um espaço vetorial retangular onde cada cor representa um ponto. Cada parâmetro diz respeito a um componente da cor na amostra, baseado no princípio do olho humano para a percepção de cores, e está disposto conforme a Figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática da escala Cielab.



Fonte: Hunterlab, 2013.

(L) percebe tons claros ou escuros, é o único parâmetro finito, que vai de $L = 0$, ausência total de luz, até $L = 100$, branco difuso;

- (a) percebe tons vermelhos a verdes, sendo aos vermelhos associados os valores positivos e aos verdes os negativos;
- (b) percebe tons de amarelos a azuis, sendo aos amarelos associados os valores positivos e aos azuis os negativos.

O método prevê também a orientação dos valores medidos por um padrão branco, ou padrão de comparação. Esse padrão é denominado branco, pois os seus valores de transmitância total e os parâmetros (L^* , a^* , b^*) medidos para ele serão desconsiderados das amostras consequentes.

Da escala Cielab, tem-se que o cálculo do parâmetro dE^* , associado à intensidade da cor, é dado pelo módulo da diferença de vetores da amostra e do padrão branco, ou outro padrão de comparação, e é dado pela Equação abaixo a partir dos parâmetros da escala Lab medidos pelo equipamento (HUNTERLAB, 2013).

$$dE = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad (\text{Eq. 1})$$

3.5.4 Solubilidade

A solubilidade em água é uma importante propriedade dos filmes para embalagens. Seu potencial de aplicação pode requerer insolubilidade para proteger a integridade do produto e a resistência à água. Entretanto, em outros casos, a solubilidade pode ser requerida no caso de encapsulação do alimento ou de aditivo (BERTUZZI et al., 2007 apud MATTA JÚNIOR, 2009).

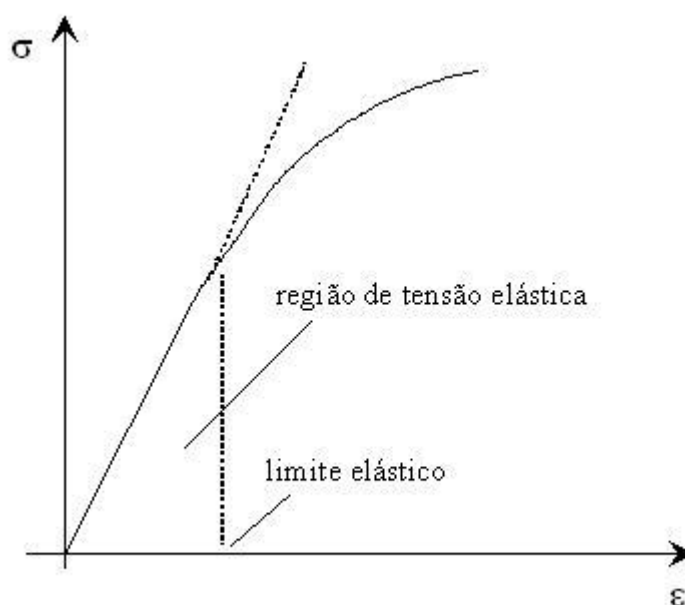
A solubilidade dos materiais é avaliada pela porcentagem de peso seco não solubilizado, após a imersão da amostra em água destilada por 24 h sob agitação. Pela diferença entre o peso seco inicial da amostra e peso seco após a solubilização, calcula-se a porção solúvel da amostra (GONTARD et al., 1994).

3.5.5 Propriedades mecânicas: Tensão de Ruptura ($R_{m\acute{a}x}$) e Porcentagem de alongação (E)

Tensão de ruptura " $R_{m\acute{a}x}$ " é a máxima força normal aplicada na seção transversal que o material em teste possa suportar e Porcentagem de alongação "E" é a relação entre a força de tensão e a deformação sofrida pelo material submetido à solicitação.

As propriedades de tensão expressam a resistência do material à deformação por alongamento quando submetido à tração. Observando uma curva característica de tensão versus deformação de filmes flexíveis (Figura 2), inicialmente o material oferece resistência crescente à solicitação de tração, a qual provoca seu alongamento. A partir de certo ponto, o aumento de resistência passa a ser menor para um mesmo aumento de deformação até o ponto de escoamento, a partir do qual é possível alongar o filme sem que este responda com um aumento de resistência. Continuando o alongamento, o material resiste até que ocorra sua ruptura (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

Figura 2 – Curva de tensão x deformação de filmes flexíveis.



3.5.6 Opacidade

A opacidade de um filme é um indicador da quantidade de luz que o atravessa. Quanto maior o valor de opacidade, menor será a quantidade de luz que atravessa o filme podendo esta barreira ser importante para controlar a incidência de luz nos produtos alimentares (PINHEIRO et al., 2010).

Para embalagens, normalmente, uma maior transparência é requerida, para que se possa mostrar seu conteúdo, no entanto, a transmissão de luz deve ser controlada quando os alimentos são susceptíveis à deterioração pela luz, como a oxidação lipídica, destruição da riboflavina e pigmentos naturais (MATTA JUNIOR, 2009; ALMEIDA, 2010).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de São José do Rio Preto-SP, e no Laboratório de Engenharia de Alimentos do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (USP), campus de São Paulo-SP.

Os filmes foram caracterizados quanto às suas propriedades mecânicas, de barreira, solubilidade e cor. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.1 MATERIAIS

A proteína zeína (Sigma®) foi utilizada na proporção de 20 g zeína/100 mL etanol 95% (PERNA-SERNA; LOPES-FILHO, 2013). Nanocarbonatos foram utilizados nas proporções de 1, 2 e 3 g/100 g de zeína. Foi utilizado glicerol (Merck, Brasil) na proporção de 30 g /100 g proteína como coadjuvante do agente plasticizante (ALMEIDA, 2010). Éster de sacarose de ácidos graxos foi utilizado na proporção de 0,875 g /100 g proteína para facilitar a formação da emulsão (nome comercial: SP70, umidade máxima: 4 g/100 g, Sisterna) (SOUZA, 2011). Foi utilizado ainda ácido oléico (VETEC, Brasil) na proporção de 70 g/ 100 g proteína (ALMEIDA, 2010).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação dos filmes de zeína

Para a formação dos filmes, a zeína (Sigma®) e uma solução aquosa de etanol 95 % foram agitados mecanicamente por 5 min e adicionados o glicerol, o emulsificante, o ácido oléico e o nanocarbonato nas proporções citadas anteriormente (Item 4.1) sob agitação mecânica a 250 rpm e 65 °C durante 10 min,

seguindo Kleen, Padua, Engeseth (2002). Em seguida, essa solução foi vertida em placas de acrílico com 14,0 cm de diâmetro e o material mantido em estufa à temperatura de 30 °C por cerca de 17 h para secagem. A quantidade de solução filmogênica colocada sobre cada placa (6 g) foi estabelecida a fim de que, ao final da secagem, cada placa contivesse a mesma quantidade de sólidos totais, garantindo, assim, filmes com espessura semelhante. Antes de realizar as análises de caracterização, os filmes foram acondicionados em dessecador por no mínimo 2 dias, à temperatura ambiente e com umidade relativa controlada com solução de cloreto de sódio (75 % UR) (KECHICHIAN et al., 2010; SOUZA, 2011; ARENAS, 2012).

4.2.2 Caracterização geral dos filmes

4.2.2.1 Aspecto visual

Foi avaliado através de observações visuais e táteis quanto à presença de fissuras, bolhas, partículas insolúveis ou poros abertos. Os filmes que não apresentaram superfície contínua e homogênea foram descartados, uma vez que poderiam comprometer os resultados das análises posteriores.

4.2.2.2 Espessura

A espessura das amostras pré-condicionadas (75 % UR) foi medida com micrômetro de ponta plana (MITUTOYO, SulAmericana Ltda., model 103-137, Brasil), com resolução de 1 µm, por meio de 5 medições em posições aleatórias de cada amostra do filme (SOUZA, 2011; ARENAS, 2011.)

4.2.3 Morfologia dos filmes

4.2.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microestrutura superficial dos filmes foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no Depto de Engenharia de Minas e Petróleo da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (USP). A sequência para a preparação do espécime incluiu a montagem sobre os suportes de alumínio (stubs) e a metalização (sputtering) segundo Ghanbarzadeh et al. (2007); Georget, Barker, Belton (2008), onde amostras dos filmes foram fixadas em stubs de 12 mm de diâmetro, com fita condutiva face dupla de carbono. As amostras foram metalizadas com platina por aproximadamente 60 s e, em seguida, observadas em microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 600FEG) a 10kV.

4.2.3.2 Microscopia Óptica (MO)

A Microscopia Óptica (MO) foi realizada no Laboratório de Microscopia da UNESP, campus de São José do Rio Preto. Foi utilizada a técnica de coloração Xylidine Ponceau em pH 2,5, um corante acidófilo que evidencia proteínas totais nesse pH (ALMEIDA et al., 2010).

Após a coloração, as lâminas foram secas em estufa (Odontobras ECB 1.2 Digital) por 24 h a 37 °C e 4 gotas de Bálsamo de Canadá foram adicionadas sobre a lâmina e adicionadas a lamínula. Por 24 h as lâminas foram secas a 25 °C para, então, serem analisadas em microscópio (Olympus BX60) com captador de imagens (Olympus DP-71, U-CMAD-2, U-TV1X).

4.2.4 Propriedades físicas dos filmes

4.2.4.1 Cor

As medidas de cor foram realizadas com dois objetivos:

- 1) Observar a variação da cor dos filmes ao longo do tempo de armazenamento. Cada formulação do filme foi usada como padrão branco no seu primeiro dia de armazenamento (tempo zero) e avaliadas após 7 d, 14 d e 30 d.
- 2) Comparar a cor entre os filmes adicionados com nanocarbonato e sem a adição.

A cor foi determinada em colorímetro ColorQuest XE (Hunter Lab, USA) (Figura 3), utilizando o sistema CIELAB, iluminante D65 e ângulo observador padrão 10°, segundo metodologia ASTM D2244-09b (2009).

Figura 3 – Equipamento ColorQuest XE utilizado para os testes de cor.



Foi medida a cor das amostras em espectro de onda de 400 a 700 nm com posição do filtro UV nominal, com área de visão de uma polegada quadrada no modo de transmitância total, que incide um feixe de luz normal à superfície do filme, a partir de uma fonte através da amostra. Essa luz transmitida é percebida pelo sensor do aparelho do lado oposto, que mede a sua intensidade para vários comprimentos de onda. Isso significa que a cor foi obtida das medições de valores para a luz transmitida.

Os testes foram feitos tomando-se amostras representativas de cada formulação (filme padrão e adicionados com 1, 2 e 3 % de nanocarbonato).

4.2.4.2 Opacidade

Foi determinada, em triplicata, em espectrofotômetro (Bioespectro, SP-220), como proposto por Almeida (2010). Os filmes foram cortados em retângulos e aderidos à parede interna da cubeta do espectrofotômetro. Foi feita a varredura na faixa do comprimento de onda da luz visível, de 200 a 800 nm. Embora a transparência dos filmes possa ser avaliada em diversos comprimentos de onda, a leitura a 600 nm é a mais comumente utilizada (MATTA JUNIOR, 2009; ALMEIDA, 2010).

As medidas foram feitas seis vezes para cada amostra e o valor médio considerado como resultado. A transparência dos filmes foi calculada usando a Equação 2.

$$Transparência = \frac{A_{600}}{X} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

A₆₀₀ = absorvância a 600 nm

X = espessura dos filmes (mm)

4.2.4.3 Atividade de água (aw)

A atividade de água foi medida diretamente em equipamento Aqualab (Decagon Devices, Inc. Series 3 TE, USA) em amostras de filme de 2 cm² pré-acondicionadas por 48 h a 75 % UR, antes da realização dos ensaios, em triplicata.

4.2.4.4 Teor de umidade

O conteúdo de umidade foi determinado por gravimetria em amostras de filme previamente cortadas com 2,5 cm de lado e pré-acondicionadas a 75 % UR, submetidas a secagem em estufa por 24h a 105 °C, em triplicata, onde as amostras eram pesadas a cada 2 h até peso constante (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

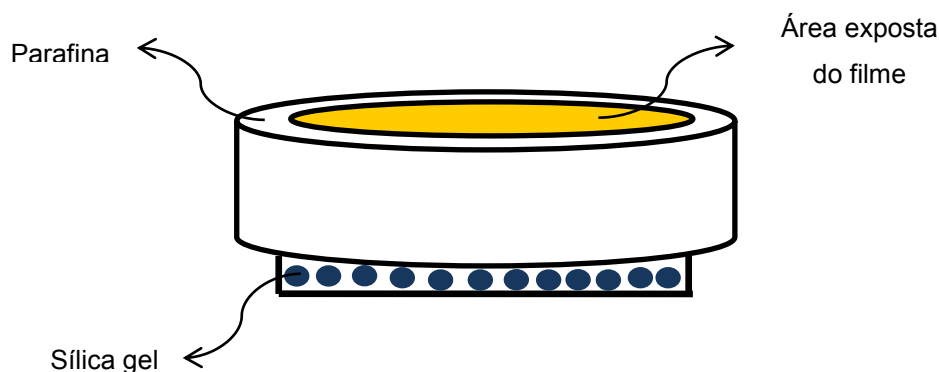
4.2.5 Propriedades de barreira dos filmes

4.2.5.1 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A Permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes foi determinada gravimetricamente a 25 °C onde as amostras foram caracterizadas pelo método gravimétrico, com base na metodologia ASTM E96/E96M-10 (2010).

Cada amostra de filme foi cortada em forma de disco e fixada sobre uma cápsula de permeação (Figura 4) feita de alumínio (PVA/4, REGMED, Brasil), com área igual a 44 cm² e selada com parafina. A selagem foi realizada para garantir que toda transferência e absorção de umidade ocorressem unicamente através da área exposta do filme. Dentro dessa cápsula, colocou-se sílica gel ativada em estufa a 200 °C por 24 h. É importante que haja uma distância de aproximadamente 6 mm entre a camada de sílica gel e o filme. A sílica é um dessecante, com alta afinidade ao vapor de água, o que permite quantificar o ganho de massa, ou seja, a quantidade de vapor de água que permeia pelo material a ser testado.

Figura 4 - Representação esquemática da cápsula de alumínio contendo o filme e sílica gel, vedada com parafina.



A PVA foi calculada empregando-se a Equação 3.

$$PVA = \frac{m \times e}{t \times A \times \Delta p} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

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

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

e = espessura do filme (mm)

t = tempo no qual ocorre ganho de massa (h)

A = área exposta do filme (m²)

Δp = diferença de pressão parcial de vapor de água a 75 % UR e 0 % UR, ambos a 25 °C (kPa)

4.2.5.2 Solubilidade em água

A solubilidade em água dos filmes foi realizada conforme Gontard et al. (1994). Inicialmente, três discos de cada amostra de filme com 2,0 cm de diâmetro foram cortados e submetidos à secagem por 24 h a 105 °C, sendo posteriormente pesados. As amostras foram imersas em 50 mL de água destilada, mantidas sob agitação lenta e constante (72 rpm) em shaker (Marconi, MA-410) por 24 h à

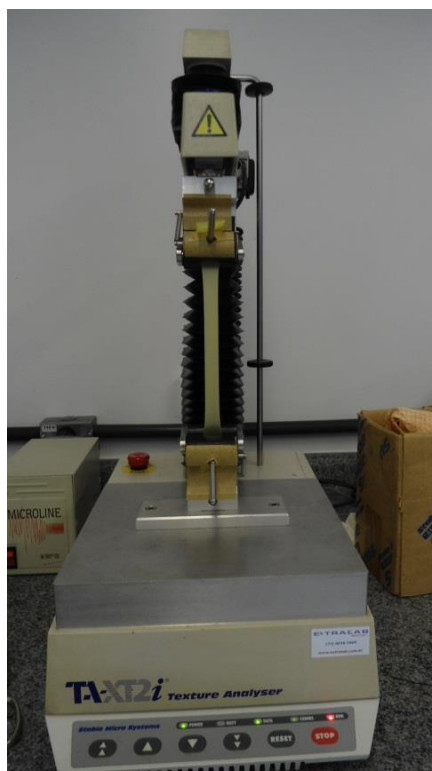
temperatura de 25 °C. Passado este período os filmes foram retirados da água e secos em estufa a 105 °C por 24 h para determinação da massa seca final. A solubilidade foi calculada como a relação entre a matéria seca final e a matéria seca inicial dividida pela matéria seca inicial.

4.2.5.3 Propriedades mecânicas

As análises de resistência à tração ($R_{\text{máx}}$) e porcentagem de alongação (E) foram realizadas no Laboratório de Engenharia de Alimentos do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (USP), no texturômetro TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Reino Unido) (Figura 05), com o probe A/TGT, de acordo com o método ASTM D882-10 (2010), modificado conforme a necessidade.

Amostras retangulares (130 mm x 25 mm) pré-condicionadas (75 % UR) por no mínimo 48 h, cortadas com guilhotina de dois cortes (2G-15, REGMED, Brasil), foram colocadas entre as garras do probe, com separação inicial de 10 mm e submetidas à tração a uma velocidade de $0,8 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. A resistência máxima à tração foi calculada dividindo a força máxima obtida pela área original da amostra (de acordo com a sua espessura mínima). A porcentagem de alongação na ruptura foi calculada dividindo o alongamento do corpo de prova na ruptura pelo seu comprimento inicial, que corresponde à distância entre as garras. A força máxima e o alongamento do corpo de prova na ruptura foram obtidos das curvas força-deformação, com a ajuda do software EXPONENT, versão 4.0.13.0.

Figura 05 – Análise de tração dos filmes.



4.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados dos ensaios foram analisados estatisticamente utilizando o programa Minitab 16, considerando o erro puro. O teste de Tukey foi aplicado para análise das diferenças significativas entre os resultados obtidos, no intervalo de confiança de 95 %.

5 RESULTADOS

A maioria das formulações testadas produziu filmes biodegradáveis homogêneos, livre de partículas insolúveis, flexíveis, espessura uniforme e de coloração amarela. A cor amarela é atribuída à presença de carotenóides do milho que ficou agregado à zeína. Os carotenóides são amplamente encontrados em vegetais e gorduras animais e possuem cor intensa variando do amarelo ao vermelho (ALBUQUERQUE et al., 2005). Os filmes adicionados de nanocarbonato apresentaram uma percepção ao toque mais gordurosa do que os filmes sem adição do nanocomposto.

5.1 ESPESSURA

A Tabela 2 apresenta os valores médios e desvios-padrão da espessura dos filmes, de acordo com a quantidade de nanocarbonato utilizada – 1, 2, 3 % e 0 % (sem adição de nanocarbonato) - obtidos da análise de espessura descrita no item 4.2.2.2.

Tabela 2 – Valores de espessura dos filmes de zeína adicionados ou não de nanocarbonato.

Nanocarbonato (%)	Espessura (µm)
0	160,00 ± 12,46 ^a
1	160,38 ± 11,62 ^a
2	160,88 ± 12,95 ^a
3	160,00 ± 10,80 ^a

* Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

A análise de variância (ANOVA) mostrou que a espessura não foi influenciada pela adição de nanocarbonato. As variações na espessura de um material implicam em problemas no seu desempenho mecânico e de barreira, comprometendo a eficiência da embalagem (SARANTOPÓULOS, 2002). A homogeneidade da espessura era esperada, pois a quantidade de solução filmogênica em cada placa (6 g) foi testada previamente e definida a fim de se ter placas com espessuras semelhantes e uniformes. A uniformidade da espessura é, portanto, um parâmetro importante para não influenciar nas análises e determinações das propriedades do material e facilitar comparações dos resultados entre os tratamentos.

5.2 COR

A Tabela 3 apresenta, respectivamente, os valores médios e os desvios-padrão dos parâmetros de cor L^* , a^* , b^* dos filmes, de acordo com a quantidade de nanocarbonato utilizada – 1, 2, 3 % e 0 % (sem adição de nanocarbonato) - obtidos da análise de cor descrita no item 4.2.4.1.

Tabela 3 - Parâmetros de cor L^* , a^* e b^* dos filmes de zeína adicionados ou não de nanocarbonato.

Nanocarbonato (%)	L^*	a^*	b^*
0	$87,638 \pm 1,406^d$	$-0,882 \pm 0,279^a$	$40,682 \pm 3,400^a$
1	$90,509 \pm 1,749^b$	$-1,356 \pm 0,314^c$	$35,249 \pm 4,952^b$
2	$89,675 \pm 1,483^c$	$-1,078 \pm 0,257^b$	$35,138 \pm 4,464^b$
3	$92,057 \pm 0,881^a$	$-1,370 \pm 0,264^c$	$28,142 \pm 3,840^c$

* Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A Figura 6 a seguir apresenta as curvas obtidas nas análises de cor dos filmes sem adição e com a adição de nanocarbonato (0, 1, 2 e 3, respectivamente). A Figura 7 apresenta a diferença na tonalidade de cor dos filmes.

Figura 6 – Curvas do parâmetro L^* de cor dos filmes adicionados ou não de nanocarbonato.

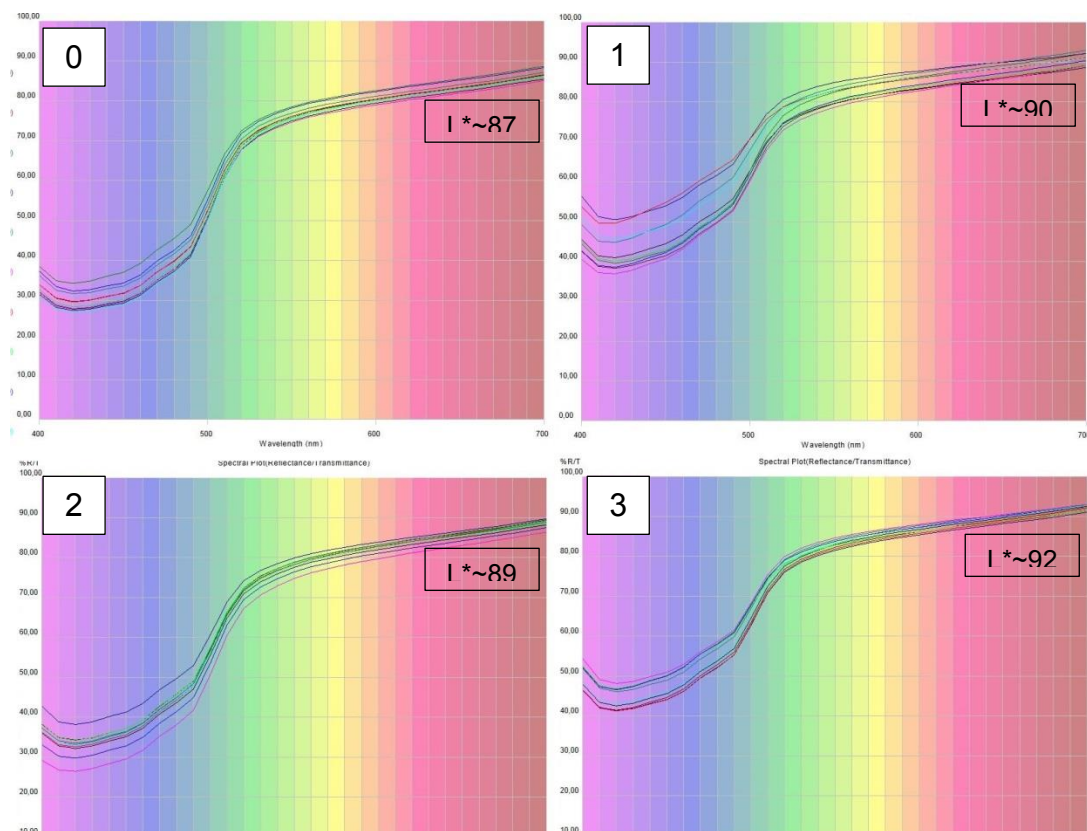
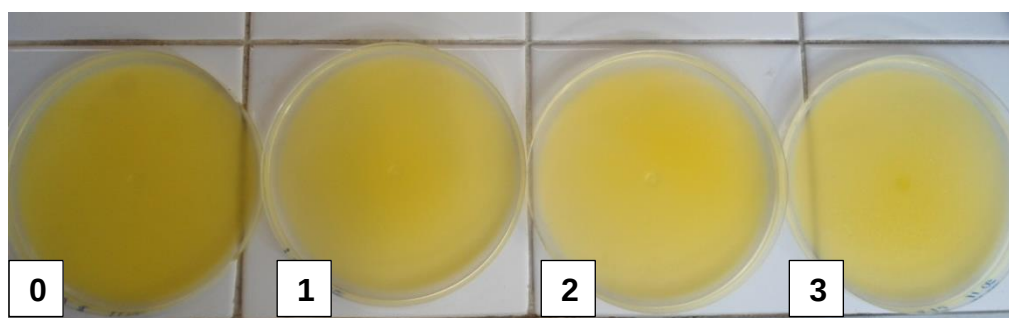


Figura 7 – Coloração dos filmes de zeína adicionados ou não de nanocarbonato.



Os resultados mostram que a adição de nanocarbonato aumentou significativamente o parâmetro L^* , que indica a luminosidade, isto é, os filmes ficaram mais claros conforme o aumento da concentração de nanocarbonato. Resultado análogo pode ser observado com os valores encontrados de b^* (que percebem tons de azuis a amarelos, sendo aos amarelos associados valores positivos). Verifica-se uma redução do valor b^* conforme aumentou-se a

concentração de nanocarbonato confirmando a diminuição de intensidade da cor amarela.

A Tabela 4 apresenta os valores médios e os desvios-padrão do parâmetro de cor L^* dos filmes, de acordo com a adição de nanocarbonato utilizada, medidos no tempo 0 (inicial), após 7, 14 e 30 dias, para avaliar se houve variação na coloração dos filmes em função do tempo.

Tabela 4 - Parâmetros de cor L^* de filmes de zeína adicionados ou não de nanocarbonato em função do tempo.

Tempo (dias)	Nanocarbonato (%)			
	0	1	2	3
0	88,474 $\pm$ 1,255 ^a	91,682 $\pm$ 1,182 ^a	90,570 $\pm$ 1,187 ^a	92,148 $\pm$ 1,009 ^a
7	86,803 $\pm$ 1,007 ^b	89,336 $\pm$ 1,410 ^b	89,008 $\pm$ 1,214 ^b	91,817 $\pm$ 0,964 ^a
14	86,026 $\pm$ 0,781 ^{bc}	89,840 $\pm$ 1,758 ^b	88,408 $\pm$ 1,706 ^b	91,945 $\pm$ 0,906 ^a
30	85,685 $\pm$ 0,945 ^c	89,647 $\pm$ 0,918 ^b	88,195 $\pm$ 1,053 ^b	91,574 $\pm$ 1,149 ^a

* Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

De acordo com a Tabela 4, observa-se que os filmes sem adição de nanocarbonato e os adicionados com 1 % e 2 % apresentaram valores de L^* menores após 7 dias de armazenamento, ou seja, os filmes tornaram-se levemente mais escuros e que, a partir de 7 dias, a luminosidade dos filmes permaneceu constante, ou seja, o escurecimento não progrediu. Já com adição de 3% de nanocarbonato a cor (luminosidade) permaneceu constante durante todo período de armazenamento, indicando uma maior estabilidade da cor. A variação na coloração pode ser devido à oxidação de parte dos componentes do material, principalmente do ácido oleico. De certa forma a maior concentração de nanocarbonato minimizou essa oxidação.

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As eletromicrografias (Figura 8) mostram a morfologia da superfície dos filmes de zeína sem adição de nanocarbonato e com adição de 1, 2 e 3 %, respectivamente.

Os resultados da MEV representam análises feitas na superfície do filme que estava em contato com o ar, uma vez que havia depósitos globulares e a estrutura bem definida. Padua e Wang (2002) afirmaram que os filmes quando produzidos pela técnica “casting” apresentam formas distintas decorrentes do processo de secagem proporcionando diferenças morfológicas entre os dois lados: o superior em contato com o ar e o inferior em contato com a superfície. Durante a secagem o lado na superfície de contato é mais homogêneo e brilhante resultando numa microestrutura mais lisa e sem uma característica definida, enquanto o lado em contato com o ar apresenta-se irregular e opaco, com uma microestrutura mostrando depósitos globulares.

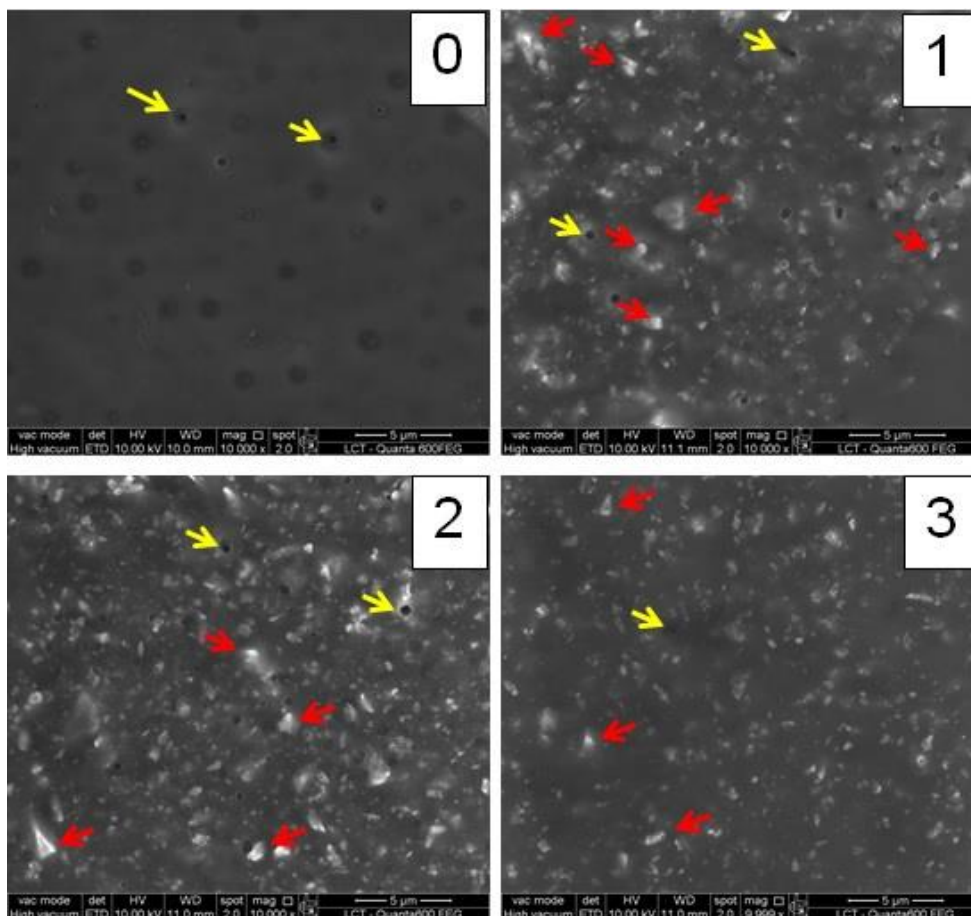
O filme de zeína sem adição de nanocarbonato (0) apresentou pontos negros (identificados com setas amarelas) e os filmes de zeína adicionados de nanocarbonato 1 %, 2 % e 3 % (1, 2 e 3, respectivamente) mostraram quantidades menores desses pontos (também identificados com setas amarelas). Para estes filmes com nanocarbonato verificou-se também pontos claros que indicam partículas ou aglomerados de nanocarbonato não solubilizados e/ou dispersos na matriz (identificados com setas vermelhas).

Monterrey-Quintero; Sobral (2000) e Tavares (2010) sugeriram que os pontos negros indicados na Figura 8 (setas amarelas), fossem micro-bolhas incrustadas na matriz ou espaços ocupados pelo glicerol antes do processo de secagem.

A partir destas informações da literatura, concluiu-se que os pontos negros apresentados nas eletromicrografias do presente trabalho são de fato micro-poros (micro-bolhas). Observou-se uma menor quantidade destas bolhas nos filmes adicionados de nanocarbonato, apesar da presença de partículas insolúveis do nanocomposto na matriz do filme (indicados pelas setas vermelhas).

Observa-se que a adição do nanocarbonato modifica a aparência devido à interrupções na continuidade da matriz polimérica. Isto sugere uma dispersão aleatória das nanopartículas, não ocorrendo intercalação na matriz filmogênica. Esta situação pode interferir negativamente nas propriedades de resitência do material, o que não é desejável.

Figura 8 - Eletromicrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos filmes de zeína sem adição de nanocarbonato (0), e com 1 % ,(1); 2 % (2); e 3 % de nanocarbonato (3).



5.4 MICROSCOPIA ÓPTICA (MO)

Para complementar a MEV sobre a homogeneidade da matriz dos filmes realizou-se a MO utilizando a técnica descrita no item 4.2.3.2. Este ensaio é importante pois permite a caracterização da matriz filmogênica através da observação da cor e forma dos seus componentes, onde as proteínas são coradas de vermelho e os glóbulos de gordura apresentam-se em tons brancos. As imagens captadas para cada uma das amostras são mostradas nas Figuras 9 e 10 onde os aumentos e correspondentes escalas das fotos foram de 4× (1 mm) e 10× (500 µm), respectivamente.

Figura 9 – Microscopias ópticas dos filmes (escala 1mm): sem adição de nanocarbonato (0), 1 % de nanocarbonato (1), 2 % de nanocarbonato (2) e 3 % de nanocarbonato (3).

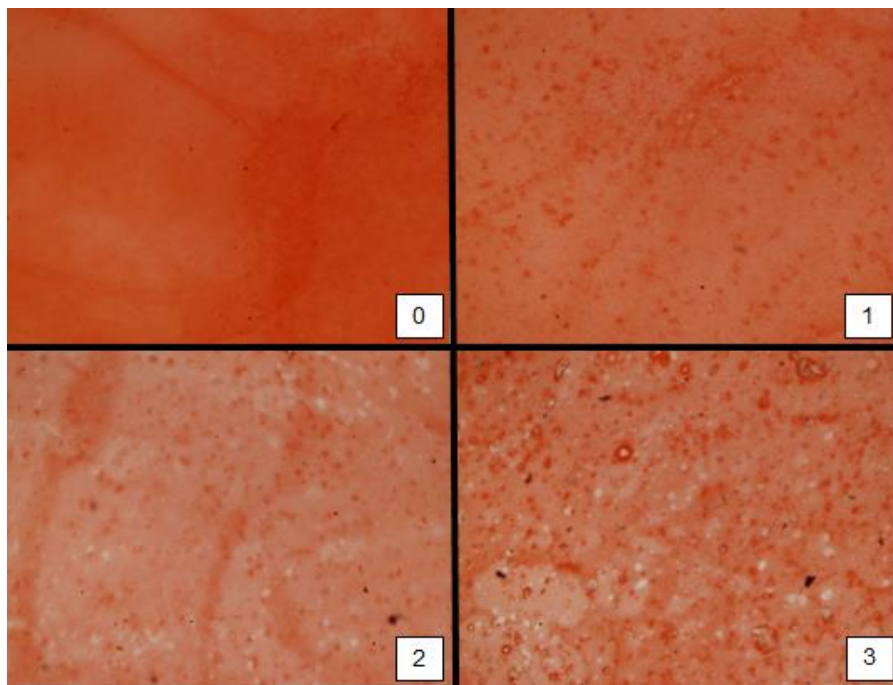
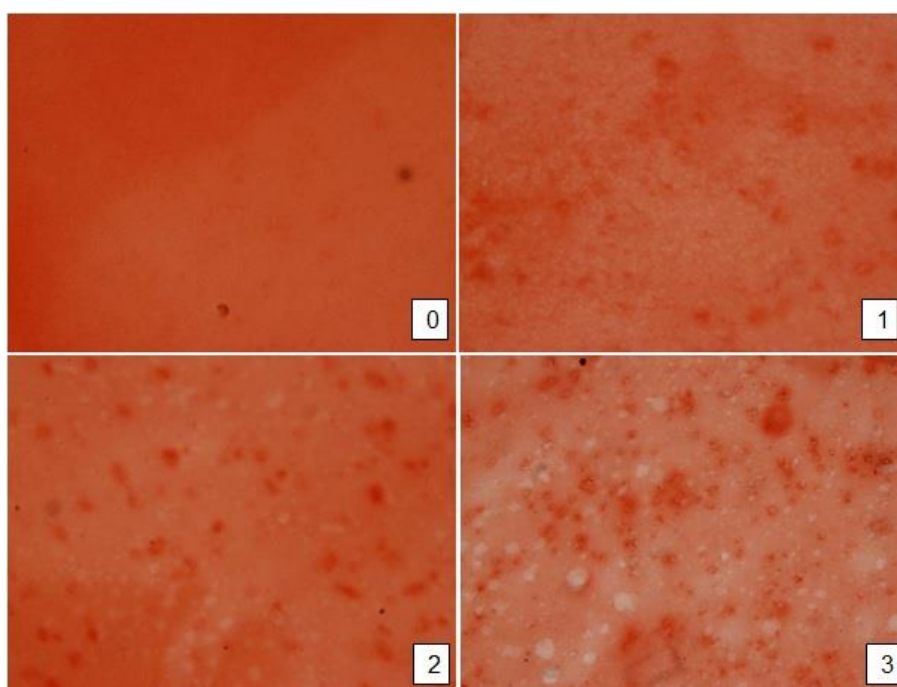


Figura 10 – Microscopias ópticas dos filmes (escala 500 μ m): sem adição de nanocarbonato (0), 1 % de nanocarbonato (1), 2 % de nanocarbonato (2) e 3 % de nanocarbonato (3).



As micrografias mostram uma menor quantidade de pontos brancos (glóbulos de gordura) no filme padrão (sem adição de nanocarbonato) do que nos filmes adicionados de nanocarbonato, confirmando o que foi encontrado na análise de MEV, onde os pontos negros eram micro-bolhas de ar e não glóbulos de gordura.

Como citado anteriormente, Almeida et al. (2010) realizaram análise de Microscopia Óptica em filmes de zeína adicionados de goma xantana e concluíram que a diminuição do tamanho dos glóbulos de gordura foi decorrente da melhor homogeneização do óleo. Ao contrário do observado por esses autores, observou-se nas micrografias do presente trabalho que houve aumento do tamanho dos glóbulos de gordura a medida que aumentou a concentração de nanocarbonato.

Portanto, os filmes sem adição de nanocarbonato formaram uma matriz mais homogênea onde, com adição do nanocomposto, observou-se uma maior quantidade de pontos brancos. A fraca interação existente entre a zeína e o nanocarbonato provocou a exclusão do glicerol da matriz do filme e as manchas brancas como se observa nas Figuras 9 e 10. Por essa razão, os filmes adicionados de nanocarbonato apresentaram também uma percepção ao toque gordurosa.

5.5 OPACIDADE

A Tabela 5 apresenta os valores médios e os desvios-padrão de opacidade dos filmes, de acordo com a quantidade de nanocarbonato utilizada.

Tabela 5 - Opacidade dos filmes de zeína adicionados ou não de nanocarbonato.

Nanocarbonato (%)	Espessura (mm)	Absorbância a 600nm	Opacidade (Abs.nm ⁻¹)
0	0,139 ± 0,010 ^a	0,714 ± 0,088 ^a	5,116 ± 0,299 ^a
1	0,128 ± 0,008 ^a	0,160 ± 0,007 ^b	1,253 ± 0,121 ^b
2	0,140 ± 0,011 ^a	0,148 ± 0,026 ^b	1,070 ± 0,238 ^b
3	0,151 ± 0,044 ^a	0,119 ± 0,024 ^b	0,805 ± 0,070 ^b
Polietileno ¹	0,050 ± 0,001	0,046 ± 0,001	2,657 ± 0,090

* Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

¹ Almeida, 2010.

A opacidade do filme de zeína padrão (sem adição de nanocarbonato) foi maior quando comparada aos filmes adicionados de nanocarbonato, isto pode ter ocorrido pelo fato do filme padrão ter apresentado micro-bolhas em sua estrutura, o que pode ter dificultado a passagem de luz.

Conforme esperado, a opacidade do filme de zeína foi maior quando comparado ao filme de polietileno. No entanto, apesar de a zeína apresentar coloração amarelada, característica dos pigmentos carotenóides naturais do milho (Sessa et al., 2003), após a adição de nanocarbonato a opacidade dos filmes foi menor do que a de filmes de polietileno, que são bastante translúcidos.

Tavares (2010) encontrou um valor de opacidade semelhante à opacidade do filme padrão deste trabalho ($5,81 \pm 0,20 \text{ Abs.nm}^{-1}$), no entanto quando adicionou argilas na formulação não houve alteração da opacidade dos filmes.

5.6 ATIVIDADE DE ÁGUA (a_w)

A Tabela 6 mostra os valores médios e desvios-padrão da atividade de água dos filmes de zeína adicionados ou não de nanocarbonato.

Tabela 6 – Valores de atividade de água dos filmes de zeína adicionados ou não de nanocarbonato.

Nanocarbonato (%)	a_w
0	$0,7594 \pm 0,1150^a$
1	$0,6858 \pm 0,0146^a$
2	$0,6910 \pm 0,0075^a$
3	$0,6970 \pm 0,0094^a$

* Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os valores de atividade de água não diferiram estatisticamente com a adição das diferentes concentrações de nanocarbonato. Estes resultados eram esperados, uma vez que todos os filmes foram armazenados nas mesmas condições, isto é, a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e 75% UR.

5.7 PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA (PVA)

A PVA é importante para conhecer os níveis de proteção à entrada ou saída de umidade do material revestido pelo filme. A Tabela 7 apresenta os valores médios e os desvios-padrão da permeabilidade ao vapor de água dos filmes, de acordo com a quantidade de nanocarbonato adicionada, obtidos no teste de permeabilidade ao vapor de água, descrito no item 4.2.5.1.

Tabela 7 – Valores de permeabilidade de água e desvios-padrão dos filmes de zeína padrão e adicionados de nanocarbonato.

Nanocarbonato (%)	PVA (g.mm/m ² .dia.KPa)
0	7,0406 ± 0,4550 ^a
1	6,3167 ± 0,7527 ^a
2	5,9561 ± 1,4587 ^a
3	6,5761 ± 0,9273 ^a
Celofane	7,271 ¹

* Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

¹ SOUZA, 2011.

Observa-se que não houve diferença significativa na PVA dos filmes adicionados ou não de nanocarbonato. No entanto, segundo Brandelero, Grossmann e Yamashita (2013), a eficiência da substância hidrofóbica como barreira ao vapor de água pode estar relacionada com a razão entre as porções hidrofílicas e hidrofóbicas do filme e com as características da substância adicionada como polaridade, presença de insaturações ou ramificações. Visto isto, pode-se notar uma tendência de ligeira diminuição da PVA para os filmes adicionados com nanocarbonato, quando comparados com o filme padrão.

Comparando ainda os resultados de PVA dos filmes produzidos neste trabalho com o celofane, largamente utilizado na indústria de embalagens de

alimentos, observa-se que os biofilmes de zeína apresentaram valores de PVA bastante similares, tornando-os vantajosos para aplicação na indústria alimentícia.

5.8 SOLUBILIDADE E TEOR DE UMIDADE

A Tabela 8 abaixo mostra os teores de umidade e de solubilidade e os desvios-padrão dos filmes de zeína adicionados ou não de nanocarbonato.

Tabela 8 – Teor de umidade e de solubilidade dos filmes à base de zeína e nanocarbonato.

Nanocarbonato (%)	Teor de Umidade (%)	Solubilidade (%)
0	14,564 $\pm$ 1,050 ^a	0,4243 $\pm$ 0,1717 ^b
1	13,985 $\pm$ 0,513 ^a	1,5186 $\pm$ 1,1625 ^b
2	13,302 $\pm$ 0,348 ^{a,b}	3,8851 $\pm$ 0,1339 ^a
3	11,837 $\pm$ 0,340 ^b	4,0889 $\pm$ 0,3484 ^a

* Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Observou-se que a medida que a concentração de nanocarbonato aumenta, o teor de umidade dos filmes diminuiu, sendo o filme com 3% de nanocarbonato estatisticamente diferente dos demais, com teor de umidade menor.

Quanto à solubilidade, o filme padrão apresentou a menor solubilidade em água, sendo, portanto, o menos hidrofílico, devido a maior força intermolecular entre as proteínas destes filmes, com matriz mais homogênea. Resultado análogo foi encontrado por Perna-Serna e Lopes-Filho (2013), onde concentrações maiores de etanol apresentaram filmes com estrutura mais densa e menor solubilidade em água. À medida que a concentração de nanocarbonato aumenta a solubilidade do filme aumenta, confirmando a análise de MEV onde com o aumento da concentração de nanocarbonato a matriz tornou-se mais heterogênea, tornando o filme mais solúvel.

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

5.9 PROPRIEDADES MECÂNICAS

A Tabela 9 mostra os valores de resistência à tração ($R_{\text{máx}}$) e porcentagem de alongação (E) e os desvios-padrão dos filmes à base de zeína e dos filmes com adição de nanocarbonato.

Tabela 9 – Resistência máxima à tração ($R_{\text{máx}}$) e Porcentagem de alongação (E) e desvios-padrão dos filmes à base de zeína e nanocarbonato.

Nanocarbonato (%)	$R_{\text{máx}}$ (MPa)	E (%)
0	$1,7583 \pm 0,0479^a$	$1088,8 \pm 36,2^b$
1	$1,6731 \pm 0,1647^b$	$1445,0 \pm 43,2^a$
2	$1,6656 \pm 0,0677^b$	$1421,9 \pm 56,6^a$
3	$1,6545 \pm 0,0565^b$	$1403,6 \pm 60,9^a$

* Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9, e em complementação com as observações das micrografias da presente pesquisa, em que se observa que os filmes adicionados de nanocarbonato apresentaram grandes glóbulos de gordura em sua estrutura, os resultados de tração puderam ser confirmados. Correlacionando o presente trabalho com os resultados encontrados por Almeida (2010) e Debeaufort; Voilley (1995) quanto maior o diâmetro dos glóbulos de gordura dentro da matriz, menor a resistência à tração do filme, onde pode-se observar que os filmes adicionados de nanocarbonato apresentaram maior percentual de alongação e menor resistência máxima à tração.

Segundo ainda Matta Junior (2009), geralmente, quando a estrutura do filme torna-se menos rígida, as propriedades de resistência/tensão são reduzidas e o alongamento aumenta. Um alongamento maior indica que o filme é mais flexível. Portanto, de acordo com os resultados obtidos, podemos afirmar que, com adição de

nanocarbonatos, os filmes de zeína se tornam mais flexíveis e elásticos, conforme pode ser observado na Figura 11 abaixo, onde mostra o equipamento utilizado tracionando a amostra do filme adicionado de 3% de nanocarbonato.

6 CONCLUSÕES

Visualmente todos os filmes apresentaram-se flexíveis, translúcidos, com coloração amarela, homogêneos e com espessura uniforme. Os filmes adicionados de nanocarbonato apresentaram uma percepção mais gordurosa ao toque.

Verificou-se na MEV e na MO que os filmes adicionados de nanocarbonato apresentaram uma quantidade muito reduzida de poros, mas um aumento do tamanho dos glóbulos de gordura.

O parâmetro L^* , que indica luminosidade, dos filmes adicionados de nanocarbonato foi maior do que o encontrado no filme padrão (sem adição de nanocarbonato) indicando que a adição de nanocarbonato tornou o filme mais claro. Outro resultado positivo da adição do nanocomposto foi observado na manutenção da cor, onde com a adição de 3% do nanocarbonato a cor manteve-se constante ao longo do período de armazenamento de 30 dias.

Os filmes sem adição de nanocarbonato tiveram maior opacidade quando comparados com os filmes adicionados do nanocomposto.

A atividade de água não foi afetada com a adição de nanocarbonato nos filmes.

Não houve diferença significativa na PVA dos filmes adicionados ou não de nanocarbonato.

À medida que a concentração de nanocarbonato aumentou, o teor de umidade dos filmes diminuiu, e quanto à solubilidade, o filme padrão apresentou a menor solubilidade em água, sendo, portanto, o biofilme menos hidrofílico.

Com relação às propriedades mecânicas, os filmes adicionados de nanocarbonato apresentaram-se mais elásticos e flexíveis, com $R_{máx}$ menor e % alongação maior quando comparados com o filme padrão, sem adição de nanocarbonato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALMEIDA, C.B. **Características estruturais e funcionais de biofilmes de zeína e óleos vegetais comestíveis**. 2010. 124f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2010.

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

AVÉROUS, L.; BOQUILLON, N. Biocomposites based on plasticized starch thermal and mechanical behaviours. **Carbohydrate Polymers**, Philadelphia, USA, v. 56, p. 111-112, 2004.

ARENAS, A.M.Z. **Filme biodegradável à base de fécula de mandioca como potencial indicador de mudança de pH**. 2012. 131f. Dissertação (Mestrado) Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ASSIS, L.M et al. Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 99-109, abr./jun, 2012.

BAE, H. J.; PARK, H. J.; HONG, S. I.; BYUN, Y. J.; DARBY, D. O.; KIMMEL, R. M.; WHITESIDE, W. S. Effect of clay content, homogenization RPM, pH, and ultrasonication on mechanical and barrier properties of fish gelatin/montmorillonite nanocomposite films. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 42, n. 6, p. 1179-1186, 2009.

BARBOSA-CÁNOVAS, GV, FONTANA JR., AJ, SCHMIDT, SJ, LABUZA, TP. Water Activity in Foods: Fundamentals and applications. **Ames: Blackwell Publishing**. p. 435, 2007.

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

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

BERTUZZI, M.A.; ARMADA, M.; GOTTIFREDI J.C., 2007 apud MATTA JUNIOR, M. D. **Caracterização de biofilmes obtidos a partir de amido de ervilha (*Pisum sativum*) associado à goma xantana e glicerol**. 2009. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

BRANDELERO, R.P.H, GROSSMANN, M.V., YAMASHITA, F. Hidrofilicidade de filmes de amido/poli (butileno adipato co-tereftalato) (pbat) adicionados de tween 80 e óleo de soja. **Polímeros**, São Carlos, SP, vol. 23, n. 2, p. 270-275, 2013.

CHAUDRY, Q.; CASTLE, L. Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 22, n. 11, p. 595-603, 2011.

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

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

FELLOWS, P.J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e práticas**. 2. ed. Trad. F.C. Oliveira et al. Porto Alegre: Artmed, p. 602, 2006.

FORATO, L.A., et al. Propriedades Mecânicas e Molhabilidade de Filmes de Zeínas Extraídas de Glúten de Milho. **Polímeros**, São Carlos, SP, vol. 23, n. 1, p. 42-48, 2013.

FORINI, S.H. **Estudo da dispersão e incorporação de argilas esmectitas em plástico**. 114 f. tese (Doutorado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São paulo, 2008.

GAVA, A.J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. 7. ed. São Paulo: Nobel, p.121, 1988.

GAVA, A.J.; SILVA, C.A.B.; FRIAS, J.R.G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, p. 221, 2008

GENNADIOS, A., McHUGH, T. H., WELLER, C. L., KROCHTA, J. M., 1994 apud MAIA, H.L.; PORTE, A.; SOUZA, F.V. Filmes comestíveis: aspectos gerais, propriedades de barreira a umidade e oxigênio. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 105-128, jan./jun. 2000.

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

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

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

HUNTERLAB. **Hunterlab**. Disponível em: <://www.hunterlab.com>. Acesso em: 18 jun. 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas**: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4 ed. Brasília: ANVISA, 98-99, 2005.

KECHICHIAN, V., et al., Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch, **LWT - Food Science and Technology**, London, 2010.

KLEEN, D.; PADUA, G. W.; ENGESETH, N. Stabilization of lipids in a biodegradable zein-oleate film by incorporation of antioxidants. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 79, n. 1-6, p. 687-694, 2002.

KROCHTA, J.M. 2002 apud HERNANDEZ-IZQUIERDO, V.M; KROCHTA, J.M. Thermoplastic Processing of Proteins for Film Formation - A Review. **Journal of food science**, England, v. 73, n. 2, 2008.

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

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

LAWTON, J. W. Zein: A History of Processing and Use. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 79, n. 1, p. 1-18, 2002.

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

MAGALHÃES, M. A. Tempo de degradação de materiais descartados no meio ambiente. **Jornal do Centro Mineiro para Conservação da Natureza (CMCN)**. Viçosa–MG, ano 08, n.37, jan/fev/mar 2001.

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

MALI, S.; GROSSMANN, M.V.E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Revisões Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 137-156, Londrina, 2010.

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

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

MDIC. **Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior**. O Futuro da Indústria de Transformados Plásticos: embalagens plásticas para alimentos. Brasília: Instituto Evaldo Lodi – Núcleo Central, p. 25-34, 2005.

MOHANTY, A. K.; DRZAL, L. T.; MISRA, M. Nano-reinforcement of bio-based polymers-the hope and reality. **Polymeric Materials: Science and Engineering**, New Jersey, v. 88, p. 60-61, 2003.

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

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

PENA-SERNA, C.; LOPES-FILHO, J.F. Influence of ethanol and glycerol concentration over functional and structural properties of zein-oleic acid films. **Materials Chemistry and Physics**, Philadelphia, USA, n. 142, p. 580-585, 2013.

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

PINHEIRO, A.C.; CERQUEIRA, M.A.; SOUZA, B.W.S.; MARTINS, J.T.; TEIXEIRA, J.A.; VICENTE, A.A. Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares. **Boletim de Biotecnologia**, Portugal, n. 85, p. 18-28, 2010.

POVEDA, P.N.S.; SIVAL, L.G.A. O uso de nano carbonato de cálcio como extensor de pigmento branco a base de dióxido de titânio aplicado em polietileno. Congresso Brasileiro de Polímeros, 11. **Anais...** São Paulo, 2011.

RABELLO, M. apud NAIME, N. **Embalagens ativas de fonte renovável**. 2010. 116 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

REINERS, R.A.; WALL, J.S.; INGLETT, G.E., 1973 apud ALMEIDA, C.B. **Características estruturais e funcionais de biofilmes de zeína e óleos vegetais comestíveis**. 2010. 124f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2010.

ROJAS, I.M.; CABALLERO, J.I.M. Efecto del tipo y contenido de aceites esenciales sobre las propiedades mecánicas y barrera de películas comestibles basadas en zeína. **Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos**, Universidad Publica de Navarra, 171 p., 2010.

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

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

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

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

SOUZA, A. C. **Desenvolvimento de embalagem biodegradável ativa a base de fécula de mandioca e agentes antimicrobianos naturais**. 2011. 137 f. Tese (Doutorado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

TAVARES, L.L. **Efeito da adição de argilas modificadas nas propriedades de biofilmes produzidos a base de zeína**. 2010. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2010.

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

VILLADIEGO, A. M. D.; SOARES, N. F. F.; ANDRADE, N. J.; PUSCHMANN, R.; MINIM, V. P. R.; CRUZ, R. Filmes e revestimentos comestíveis na conservação de produtos alimentícios. **Revista CERES**, Viçosa, MG, v. 52, n. 300, p. 221-243, 2005.

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

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

ZHONG, Q.; IKEDA, S. Viscoelastic properties of concentrated aqueous ethanol suspensions of α -zein. **Food Hydrocolloids**, Tennessee, v. 28, p. 46-52, 2012.