



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**



**Efeito da adição de surfactantes e do ajuste de pH sobre
filmes a base de gelatina, triacetina, ácidos graxos e ceras de
carnaúba e de cana-de-açúcar.**

Andréa Helena Ferreira
Química

Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Orientador

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos, da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título
de Mestre em Alimentos e Nutrição.**

Campinas –2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Ferreira, Andréa Helena
F413e Efeito da adição de surfactantes e do ajuste de pH sobre filmes a base de gelatina, triacetina, ácidos graxos e cera de carnaúba e de cana-de-açúcar/ Andréa Helena Ferreira. – Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Dissertação (mestrado): Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Biofilmes. 2. Gelatina. 3. Cera de cana-de-açúcar. 4. Cera de cana-de-açúcar. 5. Surfactantes. I. Grosso, Raimundo Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Effect of the addition of surfactants and pH adjustment on films based on gelatin, triacetin, fatty acids, carnauba and sugar cane waxes.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Biofilms, Gelatin, Sugar cane wax, Carnauba Wax, Surfactants

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição
Banca examinadora: Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Florência Cecília Menegalli
Patrícia Sayuri Tanada Palmu
Rosemary Aparecida de Carvalho

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
(orientador)

Profa. Dra. Florência Cecília Menegalli
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
(membro)

Dra. Patrícia Sayuri Tanada Palmu
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP
(membro)

Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP
(membro)

“Ó Senhor Deus, tu me examinas e me conheces todos os meus pensamentos. Tu me vês quando estou trabalhando e quando estou descansando; tu sabes tudo o que faço. Antes mesmo que eu fale, tu já sabes o que vou dizer. Estás em volta de mim, por todos os lados, e me proteges com teu poder.”

(Salmos 139, 1-5)

“A pessoa faz planos, mas quem dirige sua vida é Deus, o Senhor.”

(Provérbios 16, 9)

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Marilene** e **Nelson** por serem um exemplo constante em minha vida de dedicação, perseverança, incentivo e amor e aos meus irmãos **Patrícia** e **Emerson** pela companhia e afeto. Ao **Leonardo** pelo carinho, compreensão, amizade e principalmente pelo seu amor!*

AGRADECIMENTOS

Sem Ele minha vida não teria sentido, a Deus e a Jesus Cristo agradeço todos os dias por ter me escolhido, por ter guiado meus passos todos dos dias, por ter escutado as minhas orações, pelos ensinamentos e pelo amor eterno. “A TI DOU GRAÇAS TODOS OS DIAS!”

Todo especial ao meu orientador Carlos Raimundo Ferreira Grosso pela orientação, pela sua presença constante em todas as etapas do desenvolvimento da dissertação. Pelo carinho e amizade, obrigada pela confiança conferida a mim.

Aos membros da banca de defesa, Florência Cecília Menegalli, Patrícia Sayuri Tanada-Palmu e Rosemary Aparecida de Carvalho importante contribuição na redação deste trabalho, pelo tempo disponibilizado e pela atenção.

A todos do Laboratório de Controle de Qualidade: Taciana, Renata, Eduardo, Isabela pela força e pela amizade em todos os momentos. A Noemi pela alegria e por muitos momentos de troca de conhecimentos. As estagiárias Heloisa e Gabriela por tudo, por que se não fosse elas eu estaria despigmentando cera até hoje. A Karina pela amizade, carinho e por sempre estar por perto apoiando e dando força.

A Larissa Bertan e a Patrícia Palmu pelos ensinamentos no início da parte prática da tese, obrigada pela paciência e pelo carinho.

Ao Carlos Alberto Rodrigues do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Far-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro pela dedicação em captar as imagens de microscopia confocal de varredura a laser e agradeço também o Prof. Dr. Antonio Carlos Siani pelas dicas na despigmentação da cera de cana-de-açúcar e por ceder o microscópio para captação das imagens.

A todos do Laboratório de Óleos e Gorduras – Departamento de Tecnologia de Alimentos – FEA - UNICAMP: Marcela, Giovana, Greice. Em especial a Kelly pela paciência e pela amizade, a Cláudia pelos ensinamentos,

pelo carinho e a disponibilidade a mim dispensada em vários momentos. Ao Renato pela ajuda e disponibilidade na realização das análises térmicas de DSC. Ao Prof. Dr. Daniel Barrera-Arellano ela gentileza no fornecimento, caracterização e sugestões com a cera de cana-de-açúcar.

A todos do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Instituto de Biologia, em especial a Antônia e Adriane pela atenção.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Aloise Pilli do Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química – UNICAMP pelo fornecimento de reagentes e pelas dicas no processo de derivatização da cera de cana-de-açúcar.

Ao Prof. Dr. Watson Loh do Departamento de Físico-Química, Instituto de Química – UNICAMP pela disponibilidade e pelo conhecimento compartilhado na área dos surfactantes.

Ao Prof. Dr. José Roberto Trigo do Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia pelas dicas na análise das cromatografias.

A Prof. Dr. Renata do Laboratório de Serviços, Departamento de Tecnologia de Alimentos – FEA – UNICAMP pela amizade e pela disponibilidade na parte prática (texturômetro). A Alice do Laboratório de Embalagens pela paciência e pelas diversas tentativas na obtenção dos valores de permeabilidade ao oxigênio dos filmes.

A todos os funcionários do DEPAN: Cidinha, Sônia, Fátima, Suzana, Chico, Eliana, Lia, Dona Magda, Karla, Iara, Adriana, pela amizade e colaboração. A Dona Nice pelo carinho, pela amizade obrigada pelas conversas e por ter sido minha amiga sincera nos momentos de tristes e felizes.

Aos meus amigos do DEPAN: Suzi, Karina, Lucia, Cláudia, Elis, Maria Inês, Fabiane, Márcio pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos amigos da FEA: Carol, Luciana Esper, Márcia (Assis), Elias a todos agradeço pelo carinho e pelos bons momentos compartilhados. A Emmanuelle pela doçura, carinho, compreensão, paciência e por fazer dos meus dias em Campinas especiais.

A todos da secretária de Pós-Graduação, em especial ao Cosme pela dedicação e paciência.

As amigas preciosas que fiz ao longo desses dois anos de convivência estarão sempre no meu coração, Cristina, Andréa Pinchelli, Kayna, Pilar e em especial a Patrícia Trevisan pela amizade, força e pelos conselhos agradeço a Deus por ter te conhecido e tenho certeza que foi Ele que te colocou no meu caminho, obrigada por tudo!

A Ana Sílvia pela grande amizade, confiança; pelo carinho, por me adotar muitas vezes (casa e comida!) por sempre estar presente em todos os momentos felizes e tristes da minha vida, também agradeço ao João pela paciência. Obrigada pelos momentos preciosos que passamos juntas!

As minhas amigas que estão em constante torcida e sempre me dando força em todos os momentos Carolina, Thaís, Luciana, Paulina, Rama e Deborah.

Pelas orações pelo amor e incentivo da minha família e da família do Leonardo, em especial a Denyse pela amizade, conselho e pelo seu grande carinho.

A CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Índice Geral

Índice Geral	xiii
Índice de Figuras	xvii
Índice de Tabelas	xxvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	3
1.1.1 Geral.....	3
1.1.2 Específicos	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Biofilmes	5
2.1.1 Agente formador de filme.....	6
2.1.2 Agente Plastificante	8
2.1.3 Solvente e Ajustadores de pH	10
2.2 Produção dos filmes	11
2.3 Filmes Emulsionados.....	12
2.4 Características dos Filmes.....	14
2.4.1 Espessura.....	14
2.4.2 Homogeneidade/ Aparência	14
2.4.3 Sabor e Aroma.....	15
2.4.4 Cor e Opacidade.....	15
2.5 Outras propriedades dos biofilmes	15
2.5.1 Propriedades de barreira	16
2.5.2 Propriedades Mecânicas	17
2.5.3 Solubilidade em água	18
2.5.4 Isotermas de sorção	18
2.5.5 Análise Calorimétrica	19
2.5.6 Microscopia.....	20
2.6 Gelatina	21
2.7 Ceras	23
2.8 Triacetina	26
2.9 Surfactante	26

2.9.1 Características e definições	26
2.9.2 Agente emulsificante.....	27
2.9.3 Concentração Micelar Crítica.....	29
2.9.4 Balanço Hidrofílico e Lipofílico	30
2.9.5 Classificação dos Surfactantes	32
3. Materiais e Métodos.....	35
3.1 Matéria-Prima	35
3.1.1 Gelatina	35
3.1.2 Cera de Cana-de-Açúcar Despigmentada	35
3.2 Métodos	36
3.2.1 Extração e Purificação da cera de cana-de-açúcar	36
3.2.2 Despigmentação da cera de cana-de-açúcar	36
3.2.3 Caracterização físico-química das ceras	37
3.2.3.1 Teor de Fósforo (colorimétrico).....	37
3.2.3.2 Índice de Saponificação.....	37
3.2.3.3 Determinação da Matéria Insaponificável	37
3.2.3.4 Índice de Iodo	38
3.2.3.5 Teor de Clorofila	38
3.2.3.6 Teor de Cinzas.....	38
3.2.3.7 Teor de Umidade	38
3.2.3.8 Índice de Acidez.....	38
3.2.3.9 Índice de Peróxido:	39
3.2.4 Composição em ácidos e álcoois graxos	39
3.2.4.1 Cromatografia em Camada Delgada	39
3.2.4.2 Cromatografia Gasosa.....	40
3.2.5 Testes Preliminares	41
3.2.6 Elaboração dos filmes.....	43
3.2.7 Caracterização dos filmes.....	44
3.2.7.1 Aspecto visual.....	44
3.2.7.2 Espessura	45
3.2.7.3 Permeabilidade ao vapor de água	45

3.2.7.4 Solubilidade em água	45
3.2.7.5 Propriedades mecânicas	46
3.2.7.6 Opacidade	46
3.2.7.7 Microscopia eletrônica de varredura	46
3.2.7.8 Microscopia confocal de varredura a laser	47
3.2.7.9 Isotermas de sorção	48
3.2.7.10 Calorimetria Diferencial de Varredura	49
3.2.7.11 Análise Estatística	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Ensaio Preliminares	51
4.1.1 Concentração de Triacetina	51
4.1.2 Condições para a elaboração e a composição dos surfactantes na formulação dos filmes biodegradáveis	53
4.1.3 Despigmentação e Caracterização das ceras de cana-de-açúcar	58
4.1.4 Concentração das ceras nos filmes	62
4.1.5 Espessura dos filmes	63
4.2 Permeabilidade ao vapor de água	66
4.3 Propriedades mecânicas	84
4.4 Solubilidade	107
4.5 Opacidade	114
4.6 Microscopia eletrônica de varredura	120
4.7 Microscopia confocal de varredura laser	134
4.8 Isotermas de Sorção	148
4.9 Análise Térmica	155
5. CONCLUSÕES	161
6. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	163
7. Referência Bibliográfica	165
ANEXO	181

Índice de Figuras

Figura 1: Incorporação de um composto hidrofóbico em uma micela de SDS em um sistema água/ óleo.	27
Figura 2. Algumas estruturas típicas formadas devido à associação das moléculas de surfactante	28
Figura 3. Ilustração de uma titulação condutivimétrica com um surfactante iônico. O ponto de inflexão das retas fornece a cmc	30
Figura 4. Estrutura química da molécula de Tween 80.	33
Figura 5. Fluxograma do teste preliminar para definir a composição dos surfactantes e as condições de elaboração os filmes biodegradáveis.	42
Figura 6. Fluxograma dos filmes produzidos com diferentes formulações produzidas para elaboração dos filmes.	44
Figura 7. Aspecto visual da solução filmogênica contendo triacetina, blenda de ácido esteárico-palmítico e cera de cana-de-açúcar e a mistura de surfactante (75% de Tween 80/ 25% de SDS) com pH natural =5,5 da solução filmogênica. .	54
Figura 8. Aspecto visual da solução filmogênica contendo triacetina, blenda de ácido esteárico-palmítico e cera de cana-de-açúcar e a mistura de surfactante (75% de Tween 80/25% de SDS) com pH =8,5 da solução filmogênica.	54
Figura 9. Aspecto visual da solução filmogênica contendo triacetina, blenda de ácido esteárico-palmítico e cera de cana-de-açúcar e a mistura de surfactante (50% de Tween 80/ 50% de SDS) com pH=8,5 da solução filmogênica.	55
Figura 10. Aspecto visual da solução filmogênica contendo triacetina, blenda de ácido esteárico-palmítico e cera de carnaúba e a mistura de surfactante (100% de Tween 80) com pH=8,5 da solução filmogênica.....	55
Figura 11. Aspecto visual da solução filmogênica contendo triacetina, blenda de ácido esteárico-palmítico e cera de carnaúba e a mistura de surfactante (75% de SDS / 50% de Tween 80) com pH=8,5 da solução filmogênica.	56

Figura 12. Aspecto visual da solução filmogênica contendo triacetina, blenda de ácido esteárico-palmítico e cera de carnaúba e a mistura de surfactante (50% de SDS / 50% de Tween 80) com pH=8,5 da solução filmogênica.	56
Figura 13. Coloração da cera de cana-de-açúcar em diversos tratamentos variando os solventes: (A) 100% de acetona; (B) 90% de acetona/ 10% de etanol; (C) 75% de acetona/ 25% de etanol; (D) 50% de acetona/ 50% de etanol e (E) 100% de etanol.	59
Figura 14. Cera de cana-de-açúcar despigmentada (A) obtida através da despigmentação da cera de cana de açúcar purificada (B).	60
Figura 15. Efeito do aumento da concentração da mistura surfactantes nos filmes de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos e cera de cana-de-açúcar em duas condições de pHs (com ajuste=8,5 e sem ajuste= 5,5) sobre a permeabilidade ao vapor de água.	71
Figura 16. Comportamento da PVA com e sem ajuste de pH nos filmes de gelatina (0g de material hidrofóbico- MH); adicionado de triacetina (1g de MH); blenda de ácidos graxos (2g de MH); triacetina e blenda (3g de MH); triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (3,5g de MH) e a mistura 3:1 Tween 80/SDS na concentração de 160%.....	73
Figura 17. Comportamento da PVA com e sem ajuste de pH nos filmes de gelatina (0g de material hidrofóbico- MH); adicionado de triacetina (1g de MH); blenda de ácidos graxos (2g de MH); triacetina e blenda (3g de MH); triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (3,5g de MH) e a mistura 3:1 Tween 80/SDS na concentração de 120%.....	73
Figura 18. Efeito do aumento da concentração da mistura surfactantes nos filmes de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos e cera de carnaúba com pH ajustado 8,5 na permeabilidade ao vapor de água (PVA).	77
Figura 19. Efeito do aumento da concentração da mistura de surfactantes (3:1 Tween 80/SDS) nos filmes de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos e cera de cana-de-açúcar em duas condições de pHs (com ajuste=8,5 e sem ajuste= 5,5) sobre a tensão na ruptura.	90

Figura 20. Efeito do aumento da concentração da mistura de surfactantes (3:1 Tween 80/SDS) nos filmes de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos e cera de cana-de-açúcar em duas condições de pHs (com ajuste=8,5 e sem ajuste= 5,5) sobre a elongação.....	90
Figura 21. RT dos filmes de gelatina com e sem ajuste de pH (0g de material hidrofóbico- MH); adicionado de triacetina (1g de MH); blenda de ácidos graxos (2g de MH); triacetina e blenda (3g de MH); triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (3,5g de MH) e a mistura 3:1 Tween 80/SDS na concentração de 160%..	93
Figura 22. Elongação com e sem ajuste de pH dos filmes de gelatina (0g de material hidrofóbico- MH); adicionado de triacetina (1g de MH); blenda de ácidos graxos (2g de MH); triacetina e blenda (3g de MH); triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (3,5g de MH) e a mistura 3:1 Tween 80/SDS na concentração de 160%.....	93
Figura 23. TR dos filmes de gelatina com e sem ajuste de pH (0g de material hidrofóbico- MH); adicionado de triacetina (1g de MH); blenda de ácidos graxos (2g de MH); triacetina e blenda (3g de MH); triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (3,5g de MH) e a mistura 3:1 Tween 80/SDS na concentração de 120%..	94
Figura 24. Elongação dos filmes de gelatina com e sem ajuste de pH (0g de material hidrofóbico- MH); adicionado de triacetina (1g de MH); blenda de ácidos graxos (2g de MH); triacetina e blenda (3g de MH); triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (3,5g de MH) e a mistura 3:1 Tween 80/SDS na concentração de 120%.....	94
Figura 25. Efeito do aumento da concentração da mistura surfactantes (1:3 Tween 80/SDS) nos filmes de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos e cera de carnaúba com pH ajustado=8,5 e tensão na ruptura.	97
Figura 26. Efeito do aumento da concentração da mistura surfactantes (1:3 Tween 80/SDS) nos filmes de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos e cera de carnaúba com pH ajustado=8,5 e elongação.....	98
Figura 27. Solubilidade em água com e sem ajuste de pH nos filmes de gelatina (0g de material hidrofóbico – MH); adicionado de triacetina (1g de MH); blenda de ácido graxo (2g de MH); triacetina e blenda (3g de MH); triacetina, blenda e cera	

de cana-de-açúcar (3,5g de MH) e a mistura 3:1 Tween 80/SDS na concentração de 120%.....	110
Figura 28. Solubilidade em água com e sem ajuste de pH nos filmes de gelatina (0g de material hidrofóbico – MH); adicionado de triacetina (1g de MH); blenda de ácido graxo (2g de MH); triacetina e blenda (3g de MH); triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (3,5g de MH) e a mistura 3:1 Tween 80/SDS na concentração de 160%.....	110
Figura 29. Comportamento da opacidade com e sem ajuste de pH nos filmes de gelatina (0g de material hidrofóbico – MH); adicionado de triacetina (1g de MH); blenda (2g de MH); triacetina e blenda (3g de MH); triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (3,5g de MH) e a mistura 3:1 Tween 80/SDS na concentração de 120%.....	116
Figura 30. Opacidade com e sem ajuste de pH dos filmes de gelatina (0g de material hidrofóbico – MH); adicionado de triacetina (1g de MH); blenda (2g de MH); triacetina e blenda (3g de MH); triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (3,5g de MH) e a mistura 3:1 Tween 80/SDS na concentração de 160%.....	117
Figura 31. Imagens captadas por microscopia eletrônica de varredura dos seguintes filmes (sem ajuste de pH=5,5): (A) Gelatina (2000x); (B) Gelatina/Triacetina (700x); (C) Gelatina/Blenda de ácido esteárico-palmítico (700x); (D) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico (700x); (E) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de cana-de-açúcar 5% (700x); (F) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de carnaúba 5% (700x).....	122
Figura 32. Imagens captadas por microscopia eletrônica de varredura dos seguintes filmes (com ajuste de pH=8,5): (A) Gelatina (700x); (B) Gelatina/Triacetina (700x); (C) Gelatina/Blenda de ácido esteárico-palmítico (700x); (D) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico (700x); (E) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de cana-de-açúcar 5% (700x); (F) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de carnaúba 5% (700x).....	123

Figura 33. Imagens captadas por microscopia eletrônica de varredura dos seguintes filmes adicionados de 160% da mistura de surfactantes, (75% da mistura Tween 80 e 25% SDS) (sem ajuste de pH=5,5): (A) Gelatina (700x); (B) Gelatina/Triacetina (700x); (C) Gelatina/Blenda de ácido esteárico-palmítico/ (700x); (D) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico (700x); (E) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de cana-de-açúcar 5% (700x)..... 128

Figura 34. Imagens captadas por MEV dos seguintes filmes adicionados de 160% da mistura de surfactantes, (75% da mistura Tween 80 e 25% SDS) (com ajuste de pH=8,5): (A) Gelatina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico (700x); (B) Gelatina/Triacetina/Blenda de ácido esteárico-palmítico (700x); (C) Gelatina/Triacetina/Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de cana-de-açúcar 5% (700x) e adicionando 120% da mistura de surfactantes, (50% da mistura Tween 80 e 50% SDS) (com ajuste de pH=8,5) nas seguintes formulações: (D) Gelatina/Triacetina/Blenda de ácido esteárico-palmítico (700x); (E) Gelatina/Triacetina/Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de cana-de-açúcar 5% (700x)..... 129

Figura 35. Imagens captadas por microscopia eletrônica de varredura dos seguintes filmes adicionados de 120% da mistura de surfactantes, (75% da mistura Tween 80 e 25% SDS) (sem ajuste de pH=5,5) de ácido esteárico-palmítico/ (700x); (D) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico (700x); (E) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de cana-de-açúcar 5% (700x)..... 130

Figura 36. Imagens captadas por microscopia eletrônica de varredura dos seguintes filmes adicionados de 120% da mistura de surfactantes, onde 75% da mistura Tween 80 e 25% SDS (com ajuste de pH=8,5): (A) Gelatina (700x); (B) Gelatina/Triacetina (700x); (C) Gelatina/Blenda de ácido esteárico-palmítico/ (700x); (D) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico (700x); (E) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de cana-de-açúcar 5% (700x)..... 131

Figura 37. Imagens captadas por microscopia eletrônica de varredura dos seguintes filmes adicionados de 60% de Tween 80 (com ajuste de pH=8,5): (A) Gelatina (300x); (B) Gelatina/Triacetina (300x); (C) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico (700x); (D) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de carnaúba 5% (700x). 132

Figura 38. Imagens captadas por microscopia eletrônica de varredura dos seguintes filmes adicionados de 80% da mistura de surfactante, (75% da mistura SDS e 25% da mistura Tween80) (com ajuste de pH=8,5): (A) Gelatina/Blenda de ácido esteárico-palmítico (700x); (B) Gelatina/Triacetina/Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de carnaúba 5% (700x) (C) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de carnaúba 5%/ 120% de mistura de surfactantes, (25% da mistura Tween 80 e os outros 75% SDS) (700x); (D) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de carnaúba 5%/ 100% de mistura de surfactantes, (50% da mistura Tween 80 e os outros 50% SDS) (700x)..... 133

Figura 39. Imagens captadas por microscopia confocal a laser (20x) de filme (sem ajuste de pH=5,5) de gelatina, triacetina (10%). (A) DIC (Contraste Interferencial Diferencial de fase); (B) Nile Red (triacetina corada com Nile Red); (C) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (D) Merge (sobreposição da gelatina corada –FITC, triacetina corada com Nile Red e do DIC)..... 135

Figura 40. Imagens captadas por microscopia confocal a laser (20x) de filme (sem ajuste de pH=5,5) de gelatina e blenda de ácido esteárico-palmítico (20%). (A) DIC (Contraste Interferencial Diferencial de fase); (B) Nile Red (blenda corada com Nile Red); (C) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (D) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada –FITC, blenda corada com Nile Red); (E) Merge (sobreposição da gelatina corada –FITC, triacetina corada com Nile Red e do DIC)..... 137

Figura 41. Imagens captadas por microscopia confocal a laser (20x) de filme de gelatina, triacetina(10%), blenda de ácido esteárico-palmítico (20%), sem ajuste de pH=5,5: (A) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (B) Nile Red (triacetina e blenda corada com Nile Red); (C) FITC-Nile Red (sobreposição da

gelatina corada –FITC, triacetina e blenda corada com Nile Red); e filmes com ajuste de pH=8,5: (D) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (E) Nile Red (triacetina e blenda corada com Nile Red); (F) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada – FITC, triacetina e blenda corada com Nile Red). 139

Figura 42. Imagens captadas por microscopia confocal a laser (20x) de filme de gelatina, triacetina (10%), blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) e cera de cana-de-açúcar (5%), sem ajuste de pH=5,5: (A) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (B) Nile Red (triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); (C) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada –FITC, triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); e filmes com ajuste de pH=8,5: (D) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (E) Nile Red (triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); (F) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada – FITC, triacetina, blenda e cera corada com Nile Red)..... 140

Figura 43. Imagens captadas por microscopia confocal a laser (20x) de filme de gelatina, triacetina (10%), blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) e cera de carnaúba (5%), sem ajuste de pH=5,5: (A) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (B) Nile Red (triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); (C) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada –FITC, triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); e filmes com ajuste de pH=8,5: (D) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (E) Nile Red (triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); (F) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada – FITC, triacetina, blenda e cera corada com Nile Red)..... 141

Figura 44. Imagens captadas por microscopia confocal a laser (20x) de filme de gelatina, triacetina (10%), blenda de ácido esteárico-palmítico (20%), cera de cana-de-açúcar (5%) e 160% da mistura de surfactantes (75% de Tween/25% SDS), sem ajuste de pH=5,5: (A) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (B) Nile Red (triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); (C) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada –FITC, triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); e filmes com ajuste de pH=8,5: (D) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (E) Nile Red (triacetina, blenda e cera corada

com Nile Red); (F) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada – FITC, triacetina, blenda e cera corada com Nile Red)..... 144

Figura 45. Imagens captadas por microscopia confocal a laser (20x) de filme de gelatina, triacetina (10%), blenda de ácido esteárico-palmítico (20%), cera de cana-de-açúcar (5%) e 120% da mistura de surfactantes (75% de Tween/25% SDS), sem ajuste de pH=5,5: (A) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (B) Nile Red (triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); (C) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada –FITC, triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); e filmes com ajuste de pH=8,5: (D) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (E) Nile Red (triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); (F) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada – FITC, triacetina, blenda e cera corada com Nile Red)..... 145

Figura 46. Imagens captadas por microscopia confocal a laser (20x) de filme (com ajuste de pH=8,5) de gelatina, triacetina (10%), blenda de ácido esteárico-palmítico (20%), cera de carnaúba (5%), adicionados de 60% de Tween: (A) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (B) Nile Red (triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); (C) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada –FITC, triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); e filmes adicionados de 100% de mistura de surfactante (50% de Tween/50% de SDS) : (D) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (E) Nile Red (triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); (F) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada – FITC, triacetina, blenda e cera corada com Nile Red)..... 146

Figura 47. Imagens captadas por microscopia confocal a laser (20x) de filme (com ajuste de pH=8,5) de gelatina, triacetina (10%), blenda de ácido esteárico-palmítico (20%), cera de carnaúba (5%) e 80% de mistura de surfactante (75% de SDS/ 25% de Tween): (A) DIC (Contraste Interferencial Diferencial de fase); (B) Nile Red (triacetina, blenda e cera coradas com Nile Red); (C) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (D) Merge (sobreposição da gelatina corada – FITC, triacetina, blenda e cera coradas com Nile Red e do DIC)..... 147

Figura 48. Isortema de adsorção dos filmes sem pH=5,5 ou com ajuste de pH=8,5 de gelatina, triacetina (10%), blenda de ácido esteárico-palmítico, cera de cana-

de-açúcar (5%) com a presença ou ausente de surfactante (160% de mistura de surfactante, onde 75% de tween/25% de SDS) , ajustadas pela equação de GAB, na temperatura de 25°C.	151
Figura 49. Isotherma de adsorção dos filmes sem pH=5,5 ou com ajuste de pH=8,5) de gelatina, triacetina (10%), blenda de ácido esteárico-palmítico, cera de carnaúba (5%) com a presença ou ausente de surfactante (160% de mistura de surfactante, onde 75% de tween/25% de SDS ou 3:1 Tween 80/SDS), ajustadas pela equação de GAB, na temperatura de 25°C.	154
Figura 50. Termograma obtido por DSC dos filmes (com ajuste de pH=8,5) de gelatina, triacetina (10%) (A), gelatina, triacetina (10%) e blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) (B) e gelatina, triacetina (10%) e blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) e cera de cana-de-açúcar (5%) (C).....	157
Figura 51. Termograma obtido por DSC dos filmes (sem ajuste de pH=5,5) de gelatina, triacetina (10%) (A), gelatina, triacetina (10%) e blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) (B) e gelatina, triacetina (10%) e blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) e cera de cana-de-açúcar (5%) (C).....	157
Figura 52. Termograma obtido por DSC dos filmes (com ajuste de pH=8,5) de gelatina, triacetina (10%) (A), gelatina, triacetina (10%) e blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) (B) e gelatina, triacetina (10%) e blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) e cera de carnaúba (5%) (C).	158
Figura 53. Termograma obtido por DSC dos filmes (sem ajuste de pH=5,5) de gelatina, triacetina (10%) e blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) e cera de cana-de-açúcar (5%) sem o surfactante (A) e com surfactante (160% da mistura de surfactante – 75% de Tween/25% de SDS) (B).	159
Figura 54. Termograma obtido por DSC dos filmes (com ajuste de pH=8,5) de gelatina, triacetina (10%) e blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) e cera de cana-de-açúcar (5%) sem o surfactante (A) e com surfactante (160% da mistura de surfactante – 75% de Tween/25% de SDS) (B).	160
Figura 55. Termograma obtido por DSC dos filmes (com ajuste de pH=8,5) de gelatina, triacetina (10%) e blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) e cera de	

carnaúba (5%) sem o surfactante (A) e com surfactante (80% da mistura de surfactante – 75% de SDS /25% de Tween) (B).	160
Figura 56. Cromatograma da cera de cana-de-açúcar purificada	182
Figura 57. Cromatograma da cera de cana-de-açúcar despigmentada	182

Índice de Tabelas

Tabela 1. Corantes com fluorescência são utilizados na MCVL.	21
Tabela 2. Umidade relativa das soluções salinas saturadas à 25°C.....	48
Tabela 3. Propriedades mecânicas e de permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina e triacetina (25°C).....	52
Tabela 4. Condições de preparo da solução filmogênica e da combinação e concentração dos surfactantes utilizados.....	57
Tabela 5. Aspecto e rendimento da cera de cana-de-açúcar após o processo de despigmentação.....	59
Tabela 6. Caracterização físico-química da cera de cana-de-açúcar e de carnaúba	61
Tabela 7. Composição de álcoois graxos de ceras purificadas e despigmentadas de cana-de-açúcar e cera de carnaúba.....	62
Tabela 8. Matéria-seca, volume da solução filmogênica disperso no suporte e espessura obtida para diferentes formulações estudadas (sem ajuste de pH):	64
Tabela 9. Matéria-seca, volume da solução filmogênica disperso no suporte e espessura obtida para diferentes formulações estudadas (com ajuste de pH):	65
Tabela 10. Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina (10%) (sem ajuste do pH, pH=5,5), triacetina (10%), blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) (20%) e cera de cana-de-açúcar (0%, 2,5; 5; 7,5; 10%).....	67
Tabela 11. Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina (10%) (com ajuste do pH, pH=8,5), triacetina (10%), blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) (20%) e cera de cana-de-açúcar ou de carnaúba (0%, 2,5; 5; 7,5; 10%).	70
Tabela 12. Efeito da adição de surfactante na permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina (10%) (sem ajuste de pH, pH=5,5), triacetina (10%), blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) (20%) e cera de cana-de-açúcar (5%).	75

Tabela 13. Efeito da adição de surfactante na permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina (10%) (com ajuste de pH, pH=8,5), triacetina (10%), blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) (20%) e cera de cana-de-açúcar (5%).	75
Tabela 14. O efeito da adição de surfactante na permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina (10%) (com ajuste de pH=8,5), triacetina (10%), blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) (20%) e cera de carnaúba (5%).	77
Tabela 15. Efeito da adição dos surfactantes (3:1 Tween 80/ SDS, na concentração de 160% em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (sem ajuste de pH=5,5); adicionados triacetina; blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmítico); triacetina e blenda; triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (5%) na permeabilidade de vapor de água (PVA).	79
Tabela 16. Efeito da adição dos surfactantes (3:1 Tween 80/ SDS, na concentração de 120% em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (sem ajuste de pH=5,5); adicionados triacetina; blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmítico); triacetina e blenda; triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (5%) na permeabilidade de vapor de água (PVA).	80
Tabela 17. Efeito da adição dos surfactantes (3:1 Tween 80/ SDS, na concentração de 160% em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (com ajuste de pH=8,5); adicionados triacetina; blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmítico); triacetina e blenda; triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (5%).	81
Tabela 18. Efeito da adição dos surfactantes (3:1 Tween 80/ SDS, na concentração de 120% em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (com ajuste de pH=8,5); adicionados triacetina; blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmítico); triacetina e blenda; triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (5%) na permeabilidade de vapor de água (PVA).	82
Tabela 19. Efeito da adição dos surfactantes (60% de Tween 80 em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (com ajuste de pH=8,5); adicionados triacetina; blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmítico); triacetina	

e blenda; triacetina, blenda e cera de carnaúba (5%) na permeabilidade de vapor de água (PVA).....	83
Tabela 20. Resistência mecânica dos filmes de filmes de gelatina (10%) (sem ajuste de pH, pH=5,5); triacetina (10%), blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico) (20%) e cera de cana-de-açúcar (0; 2,5; 5; 7,5; 10%).	85
Tabela 21. Resistência mecânica dos filmes de filmes de gelatina (10%) (com ajuste de pH, pH=8,5); triacetina (10%), blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico) (20%) e cera de cana-de-açúcar (0; 2,5; 5; 7,5; 10%).	86
Tabela 22. Efeito da adição de surfactante nas propriedades mecânicas (tensão na ruptura e alongação) dos filmes de gelatina (10%) (sem ajuste de pH=5,5), triacetina (10%), blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) (20%) e cera de cana-de-açúcar (5%).	95
Tabela 23. Efeito da adição de surfactante nas propriedades mecânicas (tensão na ruptura e alongação) dos filmes de gelatina (10%) (com ajuste de pH, pH=8,5), triacetina (10% com relação à massa seca da gelatina), blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) (20%) e cera de cana-de-açúcar (5%).	96
Tabela 24. Efeito da adição de surfactante nas propriedades mecânicas (tensão na ruptura e alongação) dos filmes de gelatina (10%) (com ajuste de pH=8,5), triacetina (10%), blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) (20%) e cera de carnaúba (5%).	99
Tabela 25. Efeito da adição dos surfactantes (3:1 Tween 80/SDS, na concentração de 160% em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (sem ajuste de pH=5,5); adicionados de triacetina; blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); triacetina e blenda; triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (5%) nas propriedades mecânicas.	101
Tabela 26. Efeito da adição dos surfactantes (3:1 Tween 80/SDS, na concentração de 120% em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (sem ajuste de pH=5,5); adicionados de triacetina; blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); triacetina e blenda; triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (5%) nas propriedades mecânicas.	102

Tabela 27. Efeito da adição dos surfactantes (3:1 Tween 80/SDS, na concentração de 160% em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (com ajuste de pH=8,5); adicionados de triacetina; blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); triacetina e blenda; triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (5%) nas propriedades mecânicas.	104
Tabela 28. Efeito da adição dos surfactantes (3:1 Tween 80/SDS, na concentração de 120% em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (com ajuste de pH=8,5); adicionados de triacetina; blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); triacetina e blenda; triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (5%) nas propriedades mecânicas.	105
Tabela 29. Efeito da adição dos surfactantes (60% de Tween 80 em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (com ajuste de pH=8,5); adicionados triacetina; blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); triacetina e blenda; triacetina, blenda e cera de carnaúba (5%) nas propriedades mecânicas.	106
Tabela 30. Solubilidade em água dos filmes compostos de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) e ceras (cana-de-açúcar e carnaúba), filmes preparados em duas condições de pH.	108
Tabela 31. Solubilidade em água dos filmes compostos de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) e ceras (cana-de-açúcar e carnaúba) e surfactantes (diversas combinações de Tween 80/SDS e Tween 80), filmes preparados em duas condições de pH.....	112
Tabela 32. Opacidade dos filmes compostos de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) e ceras (cana-de-açúcar e carnaúba), filmes preparados em duas condições de pH.....	114
Tabela 33. Efeito da adição de surfactante (diversas combinações de Tween 80/SDS) na opacidade dos filmes compostos de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) e ceras (cana-de-açúcar e carnaúba), filmes preparados em duas condições de pH.....	119

Tabela 34. Constantes dos modelos do GAB e do BET de isoterma de adsorção a 25°C, obtidos a partir do ajuste dos dados experimentais para os filmes a base de gelatina.....	150
Tabela 35. Constantes dos modelos do GAB e do BET de isoterma de adsorção a 25°C, obtidos a partir do ajuste dos dados experimentais para os filmes a base de gelatina.....	153
Tabela 36. Temperatura de fusão (T _m) dos filmes compostos de gelatina, obtidos a partir da calorimetria diferencial de varredura (DSC).	156
Tabela 37. Caracterização físico-química da gelatina segundo o laudo cedida pela indústria.....	181

RESUMO

Várias pesquisas nestas últimas décadas surgiram sobre os filmes biodegradáveis e/ou comestíveis devido a suas características para reduzir a poluição ambiental e melhorar as propriedades organolépticas, funcionais e nutricionais dos alimentos. A gelatina uma proteína de origem animal é muito usada na produção nos biofilmes como matriz formadora por apresentar excelentes propriedades funcionais além de ser produzida em larga escala e de baixo custo no Brasil. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar filmes de gelatina contendo triacetina como plastificante, blenda de ácidos graxos (palmítico e esteárico), cera de carnaúba e cana-de-açúcar utilizando-se Tween 80 e Dodecil sulfato de sódio (SDS) como surfactantes e também o ajuste de pH (8,5) da solução filmogênica na tentativa de melhorar a introdução dos lipídios na matriz filmogênica protéica. Estes filmes foram caracterizados quanto às propriedades mecânicas (tensão na ruptura - TR e alongação - E), solubilidade, permeabilidade ao vapor de água (PVA), opacidade e quanto sua morfologia superficial (microscopia eletrônica de varredura - MEV). Para os melhores filmes obtidos, foi realizada avaliação calorimétrica utilizando a calorimetria diferencial de varredura (DSC), adsorção de água (isotermas de adsorção), além da análise da microestrutura por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL).

A adição da cera (carnaúba ou cana-de-açúcar) nos filmes a base de gelatina em pH ácido provocou uma diminuição nos valores de PVA e RT e um aumento nos valores de alongação, solubilidade em água, opacidade e de adsorção de água, em relação ao filme simples de gelatina. Ajustando-se o pH destes filmes para 8,5 os valores de PVA, alongação e opacidade aumentam, já os valores de RT, solubilidade em água e a adsorção de água diminuem em relação ao filme simples de gelatina. O ajuste de pH nos filmes emulsionados contendo cera tendem de forma geral a diminuir os valores de PVA, RT, solubilidade e aumentar a alongação, em relação aos filmes sem ajuste de pH.

A adição da mistura de surfactantes nos filmes com pH alcalino tende a diminuir os valores de RT, alongação, opacidade e a adsorção em água e

aumentar a PVA e a solubilidade em água, com relação ao filme sem a adição de surfactante. Em pH natural o surfactante age nos filmes diminuindo a PVA, RT, opacidade e aumenta a elongação, solubilidade em água e a adsorção de água, em relação aos filmes sem a adição de surfactante. Os resultados microestruturais (MEV e MCVL) indicaram que o ajuste de pH e a adição da mistura de surfactante nos filmes emulsionados promoveram boa distribuição e diminuição do tamanho dos glóbulos de lipídios, enquanto a adição da cera nos filmes causou um aumento na irregularidade da morfologia. Com relação à análise térmica (DSC) a adição da cera, o ajuste de pH e a adição de surfactante nos filmes emulsionados promoveram aumento no número de picos de fusão (2 a 3 picos), exceto para os filmes contendo a mistura de surfactante 160S (3:1 Tween 80/SDS, na concentração de 160g/g de gelatina) em pH alcalino apresentando apenas um pico de fusão e sugerindo maior homogeneidade na estrutura do filme.

Palavras-Chaves: Biofilmes, Gelatina, Cera de cana-de-açúcar, Cera de Carnaúba, Surfactantes.

ABSTRACT

Innumerous researches on the production of biofilms have been developed lately considering the possibility of reduction in the amount of non biodegradable waste compounds and also because of the opportunity to improve organoleptic, functional and nutrition properties of foods when associated with biofilms. Gelatin is an animal protein and largely used to produce filmogenic materials and also it is produced in large amount in Brazil with a low cost. The goal of this work was to develop and to characterize the composite films produced with gelatin, triacetin as a plasticizer, a blend of fatty acids (palmitic and stearic), carnauba wax or sugar cane wax and surfactants, including Tween 80 and sodium lauryl sulphate (SDS). Also the effect of the pH was studied. Thus films characterization included: mechanical properties (tensile strength – TR and Elongation – E), water solubility, water vapour permeability (PVA), opacity and morphology of the surface (scanning electric microscopy – MEV). After the first screening, the best films were evaluated using differential calorimetry (DSC), adsorption curves, and microstructure using laser scanning confocal microscopy (MCVL).

The addition of waxes (carnauba and sugar cane waxes) considering the natural pH of the filmogenic solution, decreased the PVA and RT and increased the E, water solubility, opacity and water adsorption compared to gelatin film. When the pH was increased to 8,5, PVA, E and opacity increased and RT, water solubility and water adsorption decreased compared to gelatin film. In general, the pH adjustment for films containing waxes decreased the PVA, RT and water solubility and increased elongation compared to films without pH adjustment.

The addition of surfactants on the filmogenic solutions (pH=8,5) seems decrease RT, elongation, opacity and water adsorption and to increase PVA and water solubility compared to the same formulation without surfactants. At natural pH the surfactants decreased the PVA, RT and opacity and increased E, water solubility and water adsorption compared to films without surfactants.

The microstructural evaluation (MEV and MCVL) indicated that the pH adjustment and the inclusion of surfactants improved the lipidic distribution and

decreased the size of emulsion drops inside the filmogenic matrix. On the other hand the addition of waxes to the films, made the films matrix more heterogeneous. Thermal analysis showed that the addition of wax, the pH adjustment and the surfactants addition promoted a higher number of melting point peaks, except when 160S surfactants mixture (3:1 Tween 80/SDS, in the concentration of 160g/g of gelatin) was used which produced more homogeneous films as was showed by DSC.

Key-Words: Biofilms, Gelatin, Sugar cane wax, Carnauba wax, surfactants.

1. INTRODUÇÃO

A maioria dos alimentos processados utiliza inúmeras técnicas de conservação como os processos físicos (pasteurização, esterilização, refrigeração, congelamento, secagem), os processos químicos (uso de aditivos químicos, salga, desidratação osmótica, defumação) e a combinação deles, sendo ainda necessário uma proteção física do alimento através de uma embalagem adequada.

As embalagens apresentam função protetora e facilitadora durante manuseio no processamento, armazenamento e uso pelo consumidor, além de funcionar como veículo de propaganda. Os materiais usados na embalagem de alimentos podem ser divididos em materiais rígidos como vidros, metais e materiais flexíveis como papel, papelão, plásticos, filmes metálicos, cortiça (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

As embalagens de materiais plásticos revolucionaram o conceito de embalagem por oferecer uma grande quantidade de opções de embalagens plásticas, baixo custo, conveniência, formatos, transparência, proteção mecânica e físico-química, por outro lado seu inconveniente é não ser biodegradável e de difícil reciclagem, acarretando sérios problemas ambientais (GONTARD; GUILBERT, 1994).

Devido ao impacto ambiental causado por embalagem de polímeros sintéticos, cresceu nos últimos anos o interesse em desenvolver materiais de embalagem biodegradáveis. Os filmes biodegradáveis e comestíveis são facilmente degradáveis, não-agressivos ao meio ambiente, com o objetivo de melhorar a qualidade dos produtos alimentícios, prolongar a vida de prateleira e proporcionar novos mercados para matérias utilizadas na fabricação desses filmes (KOELSCH, 1994; CHEN, 1995).

Os filmes comestíveis e/ou biodegradáveis são usados com êxito para controlar a migração de vapor d'água; permeabilidade ao oxigênio (O₂) e ao dióxido de carbono (CO₂), limitar a difusão de gorduras e óleos no sistema alimentício. Outra vantagem da aplicação desses filmes é a possibilidade de

introduzir aditivos em sua formulação, tais como, antioxidantes, aromas e agentes antimicrobianos, melhorando com isso a integridade do produto (KESTER; FENNEMA, 1986; DONHOWE; FENNEMA, 1994).

Os biofilmes são produzidos a partir de macromoléculas como proteínas, polissacarídeos ou lipídios, capazes de produzir matrizes contínuas e coesas (GUILBERT; CUQ; GONTARD, 1997). Os filmes a base de gelatina apresentam excelentes propriedades de barreira ao oxigênio, mecânicas e óticas, e pobre barreira ao vapor de água devido seu caráter hidrofílico, podendo adicionar lipídios (ácidos graxos e ceras) para reduzir a difusividade das moléculas de água provendo melhores propriedades de barreira ao vapor de água.

Entre as proteínas a gelatina merece atenção toda especial devido suas propriedades funcionais adequadas para fabricação dos biofilmes, é uma proteína de origem animal obtida do colágeno por hidrólise ácida ou básica e amplamente produzida no Brasil e apresenta baixo custo.

Os filmes emulsionados consistem em uma mistura coloidal heterogênea onde ocorre a mistura de dois líquidos imiscíveis, sendo os lipídios dispersos em forma de partículas na solução protéica, formando uma emulsão (SHERWIN; SMITH; FULCHER, 1998). Os agentes emulsificantes, como os surfactantes, agem na emulsão abaixando a tensão interfacial entre o dispersado (lipídios) e a fase contínua (solução protéica) melhorando sua estabilidade (EVERRET, 1989; ADAMSON, 1990) e as propriedades dos filmes emulsionados.

Neste trabalho foram produzidos filmes de gelatina com pH natural e ajustado (8,5) contendo triacetina como plastificante, ácidos graxos (palmítico e esteárico), cera de carnaúba e cana-de-açúcar utilizando-se Tween 80 e Dodecil sulfato de sódio (SDS) na tentativa de melhorar a introdução dos lipídios na matriz filmogênica protéica. Propriedades mecânicas, de solubilidade e de barreira ao vapor de água foram medidas bem como a opacidade dos filmes. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar a incorporação dos compostos lipídicos. Para os melhores filmes obtidos, avaliação calorimétrica utilizando a calorimetria diferencial de varredura, e o comportamento frente à adsorção de água através da obtenção de curvas isotérmicas de adsorção, além

da análise microscópica investigando a incorporação dos lipídios no interior da matriz filmogênica por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) foi também estudada.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Produzir filmes compostos de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos (ácido palmítico e esteárico), ceras (de cana-de-açúcar ou de carnaúba) e adicionar os surfactantes (Tween 80 e SDS) para melhorar a incorporação dos lipídios na matriz polimérica, com pH natural (5,5) e ajustado (8,5).

1.1.2 Específicos

- Purificação, despigmentação e caracterização físico-química da cera de cana-de-açúcar.
- Elaboração filmes a partir de:
 - Gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos (ácidos palmítico e esteárico) e cera de carnaúba e/ou cana-de-açúcar com e sem ajuste de pH.
 - Gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos (ácidos palmítico e esteárico) e cera de carnaúba e/ou cana-de-açúcar, adicionados de surfactantes (SDS, Tween 80, SDS/Tween), com e sem ajuste de pH.
- Caracterizar os filmes quanto à permeabilidade ao vapor de água, resistência mecânica, solubilidade, opacidade, isotermas de sorção, calorimetria diferencial de varredura (DSC) e características morfológicas (microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biofilmes

Os filmes e coberturas de polímeros naturais podem ser definidos como camadas finas e contínuas de substâncias alimentícias formadas ou depositadas diretamente sobre o alimento, a partir de materiais biodegradáveis e/ou comestíveis dependendo dos constituintes utilizados para sua elaboração e do tipo e da concentração dos componentes empregados (SHIH, 1996). Estes materiais, além de oferecer uma barreira seletiva contra a transmissão de gases, vapores e solutos agem promovendo proteção mecânica. As coberturas são aplicadas diretamente na superfície dos alimentos, enquanto os filmes possuem a capacidade de formar estruturas próprias independentes e depois aplicadas nos produtos como envoltório ou bolsas (GENNADIOS; WELLER, 1990).

Coberturas e filmes comestíveis em geral não substituem as embalagens sintéticas, mas podem ser utilizadas para prolongar a estocagem dos alimentos, agindo como um adjunto para promover aumento da qualidade e estender a vida de prateleira, possibilitando a economia com materiais de embalagem (KESTER; FENNEMA, 1986).

Os filmes e coberturas comestíveis apresentam algumas vantagens comparadas com embalagens de polímeros sintéticos tradicionais, de acordo com GENNADIOS e WELLER (1990):

- 1) Reduzem a poluição ambiental;
- 2) Podem melhorar as propriedades organolépticas dos alimentos incorporando vários componentes (condimentos, corantes, adoçantes) aos mesmos;
- 3) Melhoram as características nutricionais dos alimentos, particularmente os filmes a base de proteínas;
- 4) Podem ser aplicados no interior de produtos heterogêneos;

5) Podem ser usados como transportadores de agentes antimicrobianos ou antioxidantes.

Os biofilmes por atuarem tanto como embalagens quanto como componentes do alimento devem cumprir alguns requisitos específicos para seu uso, tais como: boa qualidade sensorial, propriedades de barreira e mecânicas eficientes, estabilidade bioquímica, físico-química e microbiológica, serem inócuos, não poluentes, de processamento simples e de baixo custo (DEBEAUFORT; QUEZADA-GALLO; VOILLEY, 1995).

Na elaboração dos biofilmes, cada um dos constituintes apresenta uma finalidade específica. As formulações em geral são constituídas de um agente formador de filme (macromoléculas), solvente (água, etanol, etanol/água, entre outros), plastificante (glicerol, sorbitol, triacetina, etc) e agente ajustador de pH (ácido acético, hidróxido de amônia, etc).

2.1.1 Agente formador de filme

As formulações dos filmes e coberturas comestíveis devem incluir pelo menos um componente capaz de formar adequadamente uma matriz coesa e contínua. Vários são os componentes usados na fabricação de filmes comestíveis. Entre esses, estão os filmes a base de carboidratos e seus derivados, amido (JOKAY; NELSON; POWELL, 1967), dextrinas, alginatos (ALLEN et al., 1963) e outras gomas (MARTIN-POLO & VOILLEY, 1990); celulose e seus derivados (PARK et al., 1993; GENNADIOS; WELLER; TESTIN, 1993); a base de proteínas destaca-se o colágeno (GENNADIOS et al., 1994), a gelatina (CARVALHO, 1997; BERTAN, 2003), zeína do milho (GENNADIOS; WELLER; TESTIN, 1993; GENNADIOS; WELLER, 1994), o glúten (GONTARD, 1991; PALMU, 2003) e as proteínas miofibrilares de bovinos (SOUZA, 2001); e a base de lipídios como monoglicerídeos, ácidos graxos, ceras naturais, entre outros (GUILBERT, 1986).

Filmes comestíveis e/ou biodegradáveis a base de polissacarídeos (celulose e derivados, carboidratos e derivados, gomas, entre outros) ou proteínas

(gelatina, zeína, farinha de glúten, entre outras) apresentam excelentes propriedades mecânicas e ópticas e eficiente barreira a óleos e lipídios, porém apresentam baixa barreira ao vapor de água por serem sensíveis à umidade. Ao contrário, os filmes compostos de lipídios (ceras, lipídios e derivados, entre outros) apresentam boas propriedades de barreiras ao vapor d'água, porém sua aplicação é limitada em função de reduzidas características mecânicas e organolépticas (GUILBERT, 1986; GALLO et al., 2000).

Filmes protéicos apresentam propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água limitada, mas, superiores aos formados a partir de polissacarídeos. As proteínas têm uma estrutura específica (derivada de 20 diferentes monômeros – aminoácidos) que conferem uma gama maior de propriedades funcionais e potenciais por formar ligações intra e intermoleculares diferindo nas posições, tipos e energia (CUQ; GONTARD; GUILBERT, 1995), enquanto os polissacarídeos possuem seqüências repetidas de somente um tipo de monômero.

Filmes comestíveis a base de lipídios tem baixa afinidade por água, por isso são mais efetivos como barreira ao vapor de água. Cada substância hidrofóbica possui propriedade físico-química específica, e deste modo os filmes comestíveis a base de lipídios apresentam diferentes propriedades de barreira ao vapor de água, dependendo do potencial eletrostático que está relacionado com os grupos químicos contidos na molécula, comprimento da cadeia alifática e a presença de insaturação (MORILLON et al., 2002).

De acordo com McHUGH (2000), filmes formados somente à base de lipídios promovem uma boa barreira ao vapor de água, mas, para sua obtenção é freqüentemente necessária a utilização de solventes orgânicos ou altas temperaturas. Além disso, apresentam propriedades mecânicas pobres. GONTARD e RING (1996) encontraram problemas na aplicação de filmes lipídicos em alimentos, devido à baixa adesão, características heterogêneas e quebradiças, susceptibilidade à oxidação e propriedades sensoriais não aceitáveis.

A combinação de proteínas ou polissacarídeos com lipídios é vantajosa podendo promover melhores propriedades aos filmes (McHUGH, 1996). As propriedades desejáveis de diferentes materiais podem ser combinadas para

formação de filmes compostos, por exemplo, proteínas e polissacarídeos possuem a capacidade de formação de uma rede coesa e contínua, relacionada com as propriedades mecânicas, mas não são boas barreiras ao vapor de água em virtude da sua natureza hidrofílica. Com isso, sua aplicação em produtos que requerem barreiras à umidade é limitada. Ao contrário, lipídios formam filmes com boa propriedade de barreira ao vapor de água, devido ao caráter hidrofóbico, porém, filmes elaborados apenas com lipídios são muito quebradiços (CALLEGARIN et al., 1997).

Os filmes compostos de hidrocolóides e lipídios podem ser formados por uma dupla camada (bicamada), onde o lipídio é aplicado sobre a camada de filme ou somente por uma única camada homogênea (emulsionados), onde o lipídio é disperso na solução protéica, e são formulados para combinar as vantagens das substâncias lipídicas com as hidrocoloidais, diminuindo as desvantagens que cada uma apresenta separadamente (GREENER, FENNEMA, 1989a, 1989b).

Várias pesquisas de filmes compostos vêm sendo desenvolvidas utilizando ceras de carnaúba e de candelila com caseína (CHICK; HERNANDEZ, 2002), ceras de carnaúba e de sorgo com zeína (WELLER; GENNADIOS; SARAIVA, 1998), cera de abelha com proteína do soro do leite (PEREZ-GAGO; KROCHTA, 2001), ácidos graxos com a gelatina (BERTAN et al; 2005) entre outras.

2.1.2 Agente Plastificante

McHUGH; KROCHTA (1994a) definiram plastificante como uma substância de alto ponto de fusão, que quando adicionada a outro material provoca certas mudanças nas suas propriedades físicas, químicas e mecânicas.

À medida que o filme protéico está se formando e secando a água é eliminada e o número de interações entre as cadeias de proteínas aumenta, resultando em filmes rígidos e pouco flexíveis (AMARANTE; BANKS, 2001), sendo necessário à adição de um plastificante que melhore a flexibilidade do filme. Os plastificantes agem diminuindo as forças intermoleculares de atração e aumentando

a mobilidade das cadeias do biopolímero melhorando a flexibilidade bem como a extensibilidade dos filmes (GENNADIOS; WELLER, 1990). Conseqüentemente, além de influenciar as características mecânicas e térmicas como tensão na ruptura e transição vítrea (BODMEIER; PAERATAKUL, 1997) respectivamente, podem provocar mudanças nas propriedades de adesão, e nas suas propriedades de barreira ao vapor de água e a gases (LIN; CHEN; RUN-CHU, 2000).

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

Polióis (glicerol, sorbitol, derivados de glicerina, entre outros), monossacarídeos (principalmente a frutose), dissacarídeos, lipídios e derivados (ácidos graxos, monoglicerídeos, derivados de éster, entre outros), são exemplos de plastificantes. Existem vários plastificantes sendo utilizados na elaboração de filmes e coberturas comestíveis, entre eles a triacetina (LIN; CHEN; RUN-CHU, 2000), o sorbitol (CARVALHO, 1997; SOBRAL, 1999) e o glicerol (GONTARD et al., 1994). Os efeitos do tipo de plastificante, bem como a escolha de sua concentração, são processos complexos, pois o mesmo interfere diretamente nas características do filme. A habilidade destes plastificantes em mudar as propriedades físicas e de permeabilidade à água do filme dependerá da sua estrutura química (massa molecular, configuração e o número total de grupos hidroxil funcional) e compatibilidade com o polímero (CHAMBI, 2004).

A incorporação de lipídios ou ceras em filmes a base de proteínas ou polissacarídeos pode interferir nas interações entre as cadeias do polímero, promovendo flexibilidade ao filme. O resultado pode ser o efeito plastificante, incluindo a redução da força na ruptura e o aumento da flexibilidade, como observada em filmes a base de proteínas do soro (SHELLHAMMER; KROCHTA, 1997) e em filmes de proteínas do glúten do trigo (GONTARD et al., 1994). TALENS e KROCHTA (2005) observaram que a incorporação da cera de abelha

nos filmes a base de proteínas do soro do leite produziu um efeito plastificante em diversas propriedades.

2.1.3 Solvente e Ajustadores de pH

Os solventes mais utilizados na elaboração de filmes comestíveis são: água, etanol ou a combinação de ambos (KESTER, FENNEMA, 1986). Um aspecto determinante na elaboração de filmes é a solubilidade de proteínas e a capacidade das mesmas de interagir com o solvente utilizado, uma vez que a solubilidade total da proteína é necessária para o processo de formação destes filmes.

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

Por sua vez pode tornar-se necessário um ajuste do pH da solução para que assim uma matriz homogênea possa vir a ser constituída, ou seja, uma maior solubilidade da macromolécula seja atingida. O pH da solução, a força iônica e o tipo de solvente empregados na elaboração das soluções filmogênicas são parâmetros que podem ser modificados para alterar as propriedades mecânicas e a porosidade dos filmes (ARVANITTOYANNIS; NAKAYAMA; AIBA, 1998).

O pH da solução filmogênica é controlado, visando uma maior solubilização, portando o agente ajustador de pH, influencia a solubilidade da proteína. O ponto isoelétrico (pI) da proteína – quando uma molécula apresenta igual número de cargas positivas e negativas – corresponde ao pH de menor solubilidade protéica. Em valores de pH acima ou abaixo do pI, as moléculas de proteínas possuem cargas positivas ou negativas em excesso, que interagem com as moléculas de

água contribuindo para sua solubilização (SGARBIERI, 1996). Dentre os ajustadores de pH utilizados diversos são encontrados na literatura: ácido acético glacial (SARMENTO, 1999), hidróxido de sódio (CARVALHO, 1997) representam alguns exemplos.

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

2.2 Produção dos filmes

As propriedades funcionais dos filmes comestíveis e/ou biodegradáveis são resultantes das características das macromoléculas utilizadas, das interações entre os constituintes envolvidos na formulação (macromolécula, solvente, plastificante e outros aditivos), dos parâmetros de fabricação (temperatura, tipo de solvente, pH, entre outras), do processo de dispersão da solução filmogênica (pulverização, espalhamento, etc.) e das condições de secagem (GUILBERT et al., 1996).

Os filmes compostos podem ser produzidos utilizando dois métodos (GALLO et al., 2000):

- Bicamada: onde a proteína é dispersa em um solvente (água e/ou etanol); aquecida e espalhada sobre um suporte plano para a evaporação do solvente, o lipídio é aplicado sobre a camada protéica, formando duas camadas;
- Emulsionado: os glóbulos de lipídios são incorporados na solução protéica dissolvida em um solvente, formando uma emulsão onde esta é aquecida e espalhada sobre um suporte plano para a evaporação do solvente.

2.3 Filmes Emulsionados

Filmes emulsionados são caracterizados pela presença de lipídios na matriz contínua e são obtidos através de uma homogeneização do lipídio na solução protéica, formando uma emulsão (SHERWIN; SMITH; FULCHER, 1998). Os lipídios são utilizados devido ao seu caráter hidrofóbico e às suas propriedades físico-químicas. Assim, a estrutura química, grau de saturação, estado físico (sólido ou líquido), tamanho da cadeia e dimensão dos cristais, determinam o grau de eficiência na interação da partícula lipídica com os outros componentes do filme, como proteínas, e polissacarídeos (GALLO et al., 2000; McHUGH, 2000; CALLEGARIN et al., 1997; GONTARD et al., 1994).

A natureza química dos lipídios modifica as propriedades dos biofilmes, como o comprimento da cadeia carbônica, a polaridade afeta a incorporação dos componentes hidrofóbicos na solução filmogênica, de modo que, quanto maior o número de carbonos na estrutura lipídica, mais difícil será a incorporação dos compostos lipídicos na solução protéica (MORILLON et al., 2002). Estes autores investigaram o efeito da adição de ácidos graxos com tamanhos de cadeias diferentes nos filmes a base de metilcelulose, onde os filmes emulsionados contendo ácido araquídico (22C) possuem maior permeabilidade ao vapor d'água que os filmes contendo de ácidos palmítico (16C) ou esteárico (18C). Este efeito da PVA pode ser explicado pelo fato de que a cadeia longa do lipídio induz a formação de uma estrutura mais heterogênea na rede polimérica induzindo a maior passagem do vapor de água através do filme (MORILLON et al., 2002).

Ácidos graxos insaturados são menos eficientes no controle de migração de umidade, por serem mais polares que os lipídios saturados. HAGENMAIER e BAKER (1997) observaram que os filmes contendo ácidos esteárico (C18: 0) e palmítico (C16:0) tem melhor desempenho para reduzir a dessecação de laranjas que as camadas compostas de ácido oléico (C18:1).

As ceras entre as substâncias lipídicas são mais eficientes na redução da permeabilidade ao vapor d'água, por causa de sua alta hidrofobicidade devido à presença de misturas complexas de ácidos graxos de cadeias longas (>C18),

hidrocarbonetos, álcoois graxos, cetonas, ésteres, triterpenos, esteróis e flavonoides (MORRILON et al., 2002). No entanto, apresentam problemas de aplicação (controle da homogeneidade, superfície oleosa) e problemas sensoriais (rancificação, sabor).

A concentração da substância hidrofóbica afeta sua incorporação aos componentes hidrofílicos, à adição de componentes lipídicos em concentrações superiores (cerca de 20%) levou ao aumento da transferência de vapor de água em filmes de glúten de trigo. Segundo GONTARD et al. (1994) a distribuição dos lipídios na matriz estrutural pode ter sido prejudicada, formando-se zonas com maior concentração do componente apolar, que por sua vez podem ter proporcionado o aparecimento de rachaduras e canais preferenciais, através dos quais o vapor de água difundiu-se na estrutura dos filmes.

As forças intermoleculares de repulsão entre as substâncias hidrofóbicas e hidrofílicas nos filmes emulsionados, dificultam a inclusão dos glóbulos de lipídios na estrutura filmogênica, apresentando heterogeneidade na distribuição e no tamanho dos componentes hidrofóbicos. Devido a esta dificuldade os sistemas emulsionados são geralmente instáveis e a adição de agentes emulsificantes ou surfactantes são freqüentemente necessários para melhorar esta estabilidade (EVERENT, 1989; ADAMSOM, 1990).

Os biofilmes emulsionados, elaborados a partir de proteínas ou polissacarídeos e um lipídio, suas propriedades mecânicas e de barreira são afetados por vários fatores, como à velocidade de agitação, temperatura, possibilidade de formação de espuma na etapa de preparo da emulsão, causando alterações no diâmetro, na homogeneidade e na distribuição e inclusão dos glóbulos de lipídios na matriz protéica (GALLO et al., 2000).

Várias pesquisas vêm sendo realizadas com filmes emulsionados, pelos autores GALLO et al. (2000); McHUGH (2000); CALLEGARIN et al. (1997); GONTARD et al. (1994); MARTIN-POLO; MAUGUIN; VOILLEY (1992); TALENS; KROCHTA (2005); YOSHIDA; ANTUNES (2004); BERTAN et al. (2005), entre outros.

2.4 Características dos Filmes

Diversas características físicas de filmes comestíveis estão envolvidas no parâmetro de qualidade, como a espessura, homogeneidade, sabor, aroma, cor e opacidade.

2.4.1 Espessura

A espessura do filme é definida segundo as necessidades de utilização como embalagem, considerando-se a natureza, o volume e peso do alimento a ser embalado e as condições de armazenamento. O controle da espessura é importante para sua uniformidade, repetitividade das medidas de suas propriedades funcionais e validade das comparações entre as propriedades dos biofilmes (GENNADIOS; WELLER; TESTIN, 1993). Uma não uniformidade na espessura do filme produzido pode acarretar problemas mecânicos e de conservação. A espessura deve ser fixada de acordo com sua utilização final e também o tipo de alimento a ser embalado (SARMENTO, 1999).

CUQ et al. (1996) observaram um aumento linear da resistência mecânica dos biofilmes com o aumento da espessura. Segundo PARK e CHINNAN (1995), a permeabilidade ao vapor de água, ao oxigênio e ao gás carbônico aumentava conforme a espessura dos filmes diminuía.

2.4.2 Homogeneidade/ Aparência

A homogeneidade está relacionada com a aparência do filme e pode ser avaliada por observações visuais e tácteis. Após o processo de secagem os biofilmes devem apresentar uma superfície homogênea e contínua, com ausência de partículas insolúveis, rupturas, poros abertos e zonas de opacidade ou de cores diferenciadas (CARVALHO, 1997).

2.4.3 Sabor e Aroma

Em certos casos pode haver interesse tecnológico em adicionar componentes que promovam sabor e/ou aroma nos biofilmes que são aplicados em alimentos. Filmes a base de hidrocolóides apresentam geralmente características sensoriais mais neutras que os formados de lipídios ou derivados, os quais podem apresentar sabor residual (GONTARD; GUILBERT, 1996), podendo alterar as características originais de um produto alimentício.

2.4.4 Cor e Opacidade

O aspecto visual dos filmes deve apresentar opacidade e coloração atrativas, e não deve sofrer alteração de cor com o tempo de armazenamento, para não prejudicar a aceitação do produto acondicionado. A transparência dos filmes e coberturas comestíveis pode ser avaliada pela opacidade que influencia o potencial de aplicação dos biofilmes, uma vez que esta relacionada com a aceitabilidade. O uso de material lipídicos, como cera de carnaúba ou cera de abelha deve ser limitado (GONTARD et al., 1994), pois sua adição muda a aparência dos filmes de hidrocolóides, que se tornam mais opacos (KAMPER; FENNEMA, 1984). GALLO et al. (2000), observaram que filmes emulsionados de metilcelulose com cera de parafina eram cinco vezes menos transparentes que o mesmo filme sem a adição do lipídio.

2.5 Outras propriedades dos biofilmes

As propriedades de barreira são um aspecto de grande importância para os filmes e cobertura comestíveis, que podem atuar como barreira ao vapor de água e aos gases, solutos, óleos, gorduras e aromas. Outro aspecto a ser considerado, o teor de umidade, é um fator crítico e essa propriedade está vinculada à

manutenção da aparência, controle microbiano e de textura e consistência do produto. O conhecimento de todas essas propriedades funcionais são importantes para determinar a possível aplicação dos filmes comestíveis e biodegradáveis como materiais de embalagem.

2.5.1 Propriedades de barreira

As propriedades de barreira dos biofilmes dependem principalmente do tipo de produto alimentício que será coberto ou embalado (DEBEAUFORT; QUEZADA-GALLO; VOILLEY, 1998). A migração de vapor de água é um dos principais fatores de alteração da qualidade sensorial e da estabilidade da estocagem (GONTARD; GUILBERT, 1994). A permeabilidade dos filmes é a medida obtida através da passagem de um permeante de um lado do filme para outro quando ambos são expostos a diferentes concentrações de permeante em um determinado tempo, sendo importante estabelecer a temperatura, umidade relativa, espessura e diferença de pressão parcial. O ganho de peso de uma célula utilizada para a determinação da permeabilidade ao vapor de água é registrado a partir da passagem de vapor de água através do filme, onde a umidade relativa é maior para aquele onde a umidade é menor.

A permeabilidade de gases e vapores em filmes comestíveis pode ocorrer por dois mecanismos: difusão capilar e difusão molecular. A difusão capilar é dominante em materiais porosos ou com alguma imperfeição. A difusão molecular envolve a solubilidade do gás permeante no filme, difusão através do filme e dessorção do outro lado do filme. O processo de difusão em sistema polímero/solvente depende do tamanho, natureza química, configuração e polaridade da molécula penetrante. Os fatores que afetam os movimentos das cadeias de polímeros incluem forças de atração entre cadeias como pontes de hidrogênio e interações tipo Van der Waals, grau de interação molecular e taxa de cristalização (KESTER; FENNEMA, 1986).

Filmes protéicos apresentam, em geral, barreira ao vapor de água reduzida (GENNADIOS; WELLER, 1994). Essa característica pode ser melhorada com a adição de substâncias hidrofóbicas (ácidos graxos, ceras, entre outras) na solução filmogênica. Vários estudos verificaram a diminuição da permeabilidade ao vapor de água com a adição de lipídios em filmes protéicos de soro de leite (SHELLHAMMER; KROCHTA, 1997), de caseinato (AVENA-BUSTILLOS; KROCHTA, 1993), de glúten (GONTARD et al., 1995) e de zeína (LAI; PADUA; WEI, 1997).

2.5.2 Propriedades Mecânicas

Tensão na ruptura e alongação são propriedades mecânicas apresentadas por um biofilme. A tensão na ruptura é a máxima tensão suportada pelo filme até o momento de sua ruptura. A alongação é a medida de maleabilidade do filme e pode ser considerada como uma característica que define a habilidade do filme em deformar antes de ocorrer à ruptura.

As propriedades mecânicas dos filmes ou coberturas dependem da natureza do material filmogênico utilizado, bem como da coesão estrutural deste. Em biofilmes a base de proteína, o grau de coesão dependerá da aptidão da proteína para formarem fortes e/ou numerosas ligações a nível molecular, das interações entre as proteínas e os demais componentes (solvente, plastificantes, lipídeos e outros aditivos dispersos no meio da matriz); do processo de obtenção e do processo de eliminação do solvente (secagem) (CHAMBI, 2004).

Filmes comestíveis preparados à base de hidrocolóides possuem elevada resistência, enquanto os filmes de lipídios caracterizam-se por apresentarem baixa resistência mecânica (KESTER; FENNEMA, 1986). Alguns lipídios, como acetoglicerídios, ácidos graxos, monoglicerídeos são utilizados para aumentar a flexibilidade dos filmes poliméricos, pois provocam uma diminuição das forças moleculares entre as cadeias poliméricas adjacentes. A desvantagem é que a

adição de material hidrofóbico aos filmes aumenta sua permeabilidade a gases (CALLEGARIN et al., 1997).

2.5.3 Solubilidade em água

Segundo GONTARD, GUILBERT e CUQ (1992), a solubilidade em água é uma importante propriedade dos filmes comestíveis, tanto nas suas aplicações, como na proteção dos alimentos onde a atividade de água é alta, ou ainda quando o filme entra em contato com a água durante o processamento do alimento embalado. A solubilidade, além disso, também influencia a propriedade de barreira ao vapor de água dos filmes. Para se obter uma baixa permeabilidade ao vapor de água (dentro de uma grande faixa de umidade relativa), torna-se necessário à utilização de material insolúvel ou pouco solúvel em água.

2.5.4 Isotermas de sorção

A isoterma de sorção tem importante aplicação no cálculo da atividade da água, em misturas de componentes com diferentes atividades de água; no estudo do tipo de embalagem mais adequada mediante a capacidade de absorção de água pelo alimento; permitem, ainda, estimar o grau de desidratação do alimento relacionado com as mudanças na temperatura ambiente durante o armazenamento (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

A atividade de água (A_w) é um parâmetro físico-químico definido como a “pressão de vapor no alimento à temperatura constante dividido pela pressão de vapor da água pura a temperatura constante”. Através da isoterma de sorção pode-se inter-relacionar o conteúdo de água de um alimento (g água/g de massa seca), com a atividade de água a uma temperatura constante (FENNEMA, 1996). A umidade da monocamada estimada pela equação de BET (Brunauer/Emmett/Teller) está relacionada com a atividade de água acima da qual a água atua como um solvente em um sistema, permitindo que ocorram reações

entre as substâncias em solução. Em atividade de água menor que a monocamada BET não existe mais a fase líquida e a água não atua como solvente (SGARBIERI, 1987).

Os biofilmes à base de proteínas sofrem grandes influências das condições ambientais, devido à característica hidrofílica das proteínas que possuem grupos polares os quais podem adsorver água do ambiente e alterar as propriedades de barreira dos filmes. As isotermas de sorção obtidas de dados experimentais resultam em uma estimativa do conteúdo de umidade de equilíbrio, que é necessário para prever as propriedades dos filmes em diferentes ambientes nas diferentes condições a que são submetidos (JANGCUHD; CHINNAN, 1999). Informação sobre interação da água com o filme, ou seja, quanto ele pode ganhar ou perder, pode ser útil na determinação das condições ótimas de estocagem.

2.5.5 Análise Calorimétrica

Temperatura de fusão ou *melting* (T_m) refere-se à temperatura na qual ocorre uma mudança de fase de primeira ordem nos materiais amorfos. Em materiais parcialmente cristalinos, o aquecimento acima da temperatura de transição vítrea (T_g) resulta no surgimento de um pico endotérmico na curva de fluxo de calor, correspondendo à T_m , as mudanças no estado físico são frequentemente observadas analisando-se as mudanças termodinâmicas, que podem ser medidas com técnicas calorimétricas, por exemplo, utilizando - calorimetria diferencial de varredura (GARCIA; MARTINO; ZARITZKY, 2000).

A T_m juntamente com a entalpia (ΔH_m) podem ser determinadas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e estes parâmetros são utilizados em biofilmes para determinar o quanto os componentes do filme interagiram ou não com a matriz filmogênica. Por exemplo, filme simples de gelatina apresenta um único pico endotérmico na faixa de 85,7-91,9°C (SOBRAL, 2000), já os filmes compostos de gelatina e ácidos graxos (ácidos palmítico e/ou esteárico) resultaram no aparecimento de mais um pico de fusão, sugerindo que as

substâncias hidrofóbicas não estavam incorporadas na matriz da gelatina BERTAN (2003).

2.5.6 Microscopia

A caracterização microscópica dos filmes é importante quando uma melhor compreensão do comportamento do filme é desejada. A visualização a partir da microscopia eletrônica de varredura permite identificação da incorporação dos materiais formando uma estrutura homogênea ou ainda a separação dos mesmos originando uma estrutura heterogênea. YANG e PAULSON (2000a) verificaram um aumento da irregularidade da superfície dos filmes de gelatina com a adição da blenda de ácidos esteárico e palmítico.

A microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) é uma microscopia digital de alta resolução não destrutiva, associada ao emprego de compostos químicos denominados fluoróforos (indicadores de fluorescência). Com a combinação dos princípios de fluorescência e da microscopia, podem-se obter imagens em duas e três dimensões. A fluorescência desses compostos resulta de um processo que apresenta três estágios, segundo SMAILLI (2001):

- Excitação: ocorre quando fótons de energia $h\nu_{ex}$, fornecidos por fonte de energia (feixe laser), são absorvidos por elétrons do fluoróforo. A absorção dos fótons faz com que os elétrons saltem para outro nível energético, atingindo assim um “estado excitado” (S_1);
- ‘Tempo de vida’ finito (entre 1 e 10 milionésimos de segundo): onde o fluoróforo passa por uma mudança em sua conformação e pode interagir com uma série de moléculas presentes no mesmo meio;
- Estado excitado (S_1): onde a energia é parcialmente dissipada, e o fluoróforo alcança o estado de emissão (S_1);
- Estado de emissão: quando os elétrons emitem, em forma de luz (fluorescência), o excesso de energia que ainda contém. Na

emissão, cada elétron (do fluoróforo) no estado S_1 emite um fóton de energia $h\nu_{em}$, retornando ao estado de repouso inicial (S_0).

Existem diversos corantes com fluorescência comercializados, o que permite investigar estruturas específicas, como é o caso do isotiocianato de fluoresceína (FITC) e do Nilo RED, mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Corantes com fluorescência são utilizados na MCVL.

Corante	Aplicação	Comprimento de onda (nm)	Coloração
FITIC (1)	Reage com aminas primárias neutras (proteínas)	485/530	Verde
Nile Red (2)	Identificação de grupos hidrofóbicos (depende fortemente da polaridade do meio)	487/489 e 530/550	Vermelho a azul

(1) LAMPRECHT; SCHAFFER; LEHR, 2000; (2) BERTSCH; MAYBURD; KASSNER, 2003.

2.6 Gelatina

Dentre os hidrocolóides utilizados atualmente, a gelatina é um dos mais populares e amplamente utilizado na indústria de alimentos (confeitos, produtos cárneos, laticínios, etc), farmacêutica (cápsulas) e fotográfica (POPPE, 1997). A gelatina é produzida em larga escala á baixo custo, justificando assim o grande interesse e exploração de suas propriedades funcionais.

A gelatina é uma proteína de origem animal, contendo a maioria dos aminoácidos essenciais, com exceção do triptofano. È derivada do colágeno componente estrutural de tecidos conectivos brancos e está presente em órgãos e tecidos. Constitui quase 30% de proteínas totais em vertebrados e invertebrados e, ao microscópio aparece como fibras brancas opacas, circundadas por outras proteínas e mucopolissacarídeos (POPPE, 1997).

O pré-tratamento na obtenção da gelatina, tem como finalidade eliminar gorduras, mucopolissacarídeos e outros compostos orgânicos (POPPE, 1997). A obtenção da gelatina é realizada a partir da hidrólise ácida ou básica do colágeno proveniente de ossos, peles bovina ou suína e de tecidos conectivos. A produção comercial da gelatina pode ser dividida em duas etapas. Primeiramente, o colágeno é desnaturado a 40°C e posteriormente submetido a hidrólise (ácida ou básica) para quebra das ligações covalentes. Mediante o tipo de pré-tratamento utilizado para retirar as impurezas e iniciar o processo de hidrólise, a gelatina pode ser classificada em dois grupos (GENNADIOS et al., 1994):

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

Além de serem classificadas pelo seu ponto isoelétrico (pI), as gelatinas são avaliadas pela sua viscosidade, granulometria e poder de geleificação ou *Bloom*; podendo ser encontrada comercialmente entre 50 a 300 *Bloom* (PB LEINER, 2004).

A gelatina é solúvel em água quente (temperatura acima de 30°C); quando aquecida a temperaturas acima do ponto de fusão, a gelatina inchada dissolve e quando atinge a temperatura ambiente forma géis (termo-reversíveis), podendo absorver até dez vezes seu peso em água. A gelatina pode ser dissolvida indiretamente, quando suas partículas ficam em repouso até formar uma massa homogênea, sendo então levada ao aquecimento (50-60°C) até uma dissolução completa. A dissolução direta é obtida com a adição de água quente (60-80°C) sob agitação. O método direto, devido à agitação, pode fazer com que a gelatina espume (JOHNSTON-BANKS, 1990), o que se torna inconveniente na elaboração de filmes comestíveis.

A nível molecular, a formação de géis envolve ligações iônicas entre grupos amino e carboxil dos aminoácidos com a ajuda de pontes de hidrogênio (KESTER;

FENNEMA, 1986). A conversão do estado sol para o estado gel é reversível e pode ser repetido, o que torna vantajosa à utilização da mesma em várias aplicações comestíveis (POPPE, 1997).

Após a hidrólise (ácida ou alcalina), a gelatina possui várias espécies de cadeias peptídicas, em geral a degradação não é completamente uniforme assim as gelatinas não são homogêneas no que se refere à massa molecular (JOHNSTON-BANKS, 1990). A massa molecular da gelatina pode variar de 300 a 200.000 Pa, depende do tipo de matéria-prima e das condições de processo utilizadas (GENNADIOS et al., 1994).

Vários trabalhos publicados relatam propriedades de filmes elaborados à base de gelatina. SOBRAL (1999) estudou as propriedades funcionais da gelatina em função da espessura; CARVALHO (1997, 2002) verificou as mudanças provocadas nos filmes modificados enzimática e quimicamente em relação às propriedades funcionais dos mesmos. FAKHOURI (2002) e BERTAN (2003) estudaram a adição de substâncias hidrofóbicas nos filmes de gelatina e as mudanças provocadas em suas características funcionais.

2.7 Ceras

O termo cera é normalmente usado como referencia a uma mistura de compostos apolares de cadeia longa, encontrados na superfície de plantas e animais. Numa definição estrita, uma cera é um éster de ácido graxo de cadeia longa com um álcool graxo de cadeia longa. As ceras podem constituir uma ampla gama de diferentes classes de lipídios, incluindo ésteres de ceras, esteróis e ésteres de esteróis, álcoois e ácidos graxos livres, hidrocarbonetos, cetonas, aldeídos, bem como lipídios mais simples como os triglicerídeos (LI; PARISH, 1998).

A classificação das ceras é realizada de acordo com sua origem podendo ser natural, animal ou mineral. Alguns exemplos de ceras naturais são de abelha,

de lanolina, ceras minerais são ceras de petróleo e ceras vegetais incluem a candelila e a carnaúba, entre outras (LI; PARISH, 1998).

As ceras são utilizadas na elaboração de emulsões e biofilmes para retardar a deterioração de algumas frutas cítricas, pois as ceras naturais são componentes adequados para emulsões alimentícias por serem inertes e por sua dispersibilidade. Emulsões tipo óleo em água são utilizadas devido ao alto peso específico da cera, como no caso da candelila (HERNANDEZ; BAKER, 1991).

Entre as ceras, a de carnaúba é a cera mais utilizada, sendo uma cera vegetal produzida no Brasil, retirada da palmeira *Copernica cerifera*. A cera de carnaúba se apresenta como um sólido duro, com cheiro próprio, utilizado em cosméticos e por indústrias alimentícias, em coberturas de papéis e fabricação de tintas. A cera de carnaúba é solúvel em solventes orgânicos polares. Composta de ésteres (84-85%), ácidos livres (3-3,5%), resinas (4-6%), álcool (2-3%), e hidrocarbonetos (1,5-3,0%). Tipicamente a cera de carnaúba apresenta ponto de fusão de 78 a 85°C (LI; PARISH, 1998).

Alguns trabalhos publicados relatam as propriedades de filmes comestíveis à base de cera de carnaúba. WELLER, GENNADIOS e SARAIVA (1998) investigaram as propriedades mecânicas, barreira ao vapor d'água e coloração dos filmes bicamadas de zeína e cera de carnaúba. GONTARD et al. (1994) estudaram o efeito na propriedade mecânica com a adição dos lipídeos (ácido oléico, álcool esteárico, ácido palmítico cera de parafina, cera de abelha e cera de carnaúba) em filmes a base de glúten de trigo.

A cera de cana-de-açúcar representa uma pequena proporção em peso na planta (cerca de 0,12%) (PATURAU, 1989). LARIOS, PEREZ e MARRERO, (1993) realizaram um estudo sobre a distribuição da cera na cana-de-açúcar utilizando três variedades de cana e encontraram um teor de cera maior nas folhas (1,87%) da cana. No entanto, considerando a massa de folhas e colmo por cada 100 kg de cana, o teor de cera no colmo representa 70% de toda a cera contida na cana.

Além da cera, outros lipídios em quantidades variáveis estão presentes no interior do colmo e em outras partes da planta. Quando a cana é moída, uma parte

do material lipídico permanece no bagaço. Porém, cerca de 40% é arrastado como impureza e permanece em suspensão no caldo, concentrando-se na chamada torta (ADAMENAS, 1982, PATURAU, 1989).

A cera de cana, assim como outras ceras vegetais, consiste em uma mistura de ésteres de ceras, ácidos graxos livres, álcool graxo livre e triglicerídios. O principal álcool graxo é o octacosanol, representando mais de 60% dos álcoois graxos totais. Fitosteróis também podem estar presentes em quantidades variáveis, sendo o principal componente o β -sitosterol (PATURAU, 1989).

A cera de cana-de-açúcar é extraída da torta de filtro de cana-de-açúcar podendo ser recuperada juntamente com os lipídios totais através da extração com solvente. A primeira tentativa de se isolar cera de cana-de-açúcar das tortas de filtro foi feita em 1841 por Avequin, em New Orleans. Contudo, a obtenção da cera de tortas de filtro de cana através de extração com solventes diferentes em escala laboratorial é o objetivo de alguns trabalhos recentes disponíveis na literatura científica (VIERIA, 2003; ROZÁRIO, 2006).

Os métodos de refino descritos na literatura para promover uma descoloração da cera de cana-de-açúcar incluem o uso de ácidos fortes (ácido sulfúrico, nítrico e crômico) e destilação sob vácuo alto (AZZAM, 1986; PATURAU, 1989). O uso de ácidos fortes está relacionado a problemas ambientais e, por isso, é cada vez mais evitado pelas indústrias.

A aplicação desses métodos de refino pode apresentar alguns inconvenientes, como, por exemplo, a necessidade da utilização de vários insumos de processo para obtenção de uma cera sem impurezas. O uso de solventes polares na extração transfere compostos polares para a cera bruta, que obrigatoriamente devem ser removidos para que seja obtida uma cera de boa qualidade tecnológica. A necessidade desta e outras etapas de refino promovem aumento no custo do processo.

Normalmente os parâmetros importantes na caracterização das ceras incluem o índice de saponificação, índice de iodo, índice de peróxido e matéria insaponificável.

2.8 Triacetina

A triacetina é um dos plasticizantes mais utilizados na elaboração de biofilmes oferecendo extensibilidade, adesividade e aumentando sua força de ruptura. Este plastificante é da família dos ésteres, nome químico triacetato de gliceril ($C_3H_5(OCOCH_3)_3$). A triacetina apresenta ponto de fusão $3,2^\circ C$, ponto de ebulição de $140^\circ C$, densidade $1,115g/cm^3$, é transparente, incolor, solúvel na maioria dos solventes orgânicos e possui boa estabilidade na presença de luz (LANXESS, 2005).

2.9 Surfactante

2.9.1 Características e definições

Surfactantes ou tensoativos são compostos orgânicos, constituído por moléculas anfifílicas representando a parte polar (“cabeça”) que tem afinidade pela água e apolares (“cauda”) que tem afinidade pelo óleo, com propriedade de atividade superficial, resultado da adsorção destes compostos na superfície de líquidos ou na interface entre dois líquidos imiscíveis. Em meio aquoso, acima de uma determinada concentração, os surfactantes formam micelas e outros agregados, nos quais a porção lipofílica das moléculas ou íons fica orientada para o interior da micela enquanto apenas os grupos polares ficam na parte externa da micela em contato com a água. Forças eletrostáticas concentram compostos hidrofílicos junto à superfície de micelas enquanto compostos lipofílicos podem ser solubilizados em seu interior (MINATTI, 2005).

Um bom exemplo para demonstrar a natureza ambígua dos compostos tensoativos é o dodecil sulfato de sódio (SDS) ilustrado na Figura 1. Este apresenta uma cadeia longa alquílica, praticamente insolúvel em água, ligada covalentemente a um grupo iônico (sulfato de sódio) (MINATTI, 2005).

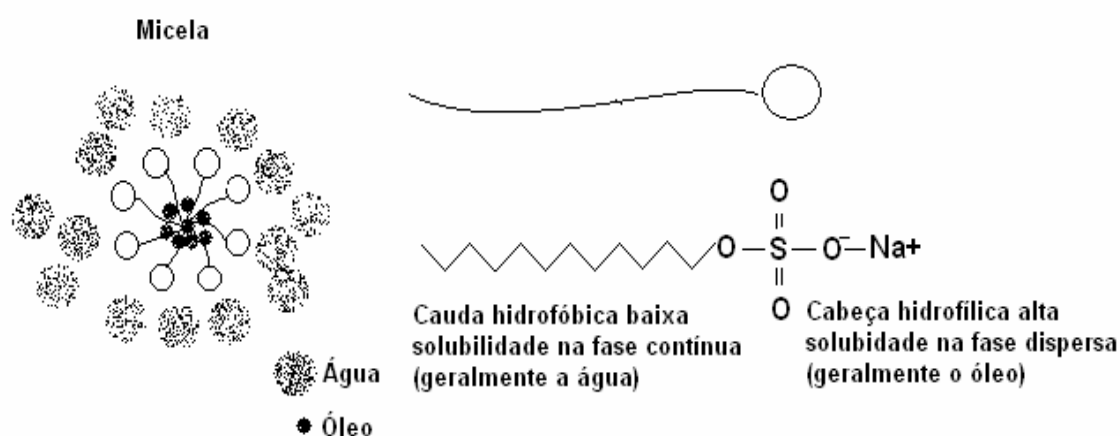


Figura 1: Incorporação de um composto hidrofóbico em uma micela de SDS em um sistema água/ óleo.

A característica do seu grupo de cabeça classifica o surfactante em aniônico, catiônico, zwitteriônico e não-iônico. A aplicação dos surfactantes se estende desde indústrias de detergentes, cosmética, pesticidas, fibras, plásticos, farmacêuticas, tintas, corantes e alimentícias. O papel em comum do surfactante em todas estas aplicações é a de modificar a característica da interface. Os surfactantes podem promover a solubilização e a emulsificação de materiais insolúveis e eles podem reduzir a tensão superficial da solução para facilitar o processamento (GRIFFITHS; CHEUNG, 2002).

2.9.2 Agente emulsificante

Nas emulsões alimentícias os surfactantes auxiliam na sua formação e estabilidade (CHARALAMBOUS; DOXASTAKIS, 1989; DICKINSON, 1992; HASENHUETTL; HALTER, 1997), contudo eles podem alterar as propriedades das emulsões de várias maneiras como pela interação com proteínas ou polissacarídeos, pela formação de micelas com surfactantes ou por modificação da estrutura de cristais de gorduras (DICKINSON; MCCLEMENTS, 1995; BERGENSTAHL, 1997; BOS et al., 1997; DEFFENBAUGH, 1997).

Os surfactantes mais utilizados nas indústrias de alimentos são principalmente os não-iônicos (monoacilgliceróis, éster de sacarose de ácidos graxos), aniônicos (ácidos graxos), ou zwitteriônicos (lecitina). A cauda é um grupamento que consiste de 1 ou mais cadeias hidrocarbônicas, que tem entre 10 e 20 átomos de carbono por cadeia (BERGENSTAHL, 1997; ZIELINSKI, 1997). A cadeia pode ser saturada ou insaturada, linear ou ramificada, alifática e/ou aromática. A maior parte dos surfactantes em alimentos tem 1 ou 2 cadeias lineares alifáticas podendo ser saturada ou insaturada. Cada tipo de surfactante tem sua propriedade funcional que é determinada pela sua estrutura química (MYERS, 1988).

Os surfactantes podem agregar-se espontaneamente em solução para formar uma variedade de estruturas termodinâmicas estáveis conhecidas como associações coloidais (micelas, bicamadas, vesículas e micelas reversas), como mostradas na Figura 2. Estas estruturas são adotadas por minimizar o contato desfavorável entre a área da cauda não polar da molécula de surfactante e a água (HIEMENZ, 1986; EVANS; WENNERSTROM, 1994).

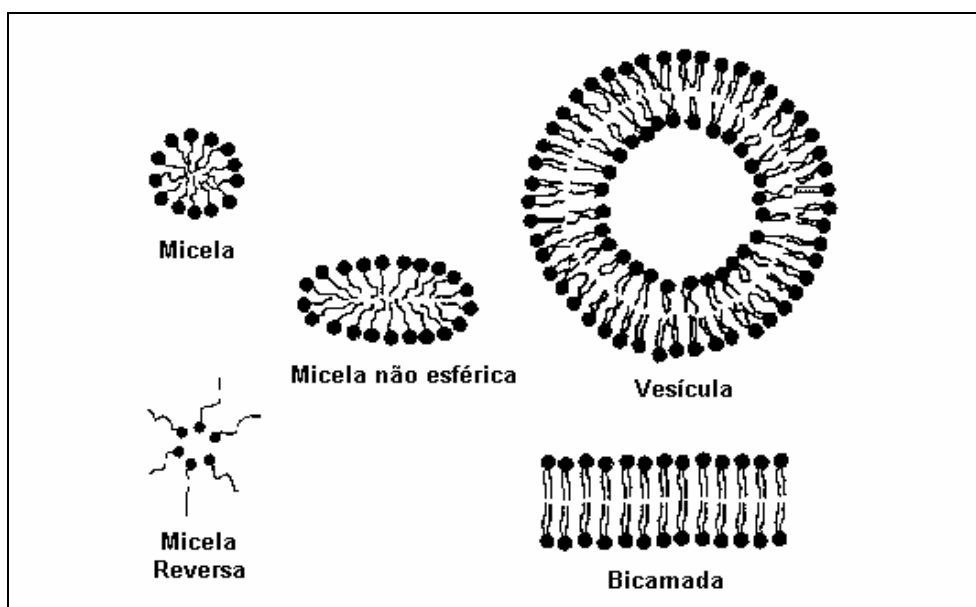


Figura 2. Algumas estruturas típicas formadas devido à associação das moléculas de surfactante (McCLEMENTS, 1999).

O tipo de associação coloidal formada por um surfactante depende principalmente de sua polaridade e da geometria molecular. As associações coloidais são mantidas por interações físicas que são relativamente fracas comparadas com a energia térmica e conseqüentemente eles têm estruturas altamente dinâmicas e flexíveis (ISRAELACHVILI, 1992) Estas estruturas são particularmente sensíveis a mudanças nas condições como a temperatura, pH, força iônica e o tipo de íon (MYERS, 1988; ISRAELACHVILI, 1992).

2.9.3 Concentração Micelar Crítica

Um surfactante forma micelas em solução aquosa quando esta concentração excede o nível crítico conhecido como concentração micelar crítica (CMC) (MYERS, 1988). Nesta concentração o surfactante fica adsorvido completamente na superfície para formar uma camada interfacial monomolecular, em seguida, o surfactante cessa de existir como uma molécula individual na fase contínua da solução e começa a agregar-se em “clusters” (micelas) de várias formas. Abaixo da CMC as moléculas de surfactante são dispersas predominantemente como monômeros, mas uma vez excedida a CMC, algumas moléculas adicionais de surfactante formam micelas, e as concentrações dos monômeros permanecem razoavelmente constantes (HIEMENZ, 1986), como mostrado na Figura 3. Acima da CMC o número de micelas tende, a aumentar e também o tamanho e a forma individual das micelas. Há uma mudança abrupta nas propriedades físico-químicas da solução de surfactante quando a CMC é excedida incluindo a tensão superficial, condutividade elétrica, turbidez e pressão osmótica (ROSEN, 1978; HIEMENZ, 1986). Isto é porque as propriedades das moléculas de surfactante dispersadas como monômero são diferentes das micelas. Por exemplo, monômeros são anfífilicos e tem alta atividade superficial por estarem cobertos com grupos hidrofílicos (cabeça). Conseqüentemente, a tensão superficial da solução diminui com o aumento da concentração de

surfactantes abaixo da CMC, mas permanece razoavelmente constante acima desta concentração.

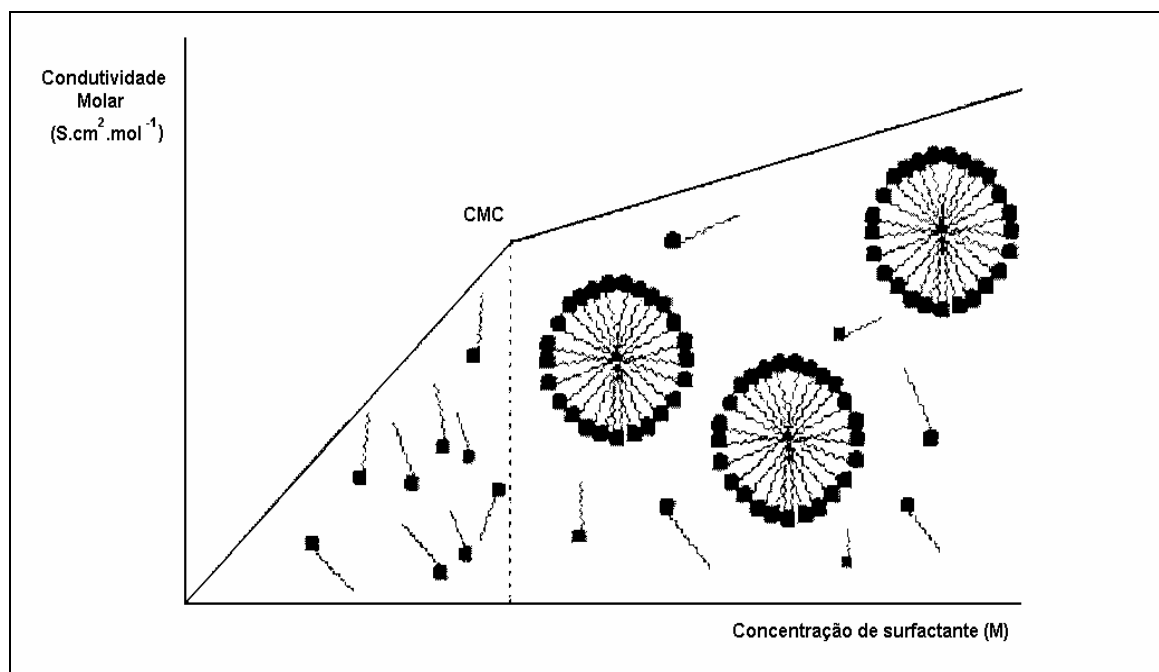


Figura 3. Ilustração de uma titulação condutivimétrica com um surfactante iônico. O ponto de inflexão das retas fornece a cmc (MINATTI, 2005).

2.9.4 Balanço Hidrofílico e Lipofílico

Outro conceito importante em relação aos surfactantes é o HLB (balanço hidrofílico e lipofílico), muito usado para classificar os surfactantes. O HLB é descrito pelo número que fornece a relativa afinidade da molécula de surfactante pelo óleo na fase aquosa (DAVIS, 1994). Cada surfactante tem um determinado número de HLB de acordo com sua estrutura química. Uma molécula com alto número de HLB apresenta um maior número de grupos hidrofílicos em relação ao número de grupos lipofílicos e vice-versa. O número de HLB do surfactante pode ser calculado sabendo-se o número e o tipo dos grupos lipofílicos e hidrofílicos

contidos na molécula. O número de HLB dos surfactantes pode ser calculado pela seguinte equação:

$$\text{HLB} = 7 + \Sigma (\text{n}^\circ \text{ dos grupos hidrofílicos}) - \Sigma (\text{n}^\circ \text{ dos grupos lipofílicos})$$

O número de HLB dos surfactantes fornece uma indicação útil da solubilidade em qualquer fase óleo e/ou água e também pode ser usado para prever o tipo de emulsão que poderia ser formada. Como exemplos:

- HLB entre 3-6: surfactante predominantemente hidrofóbico dissolve preferivelmente em óleo, estabiliza emulsões de água em óleo e forma micelas reversas, na faixa de HLB entre 3-5, os surfactantes formam emulsões de água-óleo com máxima estabilidade;
- HLB entre 8-18: surfactante predominantemente hidrofílico dissolve preferivelmente em água, estabiliza emulsões de óleo em água e forma micelas em água, na faixa de HLB entre 10-12 os surfactantes formam emulsões de óleo-água com máxima estabilidade;
- HLB entre 6-8: o surfactante não apresenta preferência particular pela água ou pelo óleo, formando emulsões instáveis que podem coalescer por causa da baixa tensão superficial;
- HLB < 3 e HLB > 18: os surfactantes não são particularmente ativos na superfície e tendem a se acumular preferencialmente na fase óleo ou na fase aquosa, melhor que na interface óleo-água (DAVIS, 1994).

A maior desvantagem do conceito de HLB é que este não leva em consideração o fato que as propriedades funcionais da molécula de surfactante são alteradas significativamente pelas mudanças de temperatura ou pelas condições da solução (DAVIS, 1994). Como por exemplo, um surfactante pode ser capaz de estabilizar uma emulsão de óleo em água a uma dada temperatura e em outra estabilizar uma emulsão de água em óleo, mesmo que tenha a mesma estrutura química.

O tipo da emulsão é caracterizado pelo tamanho de partícula da emulsão onde: macroemulsões apresentam tamanho de partícula tipicamente acima de 400nm e possuem característica opaca e termodinamicamente instável; microemulsões tem tamanho de partícula abaixo de 100nm com característica transparente e termodinamicamente estável e as miniemulsões podem ser descritas como um sistema com tamanho de partícula e propriedades intermediárias (DAVIS, 1994).

As propriedades funcionais dos filmes comestíveis dependem fortemente da estrutura, tamanho e homogeneidade dos glóbulos de lipídios distribuídos no filme, portanto do tipo de emulsão formada. Entretanto estas propriedades estruturais estão intimamente ligadas à eficiência de emulsificação, natureza química do surfactante (caráter hidrofílico ou hidrofóbico – HLB) e das condições de preparo da emulsão como a temperatura, tempo e o pH (DEBEAUFORT; QUEZADAGALLO; VOILLEY, 1995).

2.9.5 Classificação dos Surfactantes

Os surfactantes podem ser classificados de acordo com o tipo de dissociação de sua molécula em solução em:

- Surfactantes Aniônicos: são aqueles que em solução aquosa se dissociam em um ânion anfifílico e um cátion. Ex. lauril éster sulfato.
- Surfactantes Não-Iônicos: em solução aquosa não forma íons, e a sua parte hidrofílica é formada por grupos polares não-ionizáveis como: álcool, tiol, éter e éster. Ex. Dodecil benzeno sulfonato de sódio.
- Surfactantes Catiônicos: são aqueles que dissociam em um cátion anfifílico e um ânion geralmente do tipo halogenado. Ex. cloreto de dialquildimetilamônio.

Outros surfactantes: são combinações em uma mesma molécula de um grupo com a tendência aniônica de um outro grupo com tendência catiônica

produzindo um surfactante anfótero. Ex. óxido de etileno, óxido de propileno (SALAGER; FERNANDEZ, 2004).

O polioxietilensorbitano monooleato (Figura 4) mais conhecido como *Tween 80*, possui fórmula química $C_{64}H_{124}O_{27}$ com peso molecular 1310g/mol, tem coloração amarelo claro em água e, possui valor do HLB entre 10,0-15,0 e as mesmas propriedades de um detergente tipo polietileno não-iônico (ROCHE, 2004).

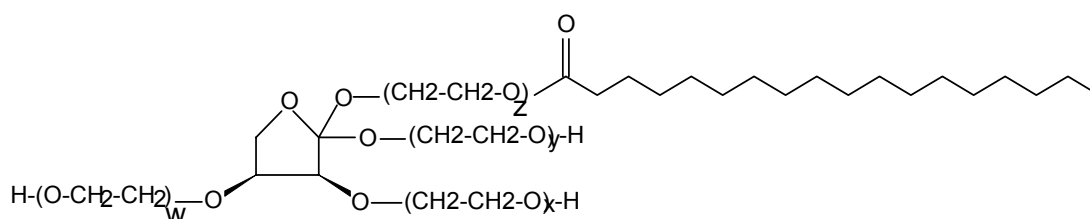


Figura 4. Estrutura química da molécula de Tween 80.

O dodecil sulfato de sódio mais conhecido como *SDS*, com fórmula molecular $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$, estrutura apresentada na Figura 1, se encontra na forma de pequenos cristais brancos ou amarelados com leve odor característico. Solúvel em dez partes de água, parcialmente solúvel em álcool e quase insolúvel em clorofórmio e em éter, com ponto de ebulição em torno de 204-207°C e possui um valor de HLB em torno de 40 (ANVISA, 2004).

Estes compostos vêm sendo usados ao longo dos anos para diferentes finalidades e usos distintos, a saber, banhos de espuma, cremes emolientes, cremes depilatórios, loções para mãos, xampus, dentifrícios, além de produtos saneantes (detergentes domissanitários). Este uso tem sido motivado em razão das suas propriedades detergente, espumógena, emulsificante e solubilizante (ANVISA, 2004).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Matéria-Prima

3.1.1 Gelatina

A gelatina bovina do tipo B utilizada para elaboração dos filmes, foi fornecida pela indústria **LEINER DAVIS GELATIN BRASIL (Cotia – SP)**, a caracterização físico-química da gelatina segundo a informação do fabricante está apresentado no Anexo I.

3.1.2 Cera de Cana-de-Açúcar Despigmentada

A cera de cana-de-açúcar despigmentada foi produzida através de um processo de despigmentação (item 3.2.2), a partir da cera purificada (gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Daniel Barrela-Arellano, Laboratório de Óleos e Gorduras – Dep. de Tecnologia de Alimentos – UNICAMP).

Foram utilizados ácidos esteárico e palmítico (Vetec), cera de carnaúba comercial, triacetina (cedida pela Rhodia), tween 80 (Synth) e dodecil sulfato de sódio-SDS 95% (Synth), eicozanol (Sigma). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico e também a água deionizada foi utilizada quando necessário.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração e Purificação da cera de cana-de-açúcar

A extração e a purificação da cera de cana-de-açúcar foram realizadas de acordo com os métodos originalmente desenvolvidos por ROZÁRIO (2006).

3.2.2 Despigmentação da cera de cana-de-açúcar

Colocou-se 10g de cera purificada de cana-de-açúcar e 100mL da mistura de etanol: acetona (1:9) em um erlenmeyer e agitou-se por 12 horas utilizando um agitador magnético. Transferiu-se a solução do erlenmeyer para tubos de centrifuga e as mesmas foram centrifugadas por 15 minutos na velocidade de 4000 rpm, a porção superior foi descartada. Foram adicionados 80mL da solução etanol: acetona (1:9) em cada tudo contendo a porção sólida inferior, logo após foi agitada em vórtex por 1 minuto para homogeneização e mantidas por 1 hora sob agitação controlada no homogeneizador de tubos. Novamente os tubos foram submetidos à outra centrifugação por 15 minutos na velocidade de 4000 rpm, repetindo-se as mesmas etapas descritas acima. Este processo de lavagem da cera com a mistura de solvente foi repetido por 6 vezes até a cera apresentar coloração clara. Após as lavagens, o precipitado foi transferido do tubo de centrifuga para placas de petri onde foi seco e depois pulverizado em almofariz.

Foram realizados testes preliminares para escolha do solvente (acetona e/ou etanol) que apresentou melhor rendimento e maior extração da coloração esverdeada da cera.

3.2.3 Caracterização físico-química das ceras

3.2.3.1 Teor de Fósforo (colorimétrico)

O teor de fósforo foi determinado de acordo com o método AOCS Ca 12-55, este determina o conteúdo de fósforo ou o equivalente fosfatídeo por incineração da amostra na presença de óxido de zinco, seguida da medida espectrofotométrica do fósforo como um complexo ácido fosfomolibídico azul.

3.2.3.2 Índice de Saponificação

O índice de saponificação foi feito de acordo com o método AOCS Ca 6a-40 (adaptado segundo VIEIRA, 2003). Este índice é definido como a quantidade de álcali necessário para saponificar uma quantidade definida de amostra. É expresso como o número de miligramas de KOH necessários para saponificar 1 grama de amostra.

3.2.3.3 Determinação da Matéria Insaponificável

A matéria insaponificável foi determinada de acordo com o método AOCS Ca 6b-53 (adaptado segundo VIEIRA, 2003), por este método determina-se a quantidade de substâncias frequentemente encontradas dissolvidas em óleos e gorduras que não podem ser saponificadas pelo tratamento caustico usual, mas são solúveis em solventes normais de óleos e gorduras. Incluindo-se neste grupo de compostos os álcoois alifáticos de cadeia longa, esteróis, pigmentos e hidrocarbonetos.

3.2.3.4 Índice de Iodo

O índice de iodo foi determinado de acordo com o método AOCS Cd 1d-92 e é definido como a medida da insaturação de óleos e gorduras e é expresso em termos do número de centigramas de iodo absorvido por grama da amostra (%iodo absorvido).

3.2.3.5 Teor de Clorofila

O método utilizado para determinar o teor de clorofila e pigmentos relacionados (principalmente feofitina a) em óleos através de absorção espectrofotométrica a 630, 670 e 710 nm, metodologia adaptada para aplicação em ceras (Método AOCS Ch 4-91 adaptado segundo VIEIRA, 2003).

3.2.3.6 Teor de Cinzas

O teor de cinzas foi obtido pela metodologia descrita na AOCS Ch 4-91 (adaptado segundo VIEIRA, 2003).

3.2.3.7 Teor de Umidade

O teor de umidade foi determinado de acordo com o método AOCS Ac 2-41.

3.2.3.8 Índice de Acidez

O teor de umidade foi determinado de acordo com o método AOCS Ca 5a-40 (adaptado segundo LI; PARISH, 1998).

3.2.3.9 Índice de Peróxido:

O índice de iodo foi determinado de acordo com o método AOCS NP-90. Este método é utilizado para medir o estado de oxidação de óleos e gorduras. Como os peróxidos são os primeiros compostos formados quando uma gordura deteriora, toda gordura oxidada apresenta resultado positivo no teste de peróxidos.

3.2.4 Composição em ácidos e álcoois graxos

De acordo com PINA et al. (1987) para a determinação da composição, inicialmente a cera foi modificada para promover a hidrólise total dos seus ésteres proporcionando assim, uma maior facilidade operacional nesta análise. A modificação da cera foi realizada através da derivatização na presença do reagente de Grignard, o qual reage com os grupamentos éster da cera, convertendo os ácidos graxos em álcoois terciários e os álcoois graxos em álcoois primários. A reação foi realizada sob condições anidras. A cera derivatizada foi submetida à análise por cromatografia em camada delgada CCD (analítica) para atestar a eficiência da reação. Os álcoois primários e terciários foram separados por CCD (preparativa) e analisados por cromatografia gasosa (CG). Este processo de derivatização foi adaptado para ceras por VIEIRIA (2003).

3.2.4.1 Cromatografia em Camada Delgada

As análises de cromatografia de camada delgada - CCD (analítica) foram feitas em placas de sílica gel de 20 x 20cm e 0,50mm de espessura (Si G 60 Merck), utilizando-se hexano: éter etílico: ácido acético (60:40:0,5) como fase móvel. As amostras derivatizadas (~10µL) foram aplicadas com capilar. As manchas foram localizadas através da vaporização das placas com uma solução

saturada de sulfato de cobre: ácido fosfórico (1:1), e foram submetidas ao aquecimento em estufa a 200°C durante 10 minutos. A identificação dos componentes foi baseada no R_f de padrão autêntico (eicosanol – Sigma) eluído na mesma condição.

As análises de CCD (preparativa) foram feitas no mesmo tipo de placa e utilizando-se a mesma fase móvel que a CCD (analítica). A amostra de cera derivatizada (400 µL) foi aplicada utilizando-se um capilar em uma banda estreita ao longo da placa. As bandas foram localizadas através da revelação de uma parte da placa, utilizando-se o mesmo reagente da CCD analítica. As diferentes bandas foram raspadas, a sílica foi colocada em tubos e os componentes foram extraídos 2 vezes com clorofórmio a quente (80°C). Após a extração, os tubos foram centrifugados (4000rpm, 5 minutos) e depois filtrados, o solvente coletado foi evaporado sob nitrogênio e substituído por 1mL de éter etílico.

3.2.4.2 Cromatografia Gasosa

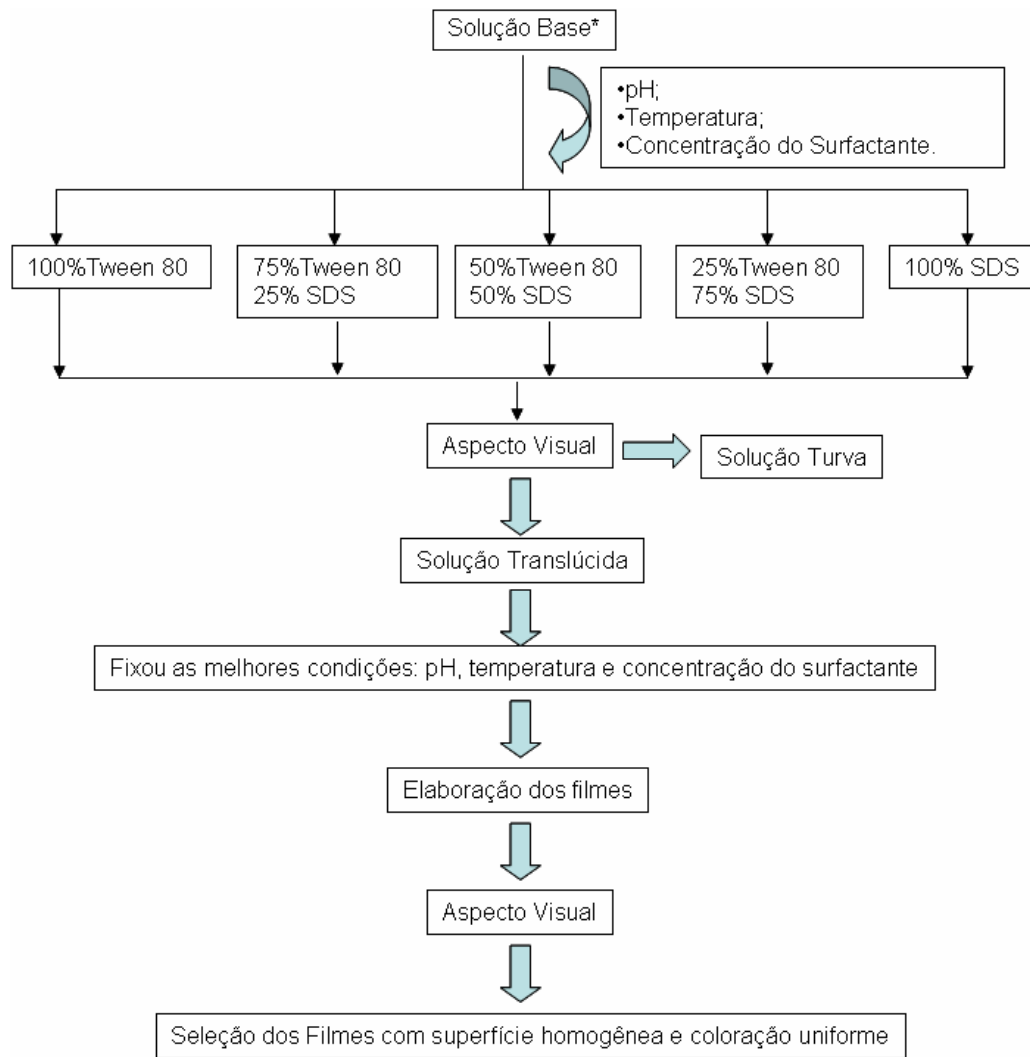
Os álcoois primários foram analisados em cromatógrafo gasoso (GC 6000 Veja Series 2 Carlo Erba) equipado com um detector de ionização de chama (FID) e injetor split. Os componentes foram separados em uma coluna HP-SIMDIST (J & W Scientific, comprimento = 15m, diâmetro interno = 0,53 mm Megabore, espessura de filme = 0,15µm). Amostras de 1,0µL foram injetadas (taxa de split 1:25), a temperatura do detector foi mantida a 350°C e do injetor a 300°C. Hélio foi usado como gás de arraste a 10 mL/min. A temperatura do forno foi mantida a 140°C por 1 min, programada para 360°C a 8 °C/min na coluna. A temperatura do forno foi mantida a 360°C por mais 10 min. A identificação dos picos foi baseada no tempo de retenção do padrão (como padrão foi utilizado o eicosanol da Sigma). A integração foi realizada através da normalização das áreas utilizando-se em um integrador (Integrador Merck D-2500).

3.2.5 Testes Preliminares

Os testes preliminares foram realizados para fixar algumas variáveis incluindo:

- a) A concentração de triacetina nos filmes.
- b) As condições para a elaboração e a composição dos surfactantes na formulação dos filmes biodegradáveis.
- c) O solvente utilizado na despigmentação da cera de cana-de-açúcar.
- d) A concentração das ceras de cana-de-açúcar e de carnaúba nos biofilmes.
- e) A espessura dos filmes.

Estes testes foram realizados para se definir condições de melhor incorporação do lipídio na matriz protéica tendo como variáveis a serem definidas a concentração e a proporção entre os surfactantes (Tween 80 e o Dodecil Sulfato de Sódio – SDS) puros ou na forma de misturas; o pH e a temperatura da solução filmogênica. O parâmetro utilizado para avaliar e definir estas variáveis foi o aspecto visual da solução base (solução contendo os lipídios, triacetina, água e os surfactantes), as soluções translúcidas foram selecionadas e as turvas foram descartadas, conforme descrito na Figura 5. Posteriormente os filmes foram produzidos usando-se o procedimento descrito no item 3.2.6, nas mesmas condições definidas a partir dos testes preliminares.



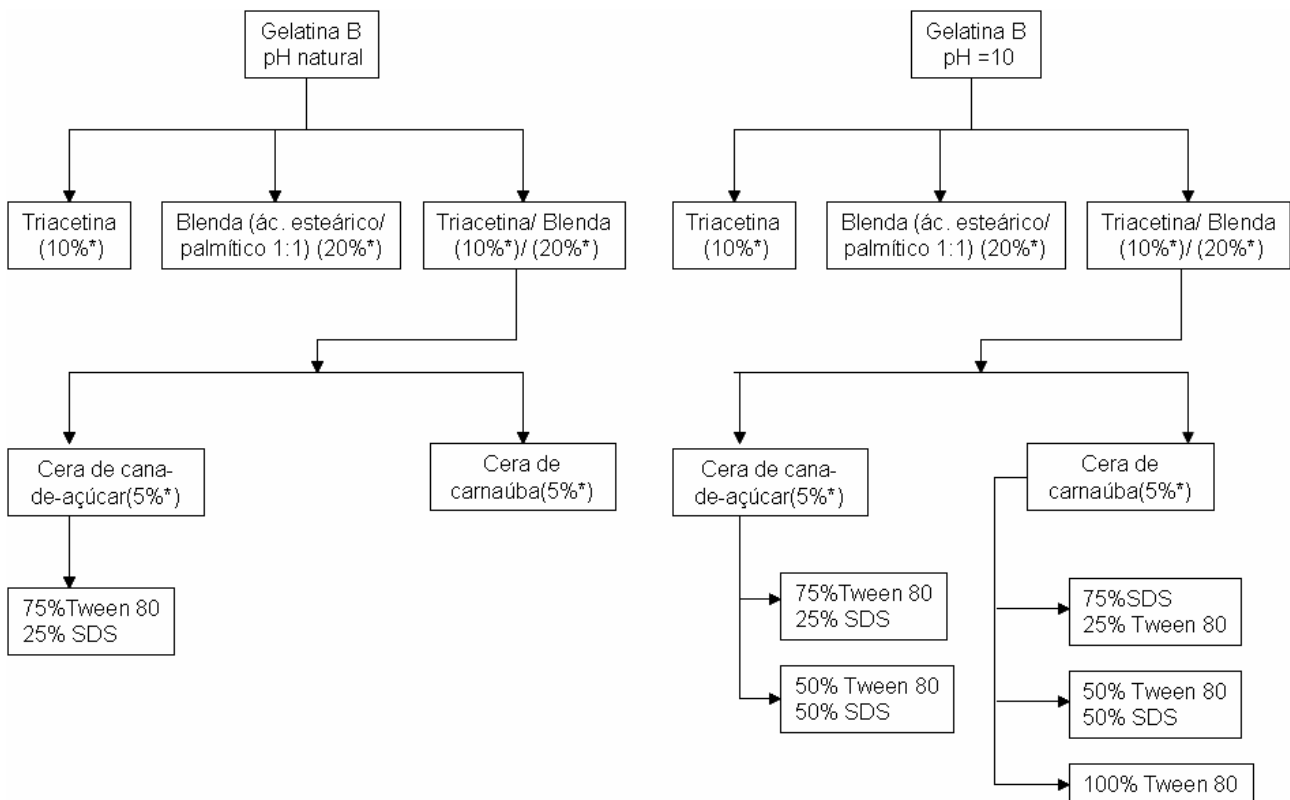
*Solução Base: água destilada (50mL), triacetina (0,5g), ácidos esteárico: palmítico 1:1 (1g), cera de cana-de-açúcar ou carnaúba (0,5g).

Figura 5. Fluxograma do teste preliminar para definir a composição dos surfactantes e as condições de elaboração os filmes biodegradáveis.

3.2.6 Elaboração dos filmes

Os filmes foram elaborados utilizando as condições fixadas nos testes preliminares como: temperatura, pH da solução filmogênica; concentrações dos surfactantes, concentração de cera (cana-de-açúcar e carnaúba), concentração de triacetina e volume aplicado sobre o suporte de modo a manter a espessura constante.

Os filmes foram elaborados utilizando como base o método descrito por (BERTAN, 2003), onde 10g de gelatina tipo B foram hidratadas em 100mL de água destilada por 1h, em temperatura ambiente. Após esse período, a gelatina foi solubilizada a 90°C, em banho termostático, por 10 minutos. Após completa solubilização, o pH foi o natural do sistema ou o ajustado de forma que ao final da preparação estivesse em torno de 8,5. Em seguida foram adicionados sob agitação magnética até homogeneização a triacetina (10g/100g de gelatina), blenda ácidos esteárico: palmítico (1:1 - 20g/100g de gelatina), cera de cana-de-açúcar ou de carnaúba (5g/100g de gelatina), e os surfactantes nas várias concentrações e proporções selecionadas. A solução resultante foi mantida a 70-80°C (banho-maria), por 30 minutos, sob agitação suave para evitar a formação de bolhas. A solução filmogênica foi dispersa em placas de acrílico de 15 cm de diâmetro. A secagem foi realizada a temperatura ambiente (25-30°C). Após a secagem, os filmes foram removidos e mantidos em dessecadores a 25°C e 52 ± 2% de umidade relativa (URE), durante 48h antes do início das análises. As diferentes formulações produzidas podem ser acompanhadas na Figura 6.



*percentagem com relação a massa seca da gelatina

Figura 6. Fluxograma dos filmes produzidos com diferentes formulações produzidas para elaboração dos filmes.

3.2.7 Caracterização dos filmes

3.2.7.1 Aspecto visual

Os filmes foram submetidos a uma primeira etapa de seleção através das análises visuais e táteis, visando utilizar apenas os filmes homogêneos (ausência de partículas insolúveis e coloração uniforme), contínuos (sem a presença rupturas ou zonas quebradiças) e que possibilitassem o manuseio (facilidade de desprendimento dos filmes do suporte). Os filmes que não apresentaram tais características foram descartados.

3.2.7.2 Espessura

A espessura do filme foi medida (média aritmética de várias medidas aleatórias sobre a área do filme), utilizando para isso o aparelho micrômetro com 0,001 mm de resolução (Modelo MDC-25M, Mitutoyo, MFG, Japão). Para se fixar a espessura de todas as formulações elaboradas, foram realizados testes preliminares devido a grande diferença de matéria seca entre as formulações dos filmes, variando-se a alíquota pipetada na placa para formar o filme.

3.2.7.3 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água foi determinada pelo método E-96-95 da ASTM (ASTM, 1995) à 25°C. As amostras dos filmes foram cortadas na forma de discos e seladas com parafina em células de permeação feitas de alumínio, contendo cloreto de cálcio. As células de permeação foram acondicionadas em dessecadores contendo solução salina saturada de cloreto de sódio em temperatura e umidade relativa (umidade relativa de 75%). O vapor de água transferido através do filme foi determinado pelo ganho de massa no sistema, medições foram realizadas a cada 24 horas por 7 dias. Os testes foram realizados em triplicata.

3.2.7.4 Solubilidade em água

O método utilizado para obter a solubilidade em água dos filmes em água foi proposto por GONTARD et al. (1994). As amostras (em triplicata) foram recortadas na forma de discos de 2 cm de diâmetro. A massa seca inicial dos filmes foi obtida após secagem em estufa de circulação de ar a temperatura de 105°C, por 24 h. Novas amostras foram imersas em um recipiente contendo 50 mL de água destilada, e o sistema foi mantido sob lenta agitação mecânica por um

período de 24h, a temperatura ambiente. Após esse período, foram submetidas à secagem a 105°C por um período de 24 h, para a obtenção da massa seca final.

3.2.7.5 Propriedades mecânicas

As análises de tensão na ruptura e de alongação na ruptura (E) foram realizadas com o texturômetro TA-XT2 (Stable Micro System, Surrey, UK), operando de acordo com o método ATM D 882 (ASTM, 1995). Amostras de 10 cm de comprimento X 25 mm de largura foram utilizadas com 10 repetições e fixadas no probe (separação inicial do probe = 50 mm), sendo a velocidade do teste fixada em 1 mm/s.

3.2.7.6 Opacidade

A opacidade dos filmes foi determinada utilizando-se colorímetro Hunterlab (Colorquest II, Faifax). As determinações foram feitas em triplicata após a calibração do colorímetro com padrão branco e um fundo padrão preto. A opacidade foi determinada através do software do equipamento.

3.2.7.7 Microscopia eletrônica de varredura

As características de superfície dos filmes foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura, utilizando o microscópio Jeol (JMS –T330, Tokyo, Japan) operando a 10kV. As amostras foram mantidas no dessecador (contendo sílica gel) por 7 dias e fixadas em “stubs” de alumínio com fita de cobre. As amostras foram cobertas com ouro através do sputter Balzers (SDC050, Baltec, Lichtenstein, Áustria) por 180 seg., 40mA.

3.2.7.8 Microscopia confocal de varredura a laser

A microestrutura dos filmes foram analisadas utilizando microscopia de varredura laser confocal utilizando-se um microscópio Olympus LSM-Fluoview versão 3.2 (Olympus, Tóquio, Japão). A gelatina foi solubilizada após a hidratação, com ou sem ajuste de pH dependendo da formulação, e em seguida corada com o corante FITC (isocianato de fluoresceína) específico para proteína, segundo metodologia proposta por SCHREIBER; HAIMOVICH (1983) e por LAMPRECHT; SCHAFFER; LEHR (2000), com a concentração modificada (50µl/2,5g de proteína). Após a adição, a solução de proteína contendo o corante foi submetida à agitação magnética lenta sob aquecimento de 40°C por uma hora antes de ser utilizada. Em seguida a triacetina (10% - 10g/100g de gelatina); triacetina (10%) e ácido graxo 20% (ácido esteárico, palmítico e a blenda de ambos os ácidos); triacetina (10%), blenda dos ácidos (20%) e as ceras de carnaúba (5%); ou de cana-de-açúcar (5%); foram fundidas e em seguida coradas com o corante “Nilo Red” (1mg/30g de substância hidrofóbica), segundo a metodologia proposta por LAMPRECHT; SCHAFFER; LEHR (2000). Decorrido o tempo necessário para reação do corante FITC com a proteína, foram adicionadas as substâncias hidrofóbicas previamente coradas à solução de gelatina corada e os filmes contendo os surfactantes foram adicionados sem corar a solução filmogênica, sob agitação magnética até a homogeneização. As soluções filme formadoras com os corantes aquecidas a 70-80°C por 30 minutos, também sob agitação suave, foram preparadas como descrito no item 3.2.6.

3.2.7.9 Isotermas de sorção

As isotermas de sorção foram determinadas gravimetricamente de acordo com JOWITT et al. (1983). Os biofilmes foram cortados em pedaços pequenos (aproximadamente 2 x 2 cm) e acondicionados no dessecador com sílica gel por 7 dias, em seguida amostras (mínimo de 0,5 gramas) foram armazenadas em recipientes com soluções salinas saturadas e acondicionadas a 25°C em câmaras de temperatura controladas (BOD TECNAL, MODELO TE-390). As soluções salinas foram escolhidas de modo a abranger uma ampla faixa de umidade relativa (0,114 a 0,904). Os sais utilizados e os respectivos valores de atividade de água encontram-se na Tabela 3 (LABUZA; KANAME; CHEN, 1986). Uma vez alcançado o equilíbrio (período de aproximadamente 20 dias), a massa final foi determinada para se obter a umidade de equilíbrio. Os resultados foram ajustados pelo modelo GAB (Guggenheim-Anderson-de Bøer) e BET (Brunauer-Ermmett-Tetter), utilizando o programa Water Analyzer Series-Isotherm/BET/GAB, versão 2.5. Os testes de adsorção foram realizados em triplicata.

Tabela 2. Umidade relativa das soluções salinas saturadas à 25°C.

SAL	ATIVIDADE DE ÁGUA (T = 25°C)
LiCl	0,114
MgCl ₂	0,329
K ₂ CO ₃	0,443
Mg (NO ₃) ₂	0,536
NaCl	0,762
BaCl ₂	0,904

Fonte: LABUNZA; KANAME; CHEN, 1986.

Modelos de isotermas de adsorção

Os modelos GAB e BET mostrados nas equações abaixo foram ajustados aos dados experimentais através do programa Water Analyzer Series - Isoterm/BET/GAB Program version 2.05p (Macintosh) para estimar as constantes dos modelos.

$$\text{GAB} \rightarrow X = \frac{X_m \cdot c \cdot k \cdot aw}{(1 - k \cdot aw)(1 - k \cdot aw + c \cdot k \cdot aw)}$$

$$\text{BET} \rightarrow X = \frac{X_m \cdot c \cdot aw}{1 + aw(c - 1)(1 - aw)}$$

Onde: X: teor de umidade do filme (em base seca);

X_m : teor de umidade da monocamada;

C e k: constantes;

aw: atividade de água.

3.2.7.10 Calorimetria Diferencial de Varredura

A determinação da temperatura de fusão foi realizada por análise calorimétrica de varredura, utilizando-se um DSC PerKin Elmer TA 7, com módulo de resfriamento com refrigeração mecânica. As amostras (10,0 a 15,0 mg) foram acondicionadas em cápsulas herméticas de alumínio, em condições de umidade relativa controlada (52%) e temperatura ambiente (25°C) por um período de sete dias. As cápsulas foram fechadas anteriormente à análise. As análises foram realizadas em duplicata, utilizando taxa de aquecimento de 10°C/min (FAKIROV et al., 1997), entre 0 a 140°C, em ambiente inerte (N₂). Com a referência utilizada foi uma cápsula vazia. O equipamento foi calibrado com amostra de Índio.

3.2.7.11 Análise Estatística

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio Preliminares

Os testes preliminares foram realizados para fixar os seguintes parâmetros: concentração de triacetina, concentração de surfactante, espessura, concentração das ceras de carnaúba e de cana-de-açúcar.

4.1.1 Concentração de Triacetina

BERTAN (2003) para os filmes de gelatina tipo A, triacetina, blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) e breu branco verificou que a adição de blenda de ácido esteárico/palmítico (10g/100g de gelatina de cada ácido), promoveu uma incorporação mais eficiente do breu branco a solução filmogênica. Assim com base neste estudo as concentrações foram fixadas em 10% gelatina tipo B; de 15g/100g de gelatina de triacetina; de 20g/100g de gelatina de blenda (1:1) de ácido esteárico-palmítico. Os filmes elaborados com 15% de triacetina e com as ceras de carnaúba e de cana-de-açúcar ao invés do breu ficaram com aspecto oleoso após sua secagem e devido a este problema foi realizado um teste preliminar para adequar a concentração de triacetina nos filmes.

As concentrações testadas de triacetina foram de 5; 10; e 15g/100g de gelatina, a concentração foi definida utilizando como parâmetro o aspecto visual do filme, permeabilidade de vapor de água e resistência mecânica. Os resultados de espessura, PVA e tensão na ruptura podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3. Propriedades mecânicas e de permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina e triacetina (25°C).

Filmes*	Espessura (mm)	Permeabilidade ao vapor de água (gmm/m ² dKPa)**	Tensão na ruptura (MPa)**	Elongação (%)***
Gel/Tri (5%)	0,128 ± 0,008	11,60 ± 0,22 ^a	119,68 ± 1,73 ^a	6,54 ± 0,34 ^a
Gel/Tri (10%)	0,131 ± 0,009	8,81 ± 0,34 ^b	102,56 ± 0,36 ^b	5,98 ± 0,37 ^a
Gel/Tri (15%)	0,132 ± 0,003	9,06 ± 0,58 ^b	104,72 ± 0,81 ^b	6,65 ± 0,93 ^a

* Gel: Gelatina, Tri: Triacetina. ** Os valores representam a média e o desvio padrão. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY. *** Os dados de elongação não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$).

Pode-se observar na Tabela 3, que os filmes com concentrações de 10% e 15% não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si em relação aos parâmetros de permeabilidade ao vapor de água e tensão na ruptura, enquanto os filmes contendo 5% de triacetina foram descartados por apresentarem maiores valores de permeabilidade ao vapor de água. Neste trabalho verificou-se que à medida que aumentou a concentração de triacetina de 5% para 10-15% a permeabilidade ao vapor de água reduziu, como observado também por BATISTA (2004), FAKHOURI, BATISTA e GROSSO (2003). Em relação à tensão na ruptura observa-se uma redução significativa no filme contendo 5% em relação aos filmes de 10 e 15% de triacetina, mesmo comportamento verificado por THOMAZINE, CARVALHO e SOBRAL (2005) em filmes de gelatina com glicerol e sorbitol (25 e 55g de plastificante/100g de gelatina). Analisando os filmes contendo 10 e 15% de triacetina não existe diferença significativa entre os valores de PVA e da tensão na ruptura. Em relação à propriedade de elongação a adição de triacetina (5; 10 e 15%) não promoveu diferença significativa ($p < 0,05$) conforme constatado por FAKHOURI (2002). A concentração de triacetina foi identificando os filmes com menor valor de PVA, portanto descartando os filmes contendo 5% de triacetina. Entre as concentrações 10 e 15% a seleção foi realizada pelo aspecto visual, onde a concentração fixada foi de 10% produziu filmes homogêneos e isentos de

materiais exudados em sua superfície, já os filmes contendo 15% de triacetina apresentaram-se oleosos.

4.1.2 Condições para a elaboração e a composição dos surfactantes na formulação dos filmes biodegradáveis.

Os surfactantes escolhidos na elaboração dos filmes foram Tween 80 (surfactante não iônico) e o SDS (surfactante iônico). O teste preliminar realizado teve como objetivo: definir a proporção da mistura destes dois surfactantes, suas concentrações e as condições de preparo dos filmes (pH, temperatura).

As soluções contendo água, triacetina, blenda de ácido esteárico-palmítico, cera de carnaúba ou de cana-de-açúcar e os surfactantes em diferentes combinações (100%/0%, 75%/25%, 50%/50%, 25%/75% e 0%/100% de Tween/SDS) e concentrações 20 – 250g/100g de gelatina. Também foi avaliado o efeito de diferentes temperaturas (60, 70, 80, 90°C) e condições de pH (pH=5,5 ou 8,5). As soluções foram selecionadas de acordo com seu aspecto visual (transparentes).

De acordo com os gráficos mostrados nas Figuras 7 a 12, foram identificadas as soluções que apresentaram transparência em menor concentração de surfactante e em menores valores de temperatura, como apresentado na Tabela 4.

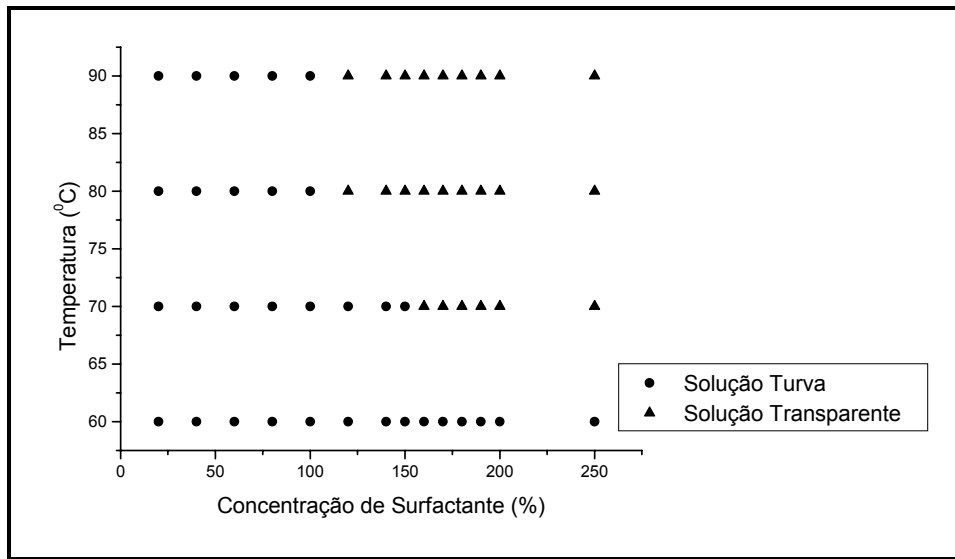


Figura 7. Aspecto visual da solução filmogênica contendo triacetina, blenda de ácido esteárico-palmitico e cera de cana-de-açúcar e a mistura de surfactante (75% de Tween 80/ 25% de SDS) com pH natural =5,5 da solução filmogênica.

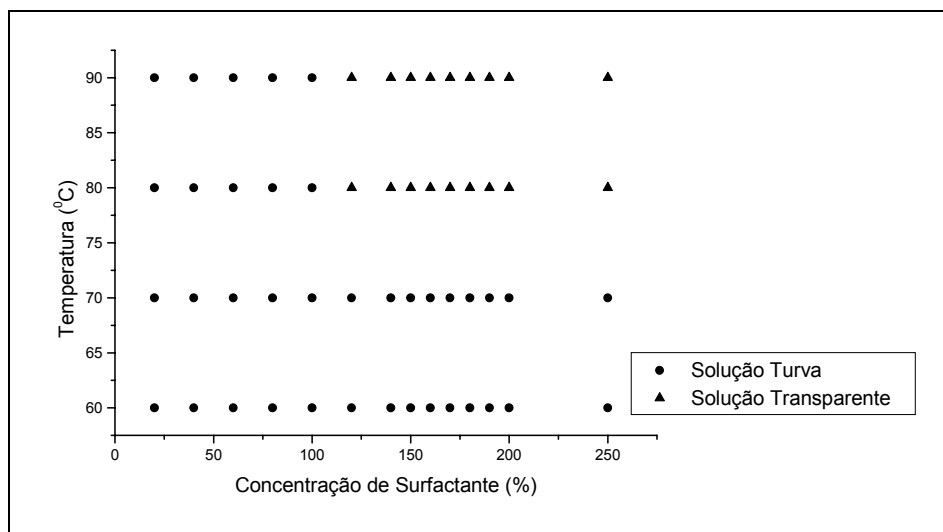


Figura 8. Aspecto visual da solução filmogênica contendo triacetina, blenda de ácido esteárico-palmitico e cera de cana-de-açúcar e a mistura de surfactante (75% de Tween 80/25% de SDS) com pH =8,5 da solução filmogênica.

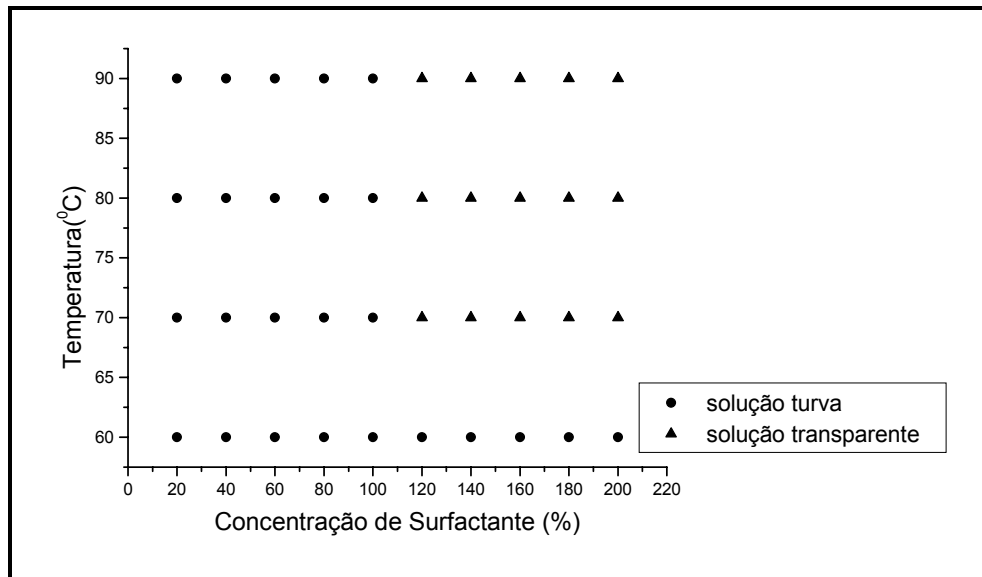


Figura 9. Aspecto visual da solução filmogênica contendo triacetina, blenda de ácido esteárico-palmítico e cera de cana-de-açúcar e a mistura de surfactante (50% de Tween 80/ 50% de SDS) com pH=8,5 da solução filmogênica.

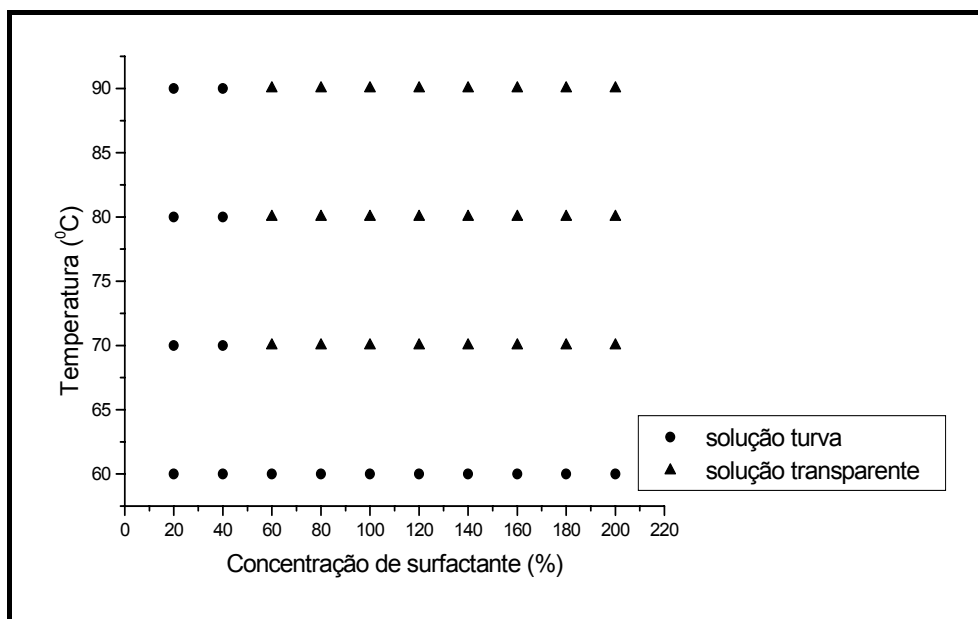


Figura 10. Aspecto visual da solução filmogênica contendo triacetina, blenda de ácido esteárico-palmítico e cera de carnaúba e a mistura de surfactante (100% de Tween 80) com pH=8,5 da solução filmogênica.

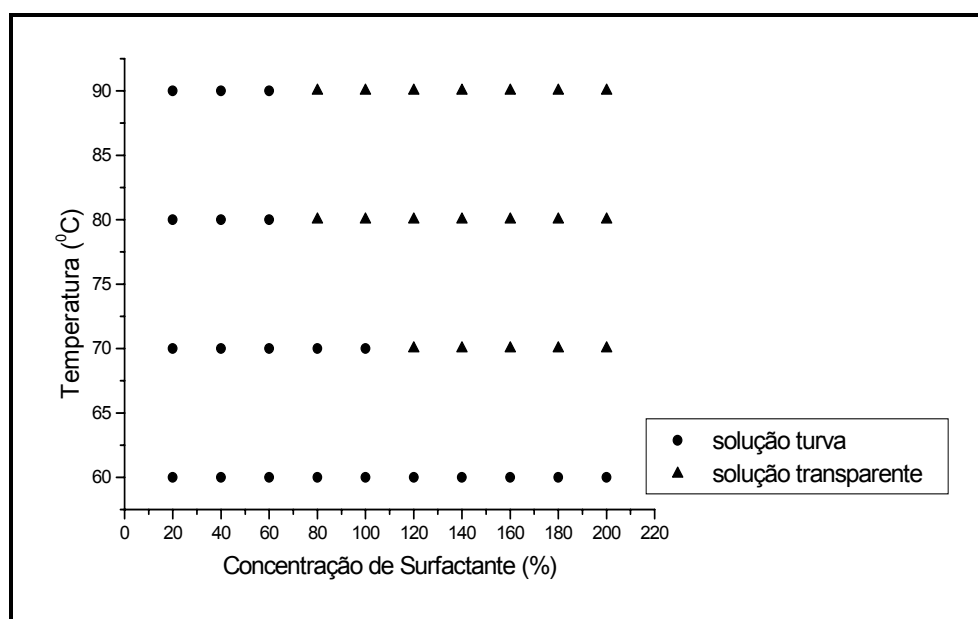


Figura 11. Aspecto visual da solução filmogênica contendo triacetina, blenda de ácido esteárico-palmítico e cera de carnaúba e a mistura de surfactante (75% de SDS / 50% de Tween 80) com pH=8,5 da solução filmogênica.

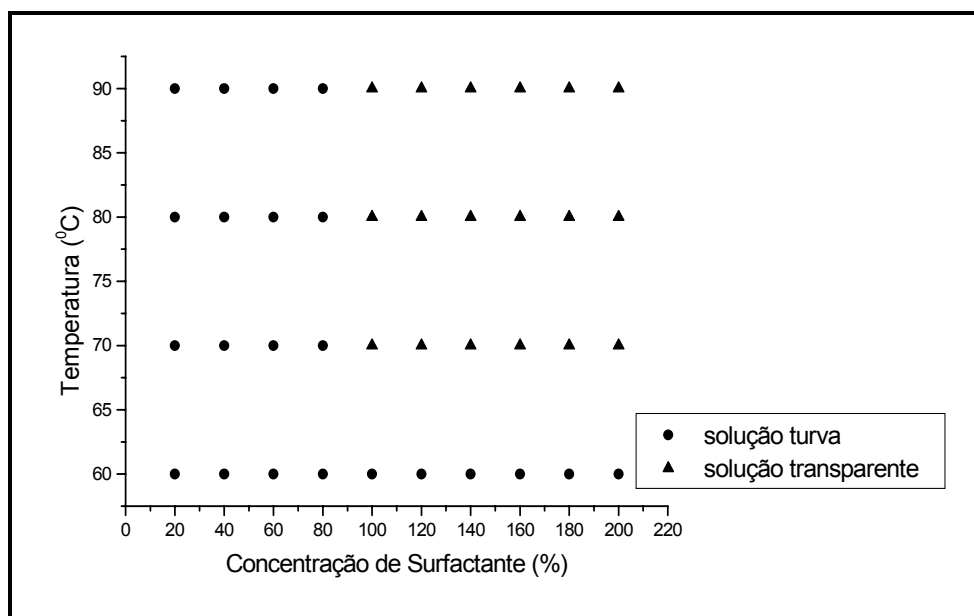


Figura 12. Aspecto visual da solução filmogênica contendo triacetina, blenda de ácido esteárico-palmítico e cera de carnaúba e a mistura de surfactante (50% de SDS / 50% de Tween 80) com pH=8,5 da solução filmogênica.

Para as formulações com cera de cana-de-açúcar as combinações dos surfactantes de 100% de SDS e 75% de SDS/25% de Tween 80 foram descartadas por apresentarem todas as soluções turvas, semelhante às formulações de cera de carnaúba nas seguintes combinações de surfactantes: 75% de Tween/25% de SDS, 100% de Tween e de SDS.

Tabela 4. Condições de preparo da solução filmogênica e da combinação e concentração dos surfactantes utilizados.

Solução*	Concentração do surfactante	pH/ Temperatura	Filme
CA/100% T	160%	pH =8,5/ T=80 ⁰ C	descartado
CA/75%T/ 25% SDS	120% e 160%	pH =5,5/ T=80 ⁰ C pH=8,5/ T=80 ⁰ C	selecionado
CA/50%T/ 50% SDS	120%	pH=8,5/ T=80 ⁰ C	selecionado
CA/25%T/ 75% SDS	200%	pH=8,5/ T=70 ⁰ C	descartado
CA/100% SDS	160%	pH=8,5/ T=70 ⁰ C	descartado
CR/100% T	60%	pH =8,5/ T=80 ⁰ C	selecionado
CR/75%T/ 25% SDS	100% e 120%	pH=8,5/ T=80 ⁰ C	descartado
CR/50%T/ 50% SDS	100%	pH=8,5/ T=80 ⁰ C	selecionado
CR/25%T/ 75% SDS	80% e 120%	pH=8,5/ T=80 ⁰ C	selecionado
CR/100% SDS	160%	pH =8,5/ T=80 ⁰ C	descartado

* CA: cera de cana-de-açúcar, CR: cera de carnaúba. T: Tween 80; SDS: Dodecil sulfato de sódio. Solução utilizada no teste preliminar contém 0,05g de cera (cana-de-açúcar ou de carnaúba), 0,1g de triacetina, 0,2g de blenda de ácido graxo (1:1 esteárico e palmítico), percentagem do surfactante com relação à massa seca (1g) e 10mL de água e sem adição de proteína.

Na Tabela 4 foram apresentadas à concentração e a combinação dos surfactantes e as condições de preparo dos filmes definidas a partir das soluções translúcidas identificadas nas Figuras 7 a 12. Fixadas as condições de preparo (temperatura e pH) e as concentrações da mistura de surfactantes, os filmes foram preparados (de acordo com o item 3.2.6) a partir destas variáveis fixadas e após

secagem foram submetidos à avaliação de seu aspecto visual. Os filmes que apresentaram aspecto oleoso, quebradiços, manchados ou muito opacos, foram excluídos, como mostrado na Tabela 4. Nas formulações contendo cera de carnaúba a adição de surfactante só foi possível em pH=8,5 e nenhuma formulação (em relação à combinação da mistura e concentração) de surfactante foi verificada em comum entre as ceras.

A condição de preparo dos filmes foi definida utilizando-se dois tratamentos de pH: sem ajuste de pH (pH natural= 5,0 – 6,0) e com ajuste de pH (pH modificado \approx 8,5) e a temperatura de 80°C no banho maria por 30 minutos para a fabricação dos filmes.

4.1.3 Despigmentação e Caracterização das ceras de cana-de-açúcar

Na Tabela 5 pode-se observar os resultados de rendimento da despigmentação da cera e a aparência da mesma. Na Figura 13, pode-se observar a coloração das ceras de cana-de-açúcar despigmentadas com diferentes solventes.

O processo de despigmentação da cera consistiu na remoção da clorofila com o auxílio de solventes orgânicos (álcool etílico e/ou acetona). Foram necessários testes para a escolha do solvente levando-se em conta o rendimento e a coloração desejada da cera, como apresentada na Tabela 5.

Observando-se os resultados da Tabela 5 verifica-se que o solvente com maior rendimento foi o etanol, porém a cera de cana-de-açúcar despigmentada com este solvente apresentou coloração verde mais escuro que os outros tratamentos. À medida que se aumentou a concentração de acetona ocorreu uma redução no rendimento da cera, mas a despigmentação tornou-se mais eficiente. Como o rendimento dos tratamentos utilizando mistura de solventes (Acetona/Etanol) não apresentaram diferença significativa $p < 0,05$ e a mistura de etanol (10%)/acetona (90%) teve maior eficiência na extração da coloração

esverdeada esta mistura de solvente foi selecionada. O rendimento na extração da cera foi maior com a mistura (1:9 etanol/acetona) em relação à acetona pura.

Tabela 5. Aspecto e rendimento da cera de cana-de-açúcar após o processo de despigmentação.

Solvente	Rendimento* (%)	Coloração
Etanol (100%)	54,40 ± 4,6 ^a	Verde escuro
Etanol (50%)/ Acetona (50%)	38,90 ± 4,0 ^b	Verde
Etanol (25%)/ Acetona (75%)	39,10 ± 5,5 ^b	Verde abacate
Etanol (10%)/ Acetona (90%)	37,60 ± 2,1 ^b	Verde claro
Acetona (100%)	30,60 ± 2,4 ^c	Verde claro

* Os valores de média e desvio padrão foram obtidos a partir de triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

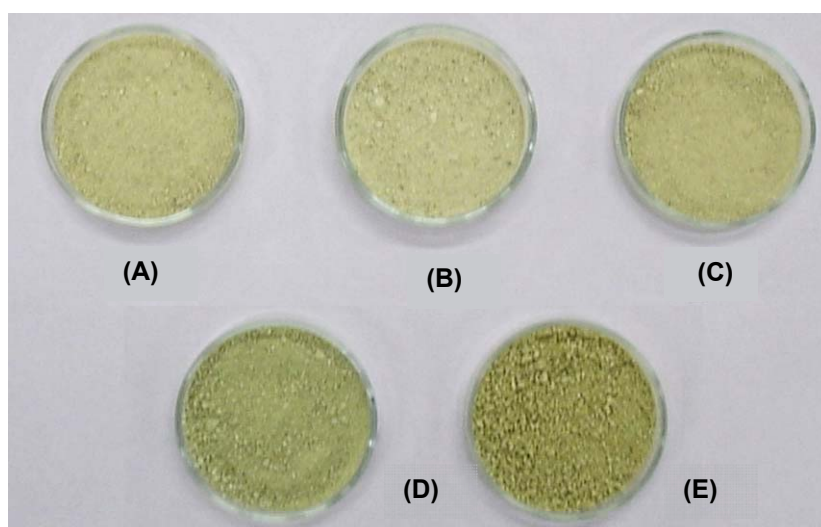


Figura 13. Coloração da cera de cana-de-açúcar em diversos tratamentos variando os solventes: (A) 100% de acetona; (B) 90% de acetona/ 10% de etanol; (C) 75% de acetona/ 25% de etanol; (D) 50% de acetona/ 50% de etanol e (E) 100% de etanol.

Depois de padronizado o processo de despigmentação da cera de cana-de-açúcar (descrito no item 3.2.2) obteve-se a cera despigmentada (Figura 14A) a partir da cera purificada (Figura 14B). A caracterização da cera de cana despigmentada e purificada foi realizada com o objetivo de verificar se ocorriam mudanças em suas propriedades com o processo de despigmentação, como mostrado na Tabela 6.

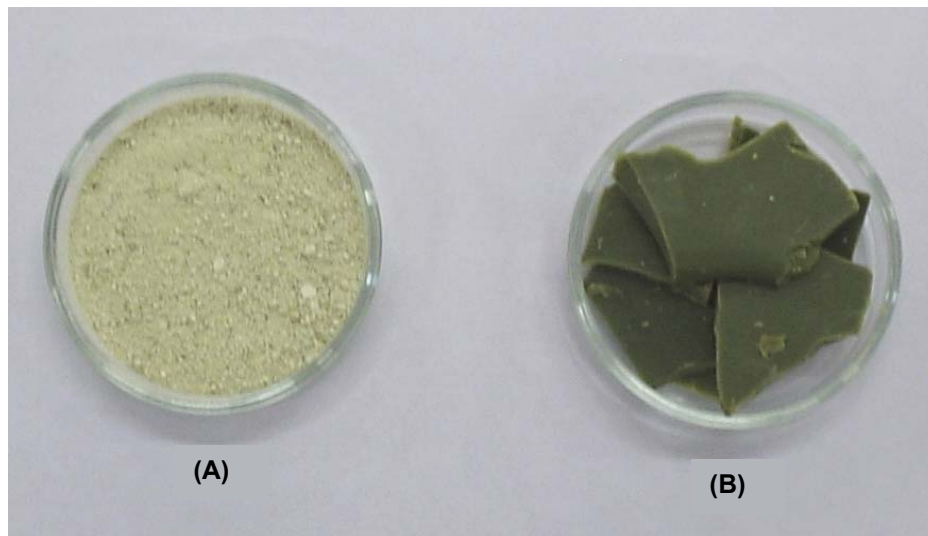


Figura 14. Cera de cana-de-açúcar despigmentada (A) obtida através da despigmentação da cera de cana de açúcar purificada (B).

O processo de despigmentação da cera de cana-de-açúcar com o solvente (90% Acetona/10%Etanol), causou modificações em algumas propriedades da cera despigmentada (CD) em relação à cera purificada (CP), como pode-se observar na Tabela 6, onde o teor de clorofila foi reduzido em 85%. Outras propriedades que sofreram modificações com este tratamento foram o índice de acidez que foi reduzido em 68% devido à lavagem com os solventes causando a perda de ácidos graxos e nos índices de saponificação (redução de 50,3%); de peróxido (redução de 83%); de iodo (redução de 77%) e matéria insaponificável (redução de 24%).

Tabela 6. Caracterização físico-química da cera de cana-de-açúcar e de carnaúba

Propriedades	Cana	Cana	Carnaúba***
	purificada*	despigmentada**	
Índice de Acidez (mg KOH/g)	39,08 ± 0,56	12,54 ± 0,28	13,09 ± 0,48
Matéria Insaponificável (%)	50,84 ± 7,89	38,37 ± 5,77	54,80 ± 2,46
Índice de Saponificação (mg KOH/g)	118,33 ± 2,22	58,72 ± 5,49	75,32 ± 2,26
Umidade (%)	5,28 ± 0,28	5,30 ± 0,36	-
Cinzas (%)	0,26 ± 0,04	0,93 ± 0,12	-
Fósforo (mg/kg)	204,79 ± 7,11	188,62 ± 25,12	6,55 ± 0,79
Índice de Iodo (mg /100g)	55,72 ± 0,33	12,89 ± 1,64	-
Teor de Clorofila (mg/kg)	138,31 ± 2,22	20,75 ± 2,93	-
Ponto de Fusão (°C)	70,20	85,2	75,3
Índice de Peróxido (mg /100g)	61,00 ± 2,20	10,59 ± 0,02	-

* Valores obtidos por ROZÁRIO (2006); **A média e o desvio padrão foram obtidos por 5 repetições. *** valores obtidos por VIEIRA (2003).

A derivatização das amostras de cera purificada e despigmentada com o reagente de Grignard foi monitorada através de cromatografia em camada delgada (CCD). A reação ocorreu durante 2 horas à temperatura ambiente e promoveu a conversão dos ésteres em álcoois primários e terciários em todas as amostras analisadas. As análises por CCD mostraram que as amostras derivatizadas apresentaram bandas relativas aos álcoois primários, álcoois terciários e hidrocarbonetos (que não foram alterados pelo reagente de Grignard), como verificado também por VIEIRA (2003).

As ceras analisadas apresentaram álcoois graxos saturados de 24 a 32 carbonos, sendo que o principal componente nas ceras purificada e despigmentada de cana-de-açúcar foi o octacosanol (C₂₈H₅₇OH). As ceras epicuticulares de várias plantas possuem normalmente álcoois graxos de 20 a 32 carbonos (TULLOCH, 1974; BENNET, 1956). A Tabela 7 apresenta a composição

obtida em álcoois graxos das amostras derivatizadas. Para estas determinações um padrão interno foi utilizado. Os cromatogramas são apresentados no Anexo II.

Tabela 7. Composição de álcoois graxos de ceras purificadas e despigmentadas de cana-de-açúcar e cera de carnaúba.

Álcoois graxos	Cera de cana purificada(%)*	Cera de cana despigmentada(%)**	Cera de Carnaúba(%)***
22:0	-	-	3,52
24:0	1,76 ± 0,18	1,19 ± 0,08	12,53
26:0	15,29 ± 2,31	14,96 ± 1,70	-
27:0	3,14 ± 0,22	1,42 ± 0,02	-
28:0	59,28 ± 1,80	60,94 ± 0,49	2,01
29:0	9,73 ± 1,10	10,58 ± 0,53	-
30:0	8,16 ± 0,39	7,93 ± 0,43	10,32
32:0	2,64 ± 0,18	2,97 ± 0,31	58,37
34:0	-	-	12,95

* Valores obtidos por ROZÁRIO (2006); **A média e o desvio padrão foram obtidos por 3 repetições. *** valores obtidos por VIEIRA (2003).

Na Tabela 7, observa-se que o conteúdo dos álcoois graxos (C₂₄ ao C₃₂) da cera de cana-de-açúcar despigmentada não sofreu alterações significativas comparado com a cera purificada, mostrando que o processo de despigmentação não causou modificações agressivas na composição da cera.

4.1.4 Concentração das ceras nos filmes

Definidas as concentrações de blenda de ácidos graxos e de triacetina, foram testadas diversas concentrações de cera (cana-de-açúcar e carnaúba), para verificar em qual das concentrações (2,5; 5; 7,5; 10%) a cera seria incorporada com maior eficiência. Os filmes foram avaliados de acordo com seu aspecto

visual. Os filmes compostos de 2,5 e 5% de cera tanto de carnaúba quanto de cana-de-açúcar apresentaram boa homogeneidade, coloração homogênea e ausência de partículas insolúveis dispersas irregularmente na superfície, ao contrário do que foi observado para os filmes contendo 7,5 e 10% de cera. A concentração de cera de 5% foi escolhida por apresentar melhor aspecto visual e com isso maior eficiência na incorporação, em relação às outras concentrações.

Depois de fixada a concentração de cera (de cana-de-açúcar e carnaúba) em 5% (em relação à massa seca da gelatina) adicionadas aos filmes, foi realizado um aquecimento da solução filmogênica no processamento para aumentar a eficácia na incorporação das ceras e da blenda de ácidos graxos na matriz da gelatina previamente solubilizada. Após a fixação das formulações os filmes foram produzidos e caracterizados.

4.1.5 Espessura dos filmes

A espessura dos filmes foi fixada na faixa de 0,115 a 0,125mm, variando-se o volume da solução filmogênica dispersa na placa para cada formulação, como pode ser observada nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Matéria-seca, volume da solução filmogênica disperso no suporte e espessura obtida para diferentes formulações estudadas (sem ajuste de pH):

Filmes*	Massa Seca (g)	Alíquota (mL)	Espessura (mm)
Gel	10,00	24,0	0,110 ± 0,008
Gel/Tri (10%)	11,00	23,0	0,115 ± 0,012
Gel/BI (20%)	12,00	17,0	0,111 ± 0,011
Gel/Tri/BI	13,00	17,0	0,117 ± 0,009
Gel/Tri/BI/CA (2,5%)	13,25	15,5	0,111 ± 0,012
Gel/Tri/BI/CA (5%)	13,50	14,5	0,115 ± 0,009
Gel/Tri/BI/CA (7,5%)	13,75	15,5	0,127 ± 0,008
Gel/Tri/BI/CA (10%)	14,00	15,0	0,126 ± 0,007
Gel/Tri/BI/CR (2,5%)	13,25	15,5	0,117 ± 0,005
Gel/Tri/BI/ CR (5%)	13,50	15,0	0,116 ± 0,010
Gel/Tri/BI/ CR (7,5%)	13,75	15,5	0,125 ± 0,009
Gel/Tri/BI/ CR (10%)	14,00	15,0	0,127 ± 0,011
Gel/120S	22,00	12,5	0,122 ± 0,007
Gel/Tri/120S	23,00	12,0	0,113 ± 0,014
Gel/BI/120S	24,00	11,0	0,118 ± 0,009
Gel/Tri/BI/120S	25,00	11,0	0,120 ± 0,013
Gel/Tri/BI/CA (5%)/120S	25,5	9,0	0,122 ± 0,004
Gel/160S	26,00	8,0	0,111± 0,021
Gel/Tri/160S	27,00	9,0	0,116 ± 0,015
Gel/BI/160S	28,00	9,0	0,127 ± 0,011
Gel/Tri/BI/160S	29,00	9,0	0,120 ± 0,008
Gel/Tri/BI/CA (5%)/160S	29,50	8,0	0,125 ± 0,011

* Gel: Gelatina, Tri: triacetina, BI: blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico), CA: cera de cana-de-açúcar, CR: cera de carnaúba, 160S: 160% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina, 120S: 120% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina.

Tabela 9. Matéria-seca, volume da solução filmogênica disperso no suporte e espessura obtida para diferentes formulações estudadas (com ajuste de pH):

Filmes*	Massa Seca (g)	Aliquota (mL)	Espessura (mm)
Gel	10,00	26,0	0,131± 0,004
Gel/Tri (10%)	11,00	25,0	0,131 ± 0,009
Gel/BI (20%)	12,00	21,0	0,127 ± 0,008
Gel/Tri/BI	13,00	21,0	0,135 ± 0,005
Gel/Tri/BI/CA (2,5%)	13,25	20,5	0,137 ± 0,011
Gel/Tri/BI/CA (5%)	13,50	20,0	0,134± 0,006
Gel/Tri/BI/CA (7,5%)	13,75	19,5	0,139 ± 0,015
Gel/Tri/BI/CA (10%)	14,00	19,0	0,137 ± 0,009
Gel/Tri/BI/CR (2,5%)	13,25	20,5	0,141 ± 0,012
Gel/Tri/BI/ CR (5%)	13,50	20,0	0,134 ± 0,007
Gel/Tri/BI/ CR (7,5%)	13,75	19,5	0,138 ± 0,009
Gel/Tri/BI/ CR (10%)	14,00	19,0	0,141 ± 0,012
Gel/60T	16,0	14,0	0,129 ± 0,012
Gel/Tri/60T	17,0	15,0	0,132 ± 0,004
Gel/BI/ 60T	18,0	15,0	0,127 ± 0,003
Gel/Tri/BI/60T	19,0	15,0	0,137 ± 0,004
Gel/Tri/BI/CR(5%)/60T	19,5	12,0	0,118± 0,010
Gel/BI/80SDS	20,0	14,0	0,131 ± 0,003
Gel/Tri/BI/CR(5%)/80SDS	21,5	12,0	0,121 ± 0,007
Gel/120S	22,0	12,0	0,124 ± 0,019
Gel/Tri/120S	23,0	13,0	0,138 ± 0,003
Gel/Tri/BI/CR(5%)/100MT	23,5	10,0	0,128± 0,013
Gel/BI/120S	24,0	13,0	0,138 ± 0,002
Gel/Tri/BI/120S	25,0	12,5	0,134 ± 0,009
Gel/Tri/BI/120MT	25,0	11,0	0,121± 0,002
Gel/Tri/BI/CA (5%)/120S	25,5	9,0	0,126 ± 0,016
Gel/Tri/BI/CA (5%)/120MT	25,5	9,5	0,122 ± 0,015
Gel/Tri/BI/CR(5%)/120SDS	25,5	9,5	0,119 ± 0,009
Gel/BI/160S	28,0	11,0	0,133 ± 0,001
Gel/Tri/BI/160S	29,0	10,0	0,128 ± 0,008
Gel/Tri/BI/CA (5%)/160S	29,5	8,0	0,122 ± 0,010

* Gel: Gelatina, Tri: triacetina, BI: blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico), CA: cera de cana-de-açúcar, CR: cera de carnaúba, 60T: 60% de Tween 80 em relação à massa seca da gelatina; 80SDS: 80% mistura de surfactantes (onde 25% da mistura Tween 80 e 75% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 120S: 120% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 100MT: 100% mistura de surfactantes (onde 50% da mistura Tween 80 e 50% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 120MT: 120% mistura de surfactantes (onde 50% da mistura Tween 80 e 50% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 120SDS: 120% mistura de surfactantes (onde 25% da mistura Tween 80 e 75% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 160S: 160% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina.

Como esperado nas Tabelas 8 e 9, observa-se uma diminuição do volume disperso no suporte da solução filmogênica com o aumento da quantidade de matéria seca nos filmes, mesmo comportamento observado por BERTAN (2003) e FAKHOURI (2002) onde o aumento da quantidade de matéria seca com a adição de ácidos graxos a filmes de gelatina e triacetina causou um aumento da espessura.

Com a alíquota definida para todos os filmes, cada formulação foi analisada em relação à permeabilidade ao vapor de água (PVA), resistência mecânica, solubilidade em água, opacidade (considerando-se o PVC, como referência), morfologia através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de varredura a laser (MCVL), isotermas de sorção e calorimetria diferencial de varredura (DSC) para os filmes contendo as ceras e os surfactantes (separadamente e em conjunto).

4.2 Permeabilidade ao vapor de água

Nos filmes de gelatina em pH natural (5,5) a adição de triacetina e da blenda de esteárico-palmítico provocou um aumento da permeabilidade de vapor de água (PVA), já nos filmes (pH=5,5) adicionados de triacetina e de blenda separadamente não apresentaram diferença significativa na PVA, em relação aos filmes de gelatina (Tabela 10). Nos filmes com ajuste de pH (8,5) a adição de triacetina e de blenda (individualmente ou combinados) reduzem significativamente os valores de PVA, sendo mais acentuado para os filmes contendo triacetina e blenda apresentando uma taxa de redução de 70%, em relação ao filme simples de gelatina (Tabela 11). Observando as Tabelas 10 e 11, verificou-se que o ajuste de pH aumentou a PVA filme de gelatina, em relação ao filme sem ajuste de pH, efeito contrário foi observado para o filme contendo triacetina e blenda o ajuste de pH reduz a PVA em 67% em relação aos filmes sem ajuste de pH. Para os demais filmes sem a adição de cera o ajuste de pH não

provocou alterações significativas na PVA, em relação aos filmes sem ajuste de pH.

Os filmes compostos de gelatina e cera de cana ou de carnaúba contendo 2,5; 5; 7,5 e 10% foram ensaiados quanto a PVA para identificar a concentração de cera com melhor eficiência e homogeneidade de incorporação, ou seja, menor PVA. Os filmes compostos de gelatina contendo 5% de cera (cana-de-açúcar ou carnaúba) foram escolhidos por possuírem menor valor, embora sem diferença significativa ($p < 0,5$) na taxa de PVA e melhor aparência, como observado nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina (10%) (sem ajuste do pH, pH=5,5), triacetina (10%), blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) (20%) e cera de cana-de-açúcar (0%, 2,5; 5; 7,5; 10%).

Filmes	Espessura (mm)	PVA (gmm/m ² dKPa)*
Gel	0,110 ± 0,008	11,59 ± 0,23 ^{b,c}
Gel/Tri	0,115 ± 0,012	12,62 ± 0,29 ^{a,b}
Gel/BI	0,111 ± 0,011	11,75 ± 0,15 ^{a,b,c}
Gel/Tri/BI	0,117 ± 0,009	13,34 ± 0,48 ^a
Gel/Tri/BI/CA (2,5%)	0,111 ± 0,012	11,47 ± 0,10 ^{a,b,c}
Gel/Tri/BI/CA (5%)	0,115 ± 0,009	10,34 ± 0,10 ^{c,d}
Gel/Tri/BI/CA (7,5%)	0,127 ± 0,008	12,09 ± 0,18 ^{a,b}
Gel/Tri/BI/CA (10%)	0,126 ± 0,007	12,20 ± 0,16 ^{a,b}
Gel/Tri/BI/CR (2,5%)	0,117 ± 0,005	12,96 ± 0,19 ^{a,b}
Gel/Tri/BI/CR (5%)	0,116 ± 0,010	10,42 ± 0,69 ^{c,d}
Gel/Tri/BI/CR (7,5%)	0,125 ± 0,009	5,53 ± 0,20 ^f
Gel/Tri/BI/CR (10%)	0,127 ± 0,011	8,18 ± 0,35 ^e

*Gel: gelatina; Tri: triacetina; BI: blenda de ácido graxo (esteárico-palmítico); CA: cera de cana-de-açúcar; CR: cera de carnaúba. **Os valores de média e desvio padrão foram obtidos a partir das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

Na Tabela 10, pode-se verificar que a adição da cera de cana-de-açúcar nos filmes emulsionados de gelatina sem ajuste de pH, em diversas concentrações (2,5, 5, 7,5 e 10%) não alteraram significativamente os valores de PVA. Isto pode ser explicado pela pouca incorporação desta cera na matriz protéica, aumentando o número de espaços vazios na interface proteína-cera, fenômeno evidenciado também por DONHOWE e FENNEMA (1994) em filmes emulsionados com cera de carnaúba e candelila. Foi observada uma diferença significativa nos valores de PVA entre as ceras de carnaúba e de cana-de-açúcar nos filmes emulsionados de gelatina sem ajuste de pH.

A adição da cera de cana-de-açúcar sem ajuste de pH (Tabela 10) produziu um ligeiro acréscimo no valor da PVA conforme a quantidade de cera de cana aumentava, obtendo-se o menor valor da PVA para a adição de 5% de cera. O mesmo efeito foi observado para os filmes emulsionados sem ajuste de pH com a adição crescente de cera de carnaúba (Tabela 10), que também provocou um aumento da PVA, apresentando menor valor de PVA na concentração 7,5%, mesmo comportamento verificado em filmes emulsionados de proteína do soro com cera de carnaúba (TALENS; KROCHTA, 2005).

Para os filmes a base de gelatina elaborados com ajuste de pH (8,5) mostrados na Tabela 11, os valores de PVA foram afetados com a adição das ceras (de cana-de-açúcar ou de carnaúba). A adição de ambas as ceras reduziu os valores de PVA em relação ao filme de gelatina, sendo a de carnaúba um pouco mais eficiente nesta redução (Tabela 11). Esta redução pode ser explicada pela hidrofobicidade das ceras que retêm a passagem de vapor de água através do filme. Vários autores verificaram que a adição de cera foi mais efetiva na redução da PVA, como KIM et al. (2002) em filmes emulsionados de isolado protéico de soja com cera de sorgo, onde a adição da cera reduziu 60% a PVA em relação ao filme sem a cera.

Quando o pH foi aumentado (Tabela 11) a adição crescente da cera (de cana-de-açúcar ou de carnaúba) na faixa de concentração de 2,5 até 10% provocou redução da PVA, em relação ao filme de gelatina. Para os filmes contendo cera de cana o menor valor apresentado foi na concentração de 7,5%,

em relação às outras concentrações da cera, já os filmes contendo cera de carnaúba não apresentaram diferenças significativas entre as concentrações da cera. Por outro lado, o aumento no valor da PVA com o aumento do teor de lipídios foi observado por BATISTA (2004), para filmes a base de pectina e por GARCIA; MARTINO e ZARITZKI (2000) para filmes a base de amido. O aumento da PVA pode ter sido decorrente de uma possível descontinuidade da matriz filmogênica com a adição dos compostos lipídicos.

Diminuição da PVA com a adição de compostos lipídicos foi relatado na literatura disponível sobre filmes comestíveis/ biodegradáveis YANG e PAUSON (2000a) examinaram o efeito da adição de blenda de ácido esteárico-palmítico, assim como da cera de abelha nas propriedades dos filmes de gela na e os resultados revelaram que ambos foram efetivos na redução da PVA, sendo a cera mais efetiva. PALMU e GROSSO (2003) para filmes a base de glúten adicionados de 30% da mistura ácido esteárico-palmítico e cera de abelha, verificaram uma redução da PVA (1,65 gmm/m²dKPa) quando comparados com o mesmo filme contendo apenas 30% de cera de abelha (5,01 gmm/m²dKPa). Outros autores relataram que ao se adicionar os componentes lipídicos em filmes de glúten ocorreu um aumento na PVA, devido aos componentes hidrofóbicos apresentarem forma esférica e não serem capazes de se associar com a cadeia de proteína, resultando em uma interação heterogênea entre a proteína e o lipídio tornando-se um fator crítico na PVA dos filmes (GONTARD et al., 1994).

Tabela 11. Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina (10%) (com ajuste do pH, pH=8,5), triacetina (10%), blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) (20%) e cera de cana-de-açúcar ou de carnaúba (0%, 2,5; 5; 7,5; 10%).

Filmes*	Espessura (mm)	PVA (gmm/m ² dKPa)**
Gel	0,131± 0,004	14,87 ± 0,92 ^a
Gel/Tri	0,131 ± 0,009	11,60 ± 0,34 ^b
Gel/BI	0,131 ± 0,009	11,60 ± 0,34 ^b
Gel/Tri/BI	0,135 ± 0,005	4,42 ± 0,20 ^e
Gel/Tri/BI/CA (2,5%)	0,137 ± 0,011	6,48 ± 0,45 ^{c,d}
Gel/Tri/BI/CA (5%)	0,134± 0,006	6,85 ± 0,34 ^c
Gel/Tri/BI/CA (7,5%)	0,139 ± 0,015	4,79 ± 0,45 ^{d,e}
Gel/Tri/BI/CA (10%)	0,137 ± 0,009	6,27 ± 0,66 ^{c,d}
Gel/Tri/BI/CR (2,5%)	0,141 ± 0,012	4,80 ± 0,28 ^{d,e}
Gel/Tri/BI/CR (5%)	0,134 ± 0,007	5,12 ± 0,39 ^{d,e}
Gel/Tri/BI/CR (7,5%)	0,138 ± 0,009	5,85 ± 0,40 ^d
Gel/Tri/BI/CR (10%)	0,141 ± 0,012	5,45 ± 0,68 ^{d,e}

*Gel: gelatina; Tri: triacetina; BI: blenda de ácido graxo (esteárico-palmítico); CA: cera de cana-de-açúcar; CR: cera de carnaúba. **Os valores de média e desvio padrão foram obtidos a partir das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

Pode-se observar comportamento semelhante tanto para a cera de cana-de-açúcar como para cera de carnaúba, ou seja, o ajuste do pH provocou redução da PVA, em relação aos filmes sem ajuste de pH, exceto para os filmes contendo cera de carnaúba na concentração de 7,5% que não apresentaram diferença significativa nos valores de PVA, em relação aos filmes sem ajuste de pH (Figura 10 e 11). De acordo com PEREZ-GAGO e KROCHTA (1999) que estudaram o efeito da variação do pH (4,0 - 8,0) em filmes emulsionados de proteína de soro de leite e cera de abelha, a utilização de um valor do pH mais próximo do ponto isoelétrico da proteína provocou um aumento da PVA, relacionado com a

separação de fase nos filmes emulsionados que conseqüentemente aumentaram o tamanho da gota da emulsão (em torno de 10 μ m) tornando-se instável. Adicionalmente o pH mais próximo do pI aumenta a viscosidade da solução, pela agregação proteína-proteína diminuindo assim a mobilidade das partículas lipídicas o que pode provocar uma dispersão irregular na matriz filmogênica. Considerando que a gelatina utilizada apresenta um ponto isoelétrico na faixa de 4,5-5,5 o aumento do pH pode ter produzido os efeitos contrários aos citados levando à redução da PVA, devido à distância do pH de trabalho e do ponto isoelétrico. Ainda de acordo com PEREZ-GAGO; KROCHTA (1999) por outro lado, o aumento do pH para valores mais altos poderia ter exposto mais os grupos SH da proteína do soro de leite de alguma forma permitindo o aprisionamento da fração lipídica na rede protéica, prevenindo a separação de fases, produzindo tamanho de gotas de emulsão menores (em torno de 1,5 μ m) facilitando assim dispersão na emulsão e produzindo menores valores de PVA.

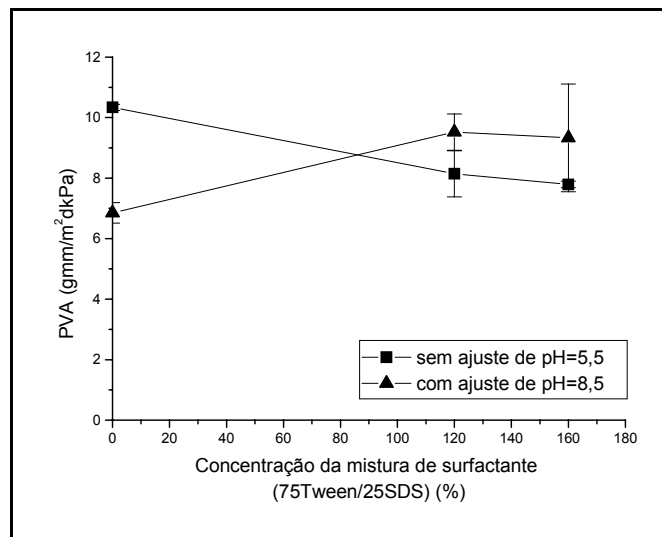


Figura 15. Efeito do aumento da concentração da mistura surfactantes nos filmes de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos e cera de cana-de-açúcar em duas condições de pHs (com ajuste=8,5 e sem ajuste= 5,5) sobre a permeabilidade ao vapor de água.

Em relação à adição de diferentes concentrações de mistura de surfactantes (Figura 15), pode-se observar que a adição crescente (0, 120 e 160g/100g de gelatina) da mistura de surfactante (3:1 Tween 80/ SDS) provocou efeito contrário em relação ao aumento do pH (Figura 15). Nos filmes sem ajuste de pH (5,5) a adição desta mistura de surfactante foi mais eficiente na redução da PVA, favorecendo a ação do surfactante na solução filmogênica como agente emulsificante, estabilizando a emulsão e distribuindo melhor os glóbulos de lipídios na matriz protéica. Já os filmes com ajuste de pH (8,5) a adição da mistura de surfactante aumentou a PVA tornando sua aplicação nesta condição de pH inviável. O aumento da concentração da mistura de surfactante nos filmes emulsionados favorece o aumento da diferença das PVAs entre os filmes com e sem ajuste de pH.

Este estudo foi realizado apenas com a cera de cana-de-açúcar, pois os filmes emulsionados de cera de carnaúba adicionados da mistura de surfactante em pH ácido (5,5) foram descartados pelo teste preliminar (no item 4.1.2) por apresentarem soluções turvas.

Na Figura 16, pode-se observar o efeito do aumento do pH nas formulações contendo gelatina, e blenda até as mais complexas (contendo cera de cana-de-açúcar 3,5g) adicionadas da mistura de surfactantes (3:1 Tween 80/ SDS, na concentração de 160%), a adição do surfactante em pH básico provocou um aumento da PVA, comparando com os filmes sem ajuste de pH. A adição desta mistura de surfactante nos filmes de gelatina e nos filmes compostos de gelatina e triacetina ambos com ajuste de pH (8,5) foram descartados por apresentarem manchas e rachaduras, os demais foram analisados e verificou-se um aumento da PVA em relação aos filmes sem ajuste de pH, como mostrado na Figura 16. Abaixo desta concentração (2g de material hidrofóbico) os filmes foram analisados. Contrariamente, para filmes com a mesma mistura de surfactante na concentração de 120%, o efeito do aumento do pH não causou alterações significativas nos valores de PVA, como observa-se na Figura 17.

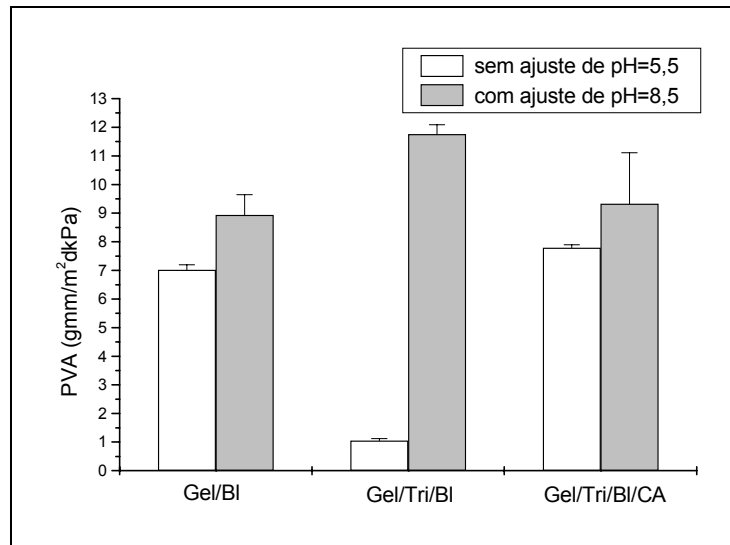


Figura 16. Comportamento da PVA com e sem ajuste de pH nos filmes de gelatina (0g de material hidrofóbico- MH); adicionado de triacetina (1g de MH); blenda de ácidos graxos (2g de MH); triacetina e blenda (3g de MH); triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (3,5g de MH) e a mistura 3:1 Tween 80/SDS na concentração de 160%.

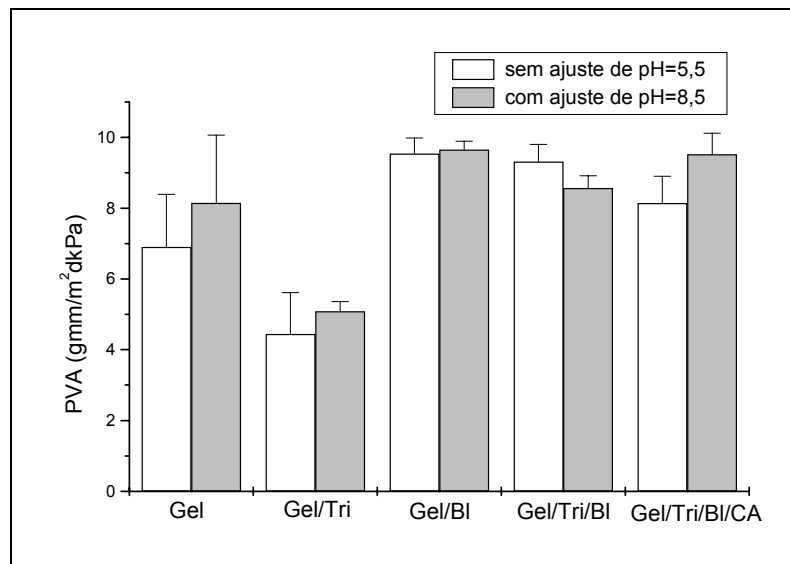


Figura 17. Comportamento da PVA com e sem ajuste de pH nos filmes de gelatina (0g de material hidrofóbico- MH); adicionado de triacetina (1g de MH); blenda de ácidos graxos (2g de MH); triacetina e blenda (3g de MH); triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (3,5g de MH) e a mistura 3:1 Tween 80/SDS na concentração de 120%.

A condição de pH influencia o comportamento do surfactante na solução filmogênica. Nos filmes sem ajuste de pH (pH=5,5) o surfactante age promovendo uma estabilização da emulsão e melhorando assim a distribuição dos glóbulos de lipídios na matriz protéica, diminuindo a PVA. Em pH alcalino a solução filmogênica apresenta-se totalmente ionizada, nestas condições de pH juntamente com a temperatura de secagem 25°C o surfactante poderia estar perdendo sua propriedade de agente emulsificante e isto poderia explicar o aumento da PVA.

Para filmes elaborados sem ajuste de pH (5,5) contendo cera de cana-de-açúcar (Tabela 12), observa-se uma diminuição significativa na PVA com a adição dos surfactantes. Efeito semelhante foi obtido em filmes compostos de metilcelulose e parafina com a adição de glicerol monoestearato (99% pureza) onde a PVA foi de $25,5 \pm 2,7$ para $7,1 \pm 0,3$ g/m²h, taxa de redução de 72% (DEBEAUFORT; QUEZADA-GALLO; VOILLEY, 1995). Esta melhora nos valores de PVA foi atribuída à diminuição do tamanho do diâmetro dos glóbulos de lipídios em consequência desta diminuição sua distribuição ficou mais homogênea na emulsão.

DEBEAUFORT, QUEZADA-GALLO e VOILLEY (1995) observaram que a adição de surfactante (Tween 80) em filmes emulsionados de metilcelulose e parafina não afetou significativamente a taxa de permeação dos filmes sem a adição de surfactante ($25,5 \pm 2,7$ g/m²h) e com a adição de Tween 80 ($22,2 \pm 1,9$ g/m²h).

Na Tabela 13 pode-se observar o efeito dos surfactantes associado ao aumento do pH nos filmes contendo cera de cana-de-açúcar. Os filmes produzidos utilizando-se a mistura (CA (5%)/120MT) apresentaram PVA inferior a PVA do filme sem a adição de surfactantes. As outras duas formulações testadas (75% Tween 80/ 25% de SDS) em concentrações (120 e 160g/100g de gelatina) de surfactantes provocaram aumento da PVA em relação ao filme sem adição de surfactantes em pH=8,5 (Tabela 13). Por outro lado, em filmes a pH=5,5 (Tabela 12) o aumento da quantidade de surfactante (75% Tween 80/ 25% de SDS) provocou redução da PVA.

Tabela 12. Efeito da adição de surfactante na permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina (10%) (sem ajuste de pH, pH=5,5), triacetina (10%), blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) (20%) e cera de cana-de-açúcar (5%).

Filme*	Espessura (mm)	PVA (gmm/m ² dKPa)**
CA (5%)	0,115 ± 0,009	10,34 ± 0,10 ^a
CA (5%)/160S	0,125 ± 0,011	7,79 ± 0,11 ^b
CA (5%)/120S	0,122 ± 0,004	8,14 ± 0,76 ^b

* CA: cera de cana-de-açúcar; 160S: 160% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) com relação à massa seca da gelatina; 120S: 120% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) com relação à massa seca da gelatina. ** Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

Tabela 13. Efeito da adição de surfactante na permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina (10%) (com ajuste de pH, pH=8,5), triacetina (10%), blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) (20%) e cera de cana-de-açúcar (5%).

Filme*	Espessura (mm)	PVA (gmm/m ² dKPa)**
CA (5%)	0,134 ± 0,006	6,85 ± 0,34 ^{b,c}
CA(5%)/160S	0,122 ± 0,010	9,33 ± 1,78 ^a
CA(5%)/120S	0,126 ± 0,016	9,52 ± 0,60 ^a
CA(5%)/120MT	0,122 ± 0,015	4,99 ± 0,05 ^c

*CA: cera de cana-de-açúcar; 160S: 160% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 120S: 120% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 120MT: 120% mistura de surfactantes (onde 50% da mistura Tween 80 e 50% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina. ** Os valores de média e desvio padrão foram obtidos a partir das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

Para os filmes contendo cera de carnaúba (com ajuste de pH=8,5) o efeito da adição dos surfactantes, pode ser visto na Tabela 14. Nos filmes de carnaúba (pH=8,5) a adição das misturas de surfactantes (1:3 Tween 80/ SDS e 1:1 Tween/ SDS), nas concentrações de 80 e 100% não provocaram alteração significativa nos valores de PVA, em relação aos filmes sem a adição de surfactantes. Já a adição de 60% de Tween 80 e de 120% de 1:3 Tween/ SDS provocaram aumento na PVA. Em relação da concentração de misturas de surfactantes, pode-se observar na Figura 18 que o aumento da concentração da mistura de surfactantes provocou aumento da PVA. Este aumento da PVA com a adição de surfactante pode ser explicado pelas condições de secagem da solução filmogênica para formar os filmes (25°C e 40% RH) que poderiam provocar alterações nas propriedades da emulsão favorecendo assim a formação de agregados. As misturas de surfactante podem agir estabilizando a emulsão e assim facilitar a incorporação dos lipídios em uma determinada temperatura fixada pelos gráficos apresentados nas Figuras 7 a 12 (70-90°C) e a secagem em outras condições de temperatura (temperatura=25°C) pode ter agido desestabilizando a mesma. Esta desestabilização parece favorecer a formação de agregados conferindo uma irregularidade e heterogeneidade na distribuição dos glóbulos lipídicos na matriz do filme e aumentando assim a PVA.

Tabela 14. O efeito da adição de surfactante na permeabilidade ao vapor de água dos filmes de gelatina (10%) (com ajuste de pH=8,5), triacetina (10%), blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) (20%) e cera de carnaúba (5%).

Filme*	Espessura (mm)	PVA (gmm/m ² dKPa)**
CR (5%)	0,134 ± 0,007	5,11 ± 0,39 ^b
CR(5%)/60T	0,118 ± 0,010	10,05 ± 0,36 ^a
CR(5%)/100MT	0,128 ± 0,013	5,75 ± 0,15 ^b
CR(5%)/120SDS	0,119 ± 0,009	9,52 ± 0,60 ^a
CR(5%)/80SDS	0,121 ± 0,007	5,13 ± 0,40 ^b

* CR: cera de carnaúba, 60T: 60% de Tween 80 em relação à massa seca da gelatina;. 100MT: 100% mistura de surfactantes (onde 50% da mistura Tween 80 e 50% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 120SDS: 120% mistura de surfactantes (onde 25% da mistura Tween 80 e 75% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 80SDS: 80% mistura de surfactantes (onde 25% da mistura Tween 80 e 75% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina. **Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

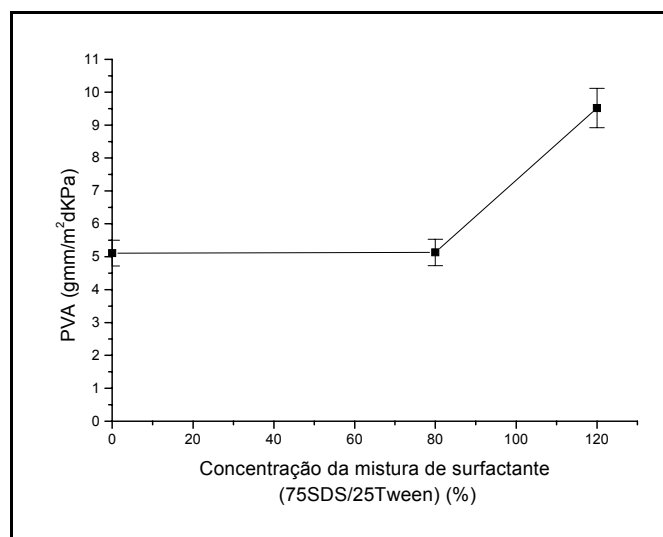


Figura 18. Efeito do aumento da concentração da mistura surfactantes nos filmes de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos e cera de carnaúba com pH ajustado 8,5 na permeabilidade ao vapor de água (PVA).

Foi realizado outro estudo da adição de surfactante de forma mais específica, observando-se sua interação com cada componente do filme separadamente e sua influência na PVA, como mostrado nas Tabelas 15 a 19. Na Tabela 15 para os filmes sem ajuste de pH (5,5) adicionados da mistura de surfactantes (3:1 Tween 80/SDS, na concentração de 160% em relação à massa seca da gelatina) foi observado uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da PVA em relação aos filmes sem a adição de surfactantes. Nesta comparação a taxa de redução apresentou-se mais significativa para o filme emulsionado de gelatina contendo blenda de ácido esteárico-palmitico e triacetina (92%) e a menos significativa para o filme composto de gelatina, triacetina, blenda de ácido esteárico-palmitico e cera de cana-de-açúcar (redução de 25%), observados na Tabela 15. Este mesmo comportamento foi observado reduzindo-se a concentração da mistura de surfactante de 160% para 120% em relação à massa seca da gelatina nos filmes sem ajuste de pH (5,5) (Tabela 16), onde as taxas de redução foram menores nesta concentração em comparação a mistura de surfactante contendo 160% (Tabela 15 e 16). RHIM et al. (2002a) verificaram resultados semelhantes com a adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) nos filmes a base de isolado protéico de soja onde a PVA foi reduzida de $10,1 \pm 0,5$ (filmes com 0% de surfactante) para $5,6 \pm 0,4$ gmm/m²hKPa (filmes com 40% de SDS) com uma taxa de redução de 56%.

Tabela 15. Efeito da adição dos surfactantes (3:1 Tween 80/ SDS, na concentração de 160% em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (sem ajuste de pH=5,5); adicionados triacetina; blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); triacetina e blenda; triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (5%) na permeabilidade de vapor de água (PVA).

Filmes*	Espessura (mm)	PVA (gmm/m ² dKPa)**
Gel	0,110 ± 0,008	11,59 ± 0,23 ^a
Gel/160S	0,111 ± 0,021	7,17 ± 0,32 ^b
Gel/ Tri	0,115 ± 0,012	12,62 ± 0,29 ^a
Gel/Tri/160S	0,116 ± 0,015	1,99 ± 1,19 ^b
Gel/BI	0,111 ± 0,011	11,75 ± 0,15 ^a
Gel/BI/160S	0,127 ± 0,011	7,02 ± 0,18 ^b
Gel/Tri/BI	0,117 ± 0,009	13,34 ± 0,48 ^a
Gel/Tri/BI/160S	0,120 ± 0,008	1,05 ± 0,07 ^b
Gel/Tri/BI/CA (5%)	0,115 ± 0,009	10,34 ± 0,10 ^a
Gel/Tri/BI/CA (5%)/160S	0,125 ± 0,011	7,79 ± 0,11 ^b

* Gel: gelatina; Tri: triacetina; BI: blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); CA: cera de cana-de-açúcar; 160S: 160% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; ** Média desvio das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

Tabela 16. Efeito da adição dos surfactantes (3:1 Tween 80/ SDS, na concentração de 120% em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (sem ajuste de pH=5,5); adicionados triacetina; blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); triacetina e blenda; triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (5%) na permeabilidade de vapor de água (PVA).

Filmes*	Espessura (mm)	PVA (gmm/m ² dKPa)**
Gel	0,110 ± 0,008	11,59 ± 0,23 ^a
Gel/120S	0,122 ± 0,007	6,90 ± 1,49 ^b
Gel/ Tri	0,115 ± 0,012	12,62 ± 0,29 ^a
Gel/Tri/120S	0,113 ± 0,014	4,44 ± 1,17 ^b
Gel/BI	0,111 ± 0,011	11,75 ± 0,15 ^a
Gel/BI/120S	0,118 ± 0,009	9,54 ± 0,44 ^b
Gel/Tri/BI	0,117 ± 0,009	13,34 ± 0,48 ^a
Gel/Tri/BL/120S	0,120 ± 0,013	9,31 ± 0,49 ^b
Gel/Tri/BI/CA (5%)	0,115 ± 0,009	10,34 ± 0,10 ^a
Gel/Tri/BI/CA (5%)/120S	0,122 ± 0,004	8,14 ± 0,76 ^b

* Gel: gelatina; CA: cera de cana-de-açúcar; Tri: triacetina; BI: blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); 120S: 120% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; ** Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

Nos filmes sem ajuste de pH a adição da mistura de surfactante foi efetiva na diminuição da PVA. Enquanto o aumento do pH apresentou efeito contrário como mostrado nas Tabelas 17 a 19.

A adição da mistura de surfactantes (3:1 Tween 80/ SDS, na concentração de 160g/100g de gelatina) nos filmes emulsionados com ajuste de pH provocou um aumento na PVA, em relação aos filmes sem a adição de surfactante, como mostrado na Tabela 17. Diminuindo-se a concentração da mistura de surfactante (3:1 Tween 80/SDS) de 160% para 120% verificou-se o mesmo comportamento da PVA dos filmes (contendo de 2 a 3,5g de material hidrofóbico) com relação aos

filmes contendo 160% da mistura (Tabela 18). Nesta concentração todas as formulações foram selecionadas pelo aspecto visual desde o filme simples de gelatina até os filmes compostos contendo cera de cana-de-açúcar, como mostrado nas Tabelas 17 e 18. Nos filmes simples de gelatina e nos filmes compostos de gelatina e triacetina a adição de 120% da mistura de surfactante reduziu a PVA em relação aos filmes sem a adição da mistura de surfactantes (Tabela 18).

Tabela 17. Efeito da adição dos surfactantes (3:1 Tween 80/ SDS, na concentração de 160% em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (com ajuste de pH=8,5); adicionados triacetina; blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); triacetina e blenda; triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (5%).

Filmes *	Espessura (mm)	PVA (gmm/m ² dKPa)**
Gel/BI	0,127 ± 0,008	3,46 ± 0,37 ^b
Gel/BI/160S	0,133 ± 0,001	8,94 ± 0,71 ^a
Gel/Tri/BI	0,135 ± 0,005	4,42 ± 0,20 ^b
Gel/Tri/BL/160S	0,128 ± 0,008	11,76 ± 0,33 ^a
Gel/Tri/BI/CA (5%)	0,134 ± 0,006	6,85 ± 0,34 ^b
Gel/Tri/BI/CA (5%)/160S	0,122 ± 0,010	9,33 ± 1,78 ^a

* * Gel: gelatina; CA: cera de cana-de-açúcar; Tri: triacetina; BI: blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); 160S: 160% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; ** Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p < 0,05) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

Tabela 18. Efeito da adição dos surfactantes (3:1 Tween 80/ SDS, na concentração de 120% em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (com ajuste de pH=8,5); adicionados triacetina; blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); triacetina e blenda; triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (5%) na permeabilidade de vapor de água (PVA).

Filmes*	Espessura (mm)	PVA (gmm/m ² dKPa)**
Gel	0,131 ± 0,004	14,87 ± 0,92 ^a
Gel/120S	0,124 ± 0,019	8,15 ± 1,91 ^b
Gel/ Tri	0,131 ± 0,009	11,60 ± 0,34 ^a
Gel/Tri/120S	0,138 ± 0,003	5,08 ± 0,28 ^b
Gel/BI	0,127 ± 0,008	3,46 ± 0,37 ^b
Gel/BI/120S	0,138 ± 0,002	9,65 ± 0,24 ^a
Gel/Tri/BI	0,135 ± 0,005	4,42 ± 0,20 ^b
Gel/Tri/BI/120S	0,134 ± 0,009	8,57 ± 0,34 ^a
Gel/Tri/BI/CA (5%)	0,134 ± 0,006	6,85 ± 0,34 ^b
Gel/Tri/BI/CA(5%)/120S	0,126 ± 0,016	9,52 ± 0,60 ^a

* Gel: gelatina; CA: cera de cana-de-açúcar; Tri: triacetina; BI: blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); 120S: 120% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; ** Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

Nos filmes (pH=8,5) adicionados de 60g de Tween 80/100g de gelatina verificou-se um comportamento diferenciado em relação às outras misturas estudadas. O Tween 80 interagiu de forma específica com cada componente do filme, conforme pode ser observado na Tabela 19, onde verifica-se que a adição do Tween 80 no filme (pH=8,5) simples de gelatina promoveu uma redução de 20% na PVA em relação ao filme sem a adição de surfactante. Já para o filme composto de gelatina e triacetina (pH=8,5) a adição do Tween 80 não provocou alteração significativa no valor da PVA. Para os filmes contendo blenda, triacetina

e cera de carnaúba (pH=8,5) a adição de Tween 80 produziu uma elevação nos valores da PVA em relação aos filmes sem a adição deste surfactante.

Avaliando-se de forma geral os resultados com a adição de surfactantes (podendo estar presente na forma de mistura ou puro) nos filmes emulsionados com pH natural (5,5), observou-se que a mistura de surfactante (3: 1 Tween 80/ SDS) foi mais eficiente na incorporação do material hidrofóbico propiciando assim uma redução da PVA.

Tabela 19. Efeito da adição dos surfactantes (60% de Tween 80 em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (com ajuste de pH=8,5); adicionados triacetina; blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); triacetina e blenda; triacetina, blenda e cera de carnaúba (5%) na permeabilidade de vapor de água (PVA).

Filmes*	Espessura (mm)	PVA (gmm/m ² dKPa)**
Gel	0,131 ± 0,004	14,87 ± 0,92 ^a
Gel/60S	0,129 ± 0,012	11,97 ± 0,42 ^b
Gel/ Tri	0,131 ± 0,009	11,60 ± 0,34 ^a
Gel/Tri/60S	0,132 ± 0,004	11,89 ± 1,02 ^a
Gel/BI	0,127 ± 0,008	3,46 ± 0,37 ^b
Gel/BI/60S	0,127 ± 0,003	6,09 ± 0,12 ^a
Gel/Tri/BI	0,135 ± 0,005	4,42 ± 0,20 ^b
Gel/Tri/BI/60S	0,137 ± 0,004	11,64 ± 0,77 ^a
Gel/Tri/BI/CR (5%)	0,134 ± 0,007	5,11 ± 0,39 ^b
Gel/Tri/BI/CR(5%)/60S	0,118 ± 0,010	10,05 ± 0,36 ^a

* Gel: gelatina; CR: cera de carnaúba; Tri: triacetina; BI: blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); 60S: 60% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; ** Média desvio das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p < 0,05) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

4.3 Propriedades mecânicas

Para os filmes simples de gelatina (5,5) adicionando a triacetina e a blenda (separadamente ou combinados) a TR diminuiu significativamente. Para os filmes contendo triacetina e a a blenda observa-se aumento significativo na elongação em relação ao filme simples que não apresentaram diferenças significativas entre si para este parâmetro (Tabela 20). Analisando-se os filmes de gelatina em pH básico (pH=8,5) a adição de triacetina provocou um aumento na tensão na ruptura (TR) e na elongação, já a adição de blenda e blenda e triacetina nesta condição de pH provocaram a diminuição da TR e a elongação aumentou significativamente para os filmes contendo triacetina e blenda, enquanto para os filmes contendo somente a blenda a porcentagem de elongação não se alterou significativamente (Tabela 21). O ajuste de pH para os filmes de gelatina reduziu a TR em 19%, em relação aos filmes sem ajuste de pH. Nos filmes contendo blenda o ajuste de pH aumentou a TR em 15% e nos filmes adicionados de triacetina; triacetina e blenda o valor de TR não se alterou significativamente, em relação aos filmes sem ajuste de pH (Tabelas 20 e 21). Observando a elongação o ajuste de pH afetou apenas os filmes contendo blenda e triacetina reduzindo a elongação em relação aos filmes sem ajuste de pH, os demais filmes não sofreram alterações significativas na elongação.

Observa-se nas Tabelas 20 e 21 que a adição das ceras (carnaúba ou de cana-de-açúcar) em filmes com e sem ajuste de pH provocaram uma redução na tensão na ruptura (TR) em relação aos filmes de gelatina e que o aumento da concentração das ceras (carnaúba ou de cana-de-açúcar) de 2,5% para 10% provocou diminuição na TR nos filmes com e sem ajuste de pH. Efeito similar foi relatado por PEREZ-GAGO e KROCHTA (2001) em filmes emulsionados de proteína do soro do leite e cera de abelha onde o aumento do conteúdo de cera de abelha de 20% para 60% reduziu a tensão na ruptura, devido a um aumento na imobilização da proteína na interface da partícula da cera de abelha e à redução do tamanho de partícula. Contrariamente TALENS e KROCHTA (2005) em filmes emulsionados de proteína do soro e cera de carnaúba observaram um aumento da

tensão na ruptura com o aumento do conteúdo de cera, onde os filmes compostos contendo cera de carnaúba apresentaram valor superior à tensão na ruptura para as concentrações de 1% de cera ($3,1 \pm 0,1$ MPa) para 1,5% de cera (RT $4,8 \pm 1,0$ MPa).

Tabela 20. Resistência mecânica dos filmes de filmes de gelatina (10%) (sem ajuste de pH, pH=5,5); triacetina (10%), blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico) (20%) e cera de cana-de-açúcar (0; 2,5; 5; 7,5; 10%).

Filmes	Tensão na ruptura (MPa)*	Elongação (%)*
Gel	$117,07 \pm 0,35^a$	$5,51 \pm 0,24^c$
Gel/Tri	$111,57 \pm 1,66^b$	$5,98 \pm 0,36^c$
Gel/BI	$61,87 \pm 0,92^{c,d}$	$6,78 \pm 0,48^c$
Gel/Tri/BI	$62,02 \pm 0,78^c$	$11,52 \pm 0,55^{a,b}$
Gel/Tri/BI/CA (2,5%)	$57,02 \pm 0,34^e$	$5,67 \pm 0,06^b$
Gel/Tri/BI/CA (5%)	$53,05 \pm 1,06^f$	$7,72 \pm 1,38^c$
Gel/Tri/BI/CA (7,5%)	$50,03 \pm 1,09^g$	$12,75 \pm 1,55^a$
Gel/Tri/BI/CA (10%)	$49,83 \pm 1,04^g$	$12,84 \pm 0,44^a$
Gel/Tri/BI/CR (2,5%)	$59,60 \pm 1,24^{d,e}$	$6,35 \pm 0,84^c$
Gel/Tri/BI/CR (5%)	$52,44 \pm 1,17^{f,g}$	$6,55 \pm 0,57^c$
Gel/Tri/BI/CR (7,5%)	$50,99 \pm 0,74^g$	$6,62 \pm 0,19^c$
Gel/Tri/BI/CR (10%)	$50,92 \pm 0,48^g$	$9,37 \pm 1,72^b$

*Gel: gelatina; Tri: triacetina; BI: blenda de ácido graxo (esteárico-palmitico); CA: cera de cana-de-açúcar; CR: cera de carnaúba. **Os valores de média e desvio padrão foram obtidos a partir das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

YANG e PAULSON (2000a) observaram que a adição de blenda de ácido esteárico-palmitico ou cera de abelha em filmes compostos de gelatina diminuiu a TR proporcionalmente ao aumento da concentração das substâncias lipídicas. De acordo com os autores tal resultado pode estar relacionado com uma substituição parcial dos polímeros pelos lipídios na matriz filmogênica, onde a interação

lipídios-lipídios (moléculas apolares) e lipídios-proteínas apresentaram menor energia que a ligação proteína-proteína influenciando, portanto, as propriedades mecânicas.

Tabela 21. Resistência mecânica dos filmes de filmes de gelatina (10%) (com ajuste de pH, pH=8,5); triacetina (10%), blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico) (20%) e cera de cana-de-açúcar (0; 2,5; 5; 7,5; 10%).

Filmes	Tensão na ruptura (MPa)*	Elongação (%)*
Gel	95,25 ± 0,99 ^b	4,82 ± 0,48 ^d
Gel/Tri	102,56 ± 0,36 ^a	6,12 ± 0,14 ^{c,d}
Gel/BI	72,68 ± 0,51 ^c	5,00 ± 0,63 ^d
Gel/Tri/BI	65,16 ± 0,62 ^d	6,67 ± 1,06 ^c
Gel/Tri/BI/CA (2,5%)	51,98 ± 0,92 ^c	8,18 ± 0,80 ^{b,c}
Gel/Tri/BI/CA (5%)	45,63 ± 0,87 ^e	9,39 ± 0,60 ^b
Gel/Tri/BI/CA (7,5%)	45,36 ± 0,77 ^e	12,93 ± 0,57 ^a
Gel/Tri/BI/CA (10%)	49,58 ± 1,35 ^{c,d}	9,95 ± 0,74 ^b
Gel/Tri/BI/CR (2,5%)	50,55 ± 0,33 ^c	7,43 ± 0,76 ^c
Gel/Tri/BI/CR (5%)	49,11 ± 1,06 ^{c,d}	9,34 ± 0,14 ^b
Gel/Tri/BI/CR (7,5%)	52,66 ± 1,11 ^c	8,28 ± 0,92 ^{b,c}
Gel/Tri/BI/CR (10%)	48,32 ± 0,13 ^d	8,05 ± 0,38 ^{b,c}

*Gel: gelatina; Tri: triacetina; BI: blenda de ácido graxo (esteárico-palmitico); CA: cera de cana-de-açúcar; CR: cera de carnaúba. **Os valores de média e desvio padrão foram obtidos a partir das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

Estes resultados da TR confirmam que a fase protéica apresenta maior tensão na ruptura que a fase lipídica, e o aumento da concentração da fase lipídica provocou a redução da tensão na ruptura da fase protéica. Isto pode ser explicado pela redução das interações intermoleculares entre as cadeias adjacentes na solução filmogênica, com a adição dos componentes hidrofóbicos reduzindo assim a TR. Segundo CALLEGARIN et al. (1997), as propriedades

mecânicas dos filmes dependem das interações entre os componentes, ou seja, da formação de ligações moleculares fortes ou numerosas entre as cadeias.

A adição crescente de componentes lipídicos provocaram modificações na matriz polimérica resultando na diminuição da tensão na ruptura do filme, conforme verificado por CHEN (1995). Esse efeito parece ter sido resultado da substituição parcial dos polímeros por lipídios na matriz do filme, assim como o ocorrido em filmes compostos de gelatina e lipídios (YANG; PAULSON, 2000a).

A adição de cera (carnaúba ou cana-de-açúcar) nos filmes emulsionados com e sem ajuste de pH, provocaram um aumento da elongação (Tabelas 20 e 21). A elongação dos filmes a base de gelatina contendo cera (de carnaúba ou de cana-de-açúcar) com e sem ajuste de pH não apresentou uma resposta linear e proporcional com o aumento do conteúdo de cera, apresentando um máximo da elongação em 7,5% de cera de cana. O aumento da elongação foi mais pronunciado para os filmes contendo cera de cana-de-açúcar do que para os filmes contendo cera de carnaúba, como pode ser observado nas Tabelas 20 e 21.

Com a adição das ceras (de carnaúba ou cana-de-açúcar) em ambas as condições de pH (5,5 ou 8,5), diminuiu a TR em relação aos filmes de Gel, Tri, e Bl de maneira significativa, ficando mais sensível a ruptura (Tabelas 20 e 21). A taxa de redução da RT foi maior para filmes contendo cera (cana ou carnaúba) na concentração de 5% e 7,5% em pH alcalino (8,5) com 52% de redução em relação aos filmes de gelatina e de 56% para os filmes com pH=5,5. Os filmes com ajuste de pH (8,5) contendo cera (cana ou carnaúba) aumentou a elongação em 28%, com relação aos filmes de gelatina (Tabelas 20 e 21). Nos filmes contendo cera de cana em pH ácido (5,5) também ocorreu aumento de 28% na elongação em relação aos filmes de gelatina, já para os filmes contendo cera de carnaúba o aumento da elongação foi de 16%.

SHELLHAMMER E KROCHTA (1997) observaram um aumento na elongação dos filmes de proteína do soro do leite com o aumento da concentração de lipídios devido o efeito plastificante do lipídio; este mesmo comportamento foi também verificado por FAKHOURI (2002), YANG; PAULSON (2000a), BATISTA (2004), BERTAN (2003) entre outros. Por outro lado, PEROVAL et al. 2002

observaram uma diminuição da alongação ao incorporar ácidos graxos aos filmes de arabinoxilana, devido ao fato de que alguns lipídios parecem ser incapazes de formar uma matriz contínua e coesa, causando assim menor alongação.

Esse duplo efeito devido à adição de lipídios nos filmes hidrofílicos já foi anteriormente relatado na literatura por YANG; PAULSON (2000a) que observaram a redução da tensão na ruptura e da alongação com o aumento da concentração da blenda de esteárico-palmítico nos filmes de gelana. Contrariamente, BERTAN (2003) observou que o aumento da concentração de breu nos filmes à base de gelatina provocou diminuição da tensão na ruptura e a alongação aumentou e o mesmo comportamento também foi observado com a adição do ácido láurico.

Analisando as Tabelas 20 e 21, pode-se verificar que a adição crescente de cera (de carnaúba ou de cana-de-açúcar) nos filmes elaborados com ajuste de pH provocou uma redução da TR, comparando com os filmes sem ajuste de pH. A taxa de redução da TR com o ajuste de pH, foi maior para os filmes contendo cera de cana-de-açúcar (5%) cerca de 14%, já para os filmes com cera de carnaúba (5%) foi em torno de 6%, em relação aos filmes sem ajuste de pH. Além disso, os filmes contendo cera de carnaúba com e sem ajuste de pH apresentaram maiores valores de TR se comparados com filmes contendo cera de cana-de-açúcar.

Os filmes emulsionados sem ajuste de pH (pH=5,5) contendo cera de cana-de-açúcar (Tabela 20), foram mais resistentes (tensão na ruptura superior) do que nos filmes em pH=8,5 (Tabela 21). O mesmo efeito foi observado para os filmes contendo cera de carnaúba (Tabelas 20 e 21), exceto para a concentração de cera de 7,5% onde não foi observada diferença significativa. Este mesmo comportamento foi verificado por YOSHIDA; ANTUNES (2004) onde o aumento do pH de 7,0 para 9,0 reduziu a TR dos filmes emulsionados a base de proteína do soro do leite, pois o pH alcalino deixou os filmes mais frágeis devido à heterogeneidade da distribuição dos glóbulos de lipídios.

Observando-se o parâmetro alongação nas Tabelas 20 e 21 pode-se verificar que o ajuste de pH (8,5) aumentou a flexibilidade dos filmes emulsionados de cera (de carnaúba ou de cana-de-açúcar) nas concentrações de 2,5% até

7,5%, em relação aos filmes sem ajuste de pH. Aumentando-se a concentração da cera (cana ou de carnaúba) para 10% verifica-se que o ajuste de pH (8,5) provocou diminuição da alongação em relação aos filmes com pH=5,5. O aumento da percentagem de alongação é caracterizado pelo efeito plastificante que alguns lipídios apresentam quando adicionados aos filmes poliméricos utilizados para aumentar a flexibilidade; estes plastificantes enfraquecem as forças intermoleculares entre as cadeias poliméricas adjacentes, desta forma influenciando as propriedades mecânicas (CALLEGARIN et al., 1997).

As propriedades mecânicas dos filmes estão intimamente relacionadas com as condições da emulsão filmogênica, a distribuição e tamanho dos glóbulos de lipídios afetam a rede polimérica, afetando assim a RT e a alongação dos filmes protéicos. O pH ácido (5,5) da solução filmogênica dificultou a incorporação da cera na matriz da gelatina sendo evidenciado pelos baixos valores de alongação com relação aos filmes com ajuste de pH (8,5), mas em contraposição o meio ácido favoreceu a formação de filme mais fortes por apresentarem altos valores de TR em relação aos filmes com pH=8,5. Em filmes emulsionados de proteína do soro do leite com a adição de ácido esteárico a elasticidade diminuiu com a perda da integridade estrutural da matriz (YOSHIDA; ANTUNES, 2004).

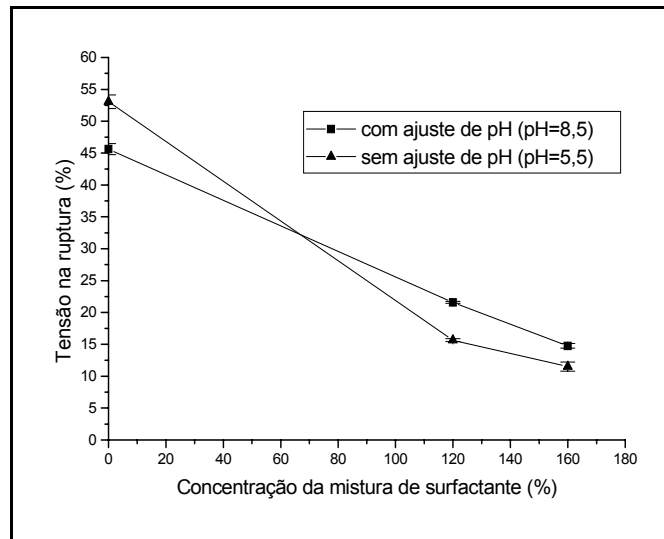


Figura 19. Efeito do aumento da concentração da mistura de surfactantes (3:1 Tween 80/SDS) nos filmes de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos e cera de cana-de-açúcar em duas condições de pHs (com ajuste=8,5 e sem ajuste= 5,5) sobre a tensão na ruptura.

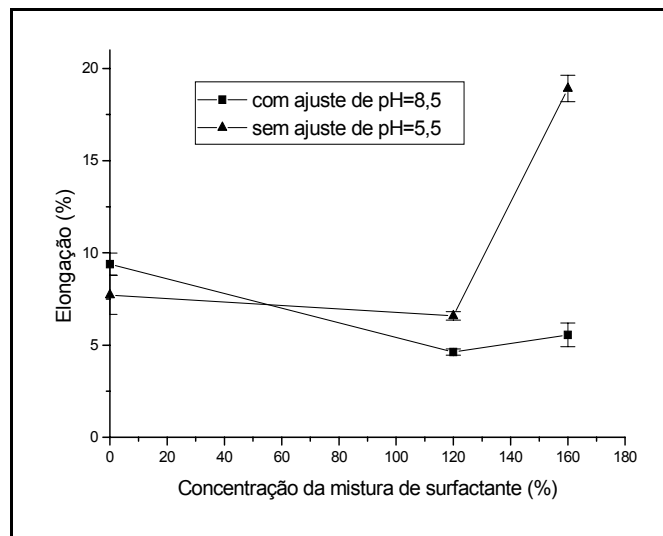


Figura 20. Efeito do aumento da concentração da mistura de surfactantes (3:1 Tween 80/SDS) nos filmes de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos e cera de cana-de-açúcar em duas condições de pHs (com ajuste=8,5 e sem ajuste= 5,5) sobre a elongação.

A TR apresentou um comportamento decrescente com o aumento da concentração da mistura de surfactante (3:1 Tween 80/SDS) tanto para os filmes com ajuste de pH como para os filmes sem ajuste de pH, como mostrado na Figura 19. No entanto a adição da mistura de surfactante nos filmes com ajuste de pH provocou aumentos superiores da TR em relação aos filmes com pH=5,5, provavelmente o ajuste de pH dos filmes contendo esta mistura de surfactante melhorou a distribuição dos glóbulos de lipídios aumentando a coesividade da matriz polimérica.

Na Figura 20 observa-se que o ajuste de pH nos filmes contendo a mistura de surfactante (3:1 Tween 80/SDS) promoveu uma redução na elongação em relação aos filmes sem ajuste de pH. O pH ácido melhorou a elasticidade do filme atingindo um máximo na concentração 160% da mistura de surfactante. Verificou-se que para os filmes contendo a mistura de surfactante, o pH alcalino tornou os filmes mais resistentes a ruptura, porém menos flexíveis, o contrário sendo observado em pH ácido.

Os filmes contendo a mistura de surfactantes (3:1 Tween 80/ SDS) na concentração de 160% foram elaborados com cada componente do filme, para avaliar o grau de interação do surfactante com cada componente individualmente. Os filmes de gelatina e de gelatina e triacetina contendo esta mistura de surfactante na concentração de 160% elaborados em pH alcalino apresentaram alguns problemas com relação a seu aspecto visual (oleosos, manchados e frágeis), portanto foram descartados.

Na Figura 21 verificou-se que o ajuste de pH não provocou alterações nos parâmetros de TR nos filmes de gelatina adicionados de blenda de ácido esteárico-palmitico e de blenda e triacetina ambos contendo a mistura de surfactante (3:1 Tween 80/ SDS) na concentração de 160% . Já nos filmes adicionados de blenda, triacetina e cera de cana-de-açúcar contendo a mistura de surfactante (3:1 Tween 80/ SDS) na concentração de 160%, o ajuste de pH provocou aumento nos valores de TR, em relação aos filmes sem ajuste de pH. Analisando-se a elongação (Figura 22) destes mesmos filmes descritos acima o

ajuste de pH provocou alterações significativas diminuindo a alongação em relação aos mesmos filmes sem ajuste de pH.

Analisando-se os dados de TR na Figura 23 cada componente do filme interage com a mistura de surfactante (3:1 Tween 80/ SDS) na concentração de 120% de forma específica. Para os filmes simples de gelatina e os filmes complexos contendo blenda de ácido esteárico-palmítico, triacetina e cera de cana-de-açúcar a adição da mistura de surfactante (concentração de 120%) com o ajuste de pH aumentou os valores de TR em relação aos filmes sem ajuste de pH. Analisando-se os outros componentes dos filmes separadamente como a triacetina e a blenda de ácido esteárico-palmítico a adição da mistura de surfactante em pH alcalino provocou redução da TR, já para os filmes compostos contendo além da mistura de surfactante a triacetina e a blenda o ajuste de pH não alterou significativamente os valores de TR.

Avaliando-se a alongação dos filmes simples de gelatina e dos filmes compostos de gelatina adicionada de triacetina contendo a mistura de surfactante (3:1 Tween 80/ SDS) na concentração de 120% (Figura 24), observou-se que o pH alcalino alterou drasticamente a alongação destes filmes, onde para os filmes simples de gelatina o ajuste de pH (8,5) reduziu a alongação, contrariamente ao observado nos filmes contendo a triacetina onde pH alcalino provocou aumento na percentagem de alongação. Os demais filmes não apresentaram alterações significativas na alongação com o ajuste de pH.

Tanto a composição quanto a condição de pH da solução filmogênica provocam mudanças significativas na forma de ação do surfactante. O pH alcalino da solução filmogênica em determinadas condições parece melhorar às propriedades mecânicas de uma dada formulação, onde o surfactante age estabilizando a emulsão da solução filmogênica e melhorando assim a incorporação dos materiais hidrofóbicos.

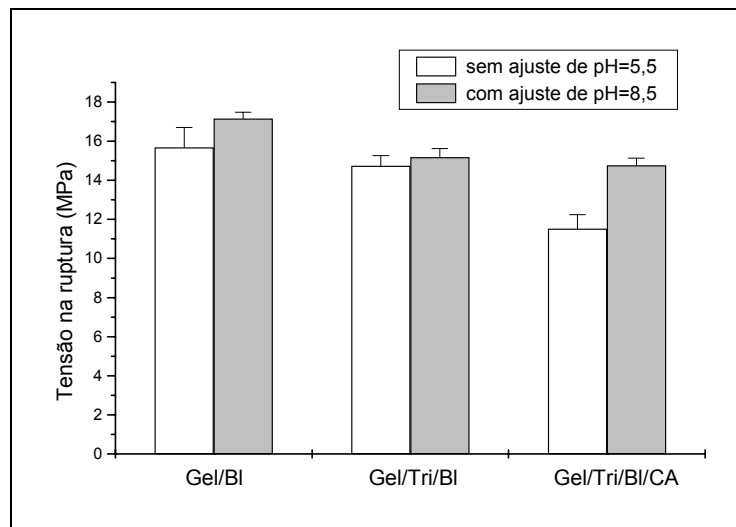


Figura 21. RT dos filmes de gelatina com e sem ajuste de pH (0g de material hidrofóbico- MH); adicionado de triacetina (1g de MH); blenda de ácidos graxos (2g de MH); triacetina e blenda (3g de MH); triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (3,5g de MH) e a mistura 3:1 Tween 80/SDS na concentração de 160%.

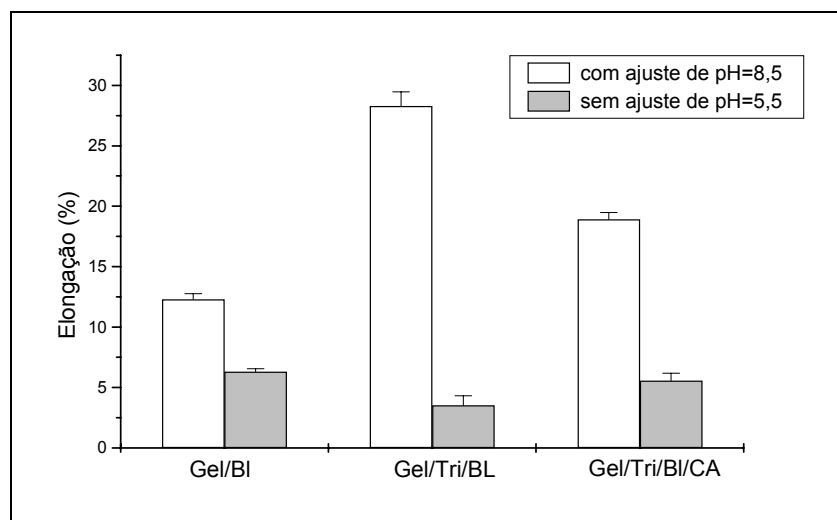


Figura 22. Elongação com e sem ajuste de pH dos filmes de gelatina (0g de material hidrofóbico- MH); adicionado de triacetina (1g de MH); blenda de ácidos graxos (2g de MH); triacetina e blenda (3g de MH); triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (3,5g de MH) e a mistura 3:1 Tween 80/SDS na concentração de 160%.

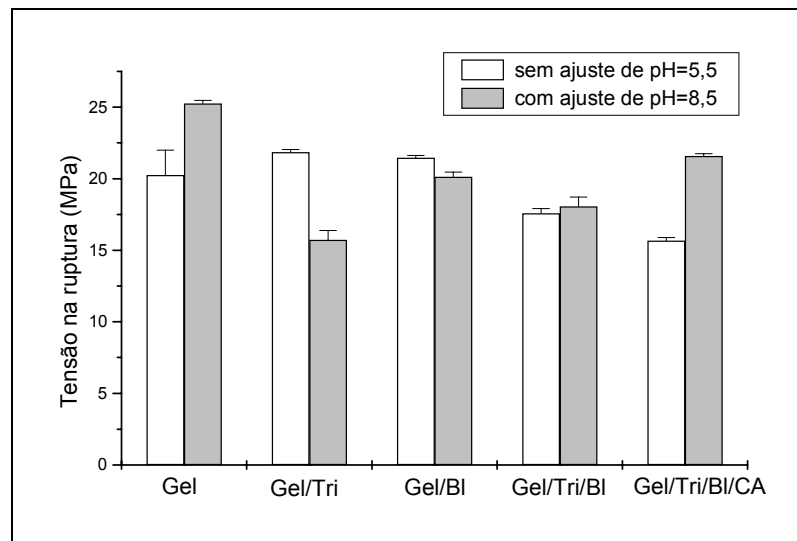


Figura 23. TR dos filmes de gelatina com e sem ajuste de pH (0g de material hidrofóbico- MH); adicionado de triacetina (1g de MH); blenda de ácidos graxos (2g de MH); triacetina e blenda (3g de MH); triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (3,5g de MH) e a mistura 3:1 Tween 80/SDS na concentração de 120%.

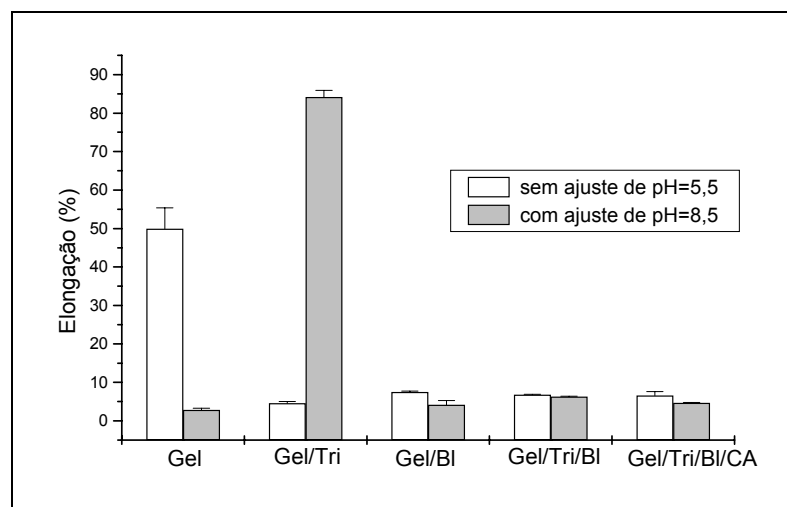


Figura 24. Elongação dos filmes de gelatina com e sem ajuste de pH (0g de material hidrofóbico- MH); adicionado de triacetina (1g de MH); blenda de ácidos graxos (2g de MH); triacetina e blenda (3g de MH); triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (3,5g de MH) e a mistura 3:1 Tween 80/SDS na concentração de 120%.

Nas Tabelas 22 a 24 pode-se observar o efeito da adição das misturas de surfactantes nas propriedades mecânicas dos filmes com e sem ajuste de pH, respectivamente. Os filmes ficaram mais frágeis e com uma estrutura irregular com a adição das misturas de surfactantes apresentando menores valores de TR em relação aos filmes sem a adição da mistura de surfactantes tanto em pH alcalino como ácido. Nas Tabelas 22 e 23 observou-se que a adição da mistura de surfactante (3:1 Tween 80/ SDS) aos filmes compostos de gelatina, triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar provocou redução da TR com o aumento da concentração da mistura de surfactantes, nos dois tratamentos de pH. Este mesmo comportamento foi verificado para os filmes compostos contendo cera de carnaúba adicionados da mistura de surfactantes (Tabela 24).

Tabela 22. Efeito da adição de surfactante nas propriedades mecânicas (tensão na ruptura e alongação) dos filmes de gelatina (10%) (sem ajuste de pH=5,5), triacetina (10%), blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) (20%) e cera de cana-de-açúcar (5%).

Filme*	Tensão na ruptura (MPa)**	Elongação (%)**
CA (5%)	53,05 ± 1,06 ^a	7,72 ± 1,38 ^b
CA(5%)/120S	15,67 ± 0,23 ^b	6,58 ± 1,03 ^b
CA(5%)/160S	11,52 ± 0,72 ^c	18,91 ± 0,57 ^a

*CA: cera de cana-de-açúcar; 120S: 120% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 160S: 160% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina. ** Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

Tabela 23. Efeito da adição de surfactante nas propriedades mecânicas (tensão na ruptura e alongação) dos filmes de gelatina (10%) (com ajuste de pH, pH=8,5), triacetina (10% com relação à massa seca da gelatina), blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) (20%) e cera de cana-de-açúcar (5%).

Filme*	Tensão na ruptura (MPa)**	Elongação (%)**
CA (5%)	45,63 ± 0,87 ^a	9,39 ± 0,60 ^a
CA(5%)/120S	21,58 ± 0,15 ^b	4,62 ± 0,17 ^b
CA/120MT	14,86 ± 0,64 ^c	2,85 ± 0,22 ^c
CA(5%)/160S	14,77 ± 0,36 ^c	5,55 ± 0,64 ^b

*CA: cera de cana-de-açúcar; 120S: 120% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS); 120MT: 120% mistura de surfactantes (onde 50% da mistura Tween 80 e 50% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 160S: 160% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina. ** Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

Os resultados de alongação podem ser verificados nas Tabelas 22 e 23. A adição da mistura de (3:1 Tween 80/ SDS) nos filmes compostos de cera de cana-de-açúcar com pH=8,5 reduziu a alongação em torno de 40% em relação ao filme sem a adição do surfactante (Tabela 23), já para o mesmo filme a adição da mistura de surfactante em pH=5,5 apresentou efeito contrário aumentando a alongação em 60% (Tabela 22). Ao se adicionar a mistura de surfactante (3:1 SDS/Tween 80 ou 1:1 Tween 80/SDS ou Tween 80) nos filmes compostos de cera de carnaúba em pH=8,5 ocorreu uma redução acentuada da alongação na faixa de 50 a 70% dependendo da mistura de surfactante adicionado (Tabela 24).

Nas Figuras 25 e 26 pode-se observar uma diminuição acentuada nos parâmetros de TR e alongação, respectivamente com o aumento da concentração da mistura de surfactante (3:1 SDS/Tween80) nos filmes contendo cera de carnaúba (pH=8,5). Para os filmes contendo cera de carnaúba a adição das diversas misturas analisadas só foram produzidos em condições de pH alcalino, pois em pH ácido os filmes foram descartados pelas sua aparência (manchados e quebradiços). A mistura de surfactante foi testada nos filmes compostos de cera

de cana-de-açúcar não foram selecionados para os filmes compostos de cera de carnaúba e vice-versa, por apresentarem manchas, rachaduras e aspecto oleoso e assim foram descartados pelo aspecto visual, como pode ser observado na Tabela 4. Devido este problema a comparação ficou restrita a duas ceras em relação à adição da mistura de surfactante.

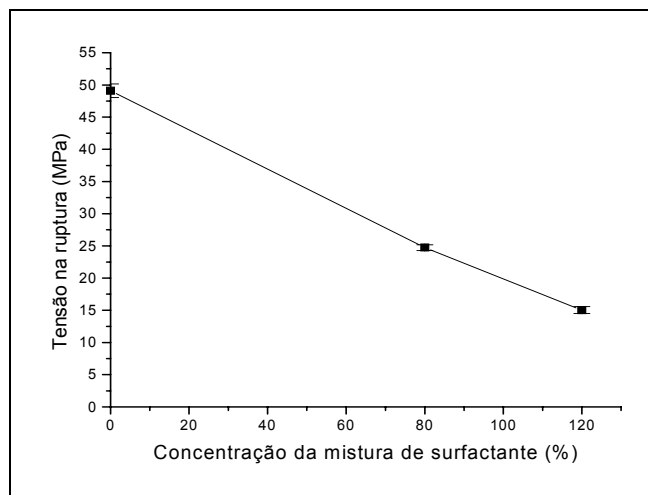


Figura 25. Efeito do aumento da concentração da mistura surfactantes (1:3 Tween 80/SDS) nos filmes de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos e cera de carnaúba com pH ajustado=8,5 e tensão na ruptura.

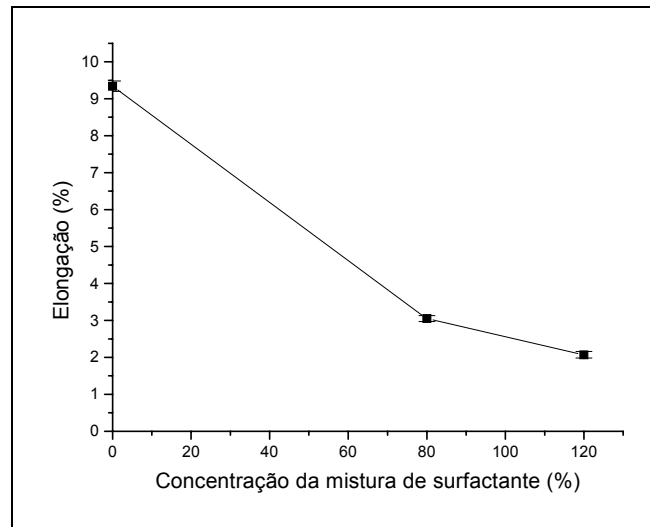


Figura 26. Efeito do aumento da concentração da mistura surfactantes (1:3 Tween 80/SDS) nos filmes de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos e cera de carnaúba com pH ajustado=8,5 e elongação.

Para os filmes que não sofreram ajuste de pH (pH=5,5) (Tabela 22) a adição da mistura de surfactante (3:1 Tween 80 /SDS) diminuiu os valores de TR e aumentou a porcentagem de elongação comparando com os filmes sem a adição de surfactante. A redução da TR pode ser explicada pela formação de uma estrutura frágil do filme com a adição da mistura de surfactante, devido provavelmente a falta de interações hidrofóbicas entre os grupos laterais da proteína e dos lipídios. Já o aumento da elongação foi explicado por FAIRLEY et al., (1996) observando um efeito moderado plastificante do SDS em filmes de proteína de soro do leite.

De maneira geral a adição da mistura de surfactante não melhorou o parâmetro TR e de elongação dos filmes contendo cera (de cana-de-açúcar ou de carnaúba) com ajuste de pH. A redução da elongação e da TR com a adição da mistura de surfactante, pode ser explicado por DEBEAUFORT, QUEZADA-GALLO e VOILLEY (1995) que analisaram as propriedades mecânicas dos filmes emulsionados de metilcelulose e cera de parafina. Estes autores verificaram que as propriedades mecânicas dos filmes são influenciadas pela homogeneidade da

emulsão, tamanho e distribuição dos glóbulos de lipídios dentro do filme e para que a rede polimérica dos filmes se organize de forma homogênea e contínua é necessário que o surfactante adicionado à emulsão esteja em condições favoráveis para agir, incluindo a temperatura e o pH adequados.

Tabela 24. Efeito da adição de surfactante nas propriedades mecânicas (tensão na ruptura e alongação) dos filmes de gelatina (10%) (com ajuste de pH=8,5), triacetina (10%), blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) (20%) e cera de carnaúba (5%).

Filme*	Tensão na ruptura (MPa)**	Elongação (%)**
CR (5%)	49,11 ± 1,06 ^a	9,34 ± 0,14 ^a
CR(5%)/60T	20,84 ± 0,86 ^c	2,41 ± 0,53 ^{c,d}
CR(5%)/100MT	17,30 ± 0,18 ^d	4,19 ± 0,28 ^b
CR(5%)/120SDS	15,04 ± 0,55 ^e	2,07 ± 0,09 ^d
CR(5%)/80SDS	24,74 ± 0,44 ^b	3,05 ± 0,08 ^c

* CR: cera de carnaúba, 60T: 60% de Tween 80 em relação a massa seca da gelatina; 100MT: 100% mistura de surfactantes (onde 50% da mistura Tween 80 e 50% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 120SDS: 120% mistura de surfactantes (onde 25% da mistura Tween 80 e 75% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 80SDS: 80% mistura de surfactantes (onde 25% da mistura Tween 80 e 75% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina. **Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

O efeito de cada componente individualmente nas propriedades mecânicas dos filmes pode ser verificado nas Tabelas 25 a 28, observa-se que a adição da mistura de surfactante (3:1 Tween 80/SDS) nas concentrações de 160 e 120% reduz drasticamente os valores de TR em relação aos filmes sem a adição da mistura de surfactante, mostrados nas Tabelas 25 e 26 respectivamente. Já os valores de alongação desta mistura na concentração de 160% aumentaram em relação aos filmes sem a adição da mistura de surfactante (Tabela 25). O surfactante agiu nestes filmes (pH=5,5) como um agente plastificante aumentando

a flexibilidade dos filmes (exceto nos filmes simples de gelatina) com o aumento da alongação em relação aos filmes sem a adição de surfactante.

O filme (pH=5,5) de gelatina e triacetina contendo a mistura de surfactante (concentração de 160%) foi o que apresentou maior efeito com um aumento da alongação de 81% em relação ao filme sem a mistura de surfactante; já a adição desta mesma mistura de surfactante nos filmes simples de gelatina reduziu a alongação em 40%, em relação aos filmes sem a adição de surfactante. Diminuindo-se a concentração da mistura de surfactante de 160 para 120% nos filmes sem ajuste de pH, observou-se que cada componente interage diferentemente com a mistura (3:1 Tween 80/SDS), pois não se verifica nenhuma relação linear com a adição da substância hidrofóbica (Tabela 26). Observando-se na Tabela 26, verifica-se que o filme de gelatina adicionados da mistura (3:1 Tween 80/SDS, na concentração de 120%) sofreu um aumento na alongação, em relação aos filmes sem adição de surfactante, já para o filme composto contendo triacetina e blenda de ácido esteárico-palmitico contendo a mesma mistura de surfactante os valores de alongação reduziram em torno de 42%, em relação ao filme sem a adição de surfactantes (Tabela 26). Para os demais filmes a adição desta mistura de surfactante não provocou alterações em relação aos filmes sem a adição de surfactante.

Tabela 25. Efeito da adição dos surfactantes (3:1 Tween 80/SDS, na concentração de 160% em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (sem ajuste de pH=5,5); adicionados de triacetina; blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); triacetina e blenda; triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (5%) nas propriedades mecânicas.

Filmes*	Tensão na ruptura (MPa)**	Elongação**
Gel	117,07 ± 0,35 ^a	5,51 ± 0,24 ^a
Gel/160S	14,38 ± 0,52 ^b	3,28 ± 0,15 ^b
Gel/ Tri	111,57 ± 1,66 ^a	5,98 ± 0,36 ^b
Gel/Tri/160S	13,08 ± 1,32 ^b	32,03 ± 0,68 ^a
Gel/BI	61,87 ± 0,92 ^a	6,78 ± 0,48 ^b
Gel/BI/160S	15,68 ± 1,02 ^b	12,29 ± 0,46 ^a
Gel/Tri/BI	62,02 ± 0,78 ^a	11,52 ± 0,55 ^b
Gel/Tri/BL/160S	14,74 ± 0,52 ^b	28,28 ± 1,19 ^a
Gel/Tri/BI/CA (5%)	53,05 ± 1,06 ^a	7,72 ± 1,38 ^b
Gel/Tri/BI/CA (5%)/160S	11,52 ± 0,72 ^b	18,91 ± 0,57 ^a

* Gel: gelatina; Tri: triacetina; BI: blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); CA: cera de cana-de-açúcar; 160S: 160% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; ** Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

Tabela 26. Efeito da adição dos surfactantes (3:1 Tween 80/SDS, na concentração de 120% em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (sem ajuste de pH=5,5); adicionados de triacetina; blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); triacetina e blenda; triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (5%) nas propriedades mecânicas.

Filmes*	Tensão na ruptura (MPa)**	Elongação (%)**
Gel	117,07 ± 0,35 ^a	5,51 ± 0,24 ^b
Gel/120S	20,25 ± 1,74 ^b	49,90 ± 5,43 ^a
Gel/ Tri	111,57 ± 1,66 ^a	5,98 ± 0,36 ^a
Gel/Tri/120S	21,85 ± 0,19 ^b	4,61 ± 0,42 ^a
Gel/BI	61,87 ± 0,92 ^a	6,78 ± 0,48 ^a
Gel/BI/120S	21,46 ± 0,16 ^b	7,43 ± 0,28 ^a
Gel/Tri/BI	62,02 ± 0,78 ^a	11,52 ± 0,55 ^a
Gel/Tri/BI/120S	17,59 ± 0,31 ^b	6,77 ± 0,10 ^b
Gel/Tri/BI/CA (5%)	53,05 ± 1,06 ^a	7,72 ± 1,38 ^a
Gel/Tri/BI/CA (5%)/120S	15,67 ± 0,23 ^b	6,58 ± 1,03 ^a

* Gel: gelatina; CA: cera de cana-de-açúcar; Tri: triacetina; BI: blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); 120S: 120% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; ** Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

A adição da mistura de surfactante (3:1 Tween 80/SDS) nas concentrações 160 e 120% nos filmes com ajuste de pH, diminuiu as propriedades mecânicas (TR e E), em relação aos filmes sem a adição de surfactante (Tabelas 27 e 28). Observando-se as Tabelas 27 e 28, verificou-se comportamento semelhante para as concentrações 160 e 120% da mistura de surfactante adicionadas aos filmes (pH=8,5), apresentando menores valores de TR em relação aos filmes sem a adição de surfactante. Avaliando-se a elongação dos filmes (pH=8,5) adicionados da mistura de surfactantes (3:1 Tween 80/SDS) na concentração de 160% (Tabela 27), apenas os filmes de Gel e BI sofreram aumento de 21%, os demais sofreram

uma redução em torno de 45%, em relação aos filmes sem a adição de surfactante. Na Tabela 28 observa-se que com a diminuição da concentração da mesma mistura de surfactantes de 160 para 120% adicionada aos filmes (pH=8,5), os valores de alongação não aumentaram linearmente com o aumento do material hidrofóbico. Para os filmes de gelatina, triacetina, blenda e cera de cana a adição da mistura de surfactante diminuiu a alongação; já para os filmes compostos contendo triacetina a adição da mistura de surfactante aumentou a alongação em torno de 93%, em relação aos filmes sem a adição de surfactante. Para os demais não foi observada diferenças significativas.

Os filmes apresentam um comportamento diferente na alongação para cada componente adicionado ao filme com a adição do surfactante que ora aumentou ora reduziu-se dependendo das propriedades químicas dos componentes adicionados. Os filmes com ajuste de pH não apresentaram o mesmo comportamento plastificante com a adição dos surfactante, o que pode ser explicado pela diferença das cargas ionizadas na solução filmogênica em pH básico onde há um excesso de carga negativa, alterando assim as interações intermoleculares formando uma matriz descontínua e com a presença de agregados de lipídios.

Tabela 27. Efeito da adição dos surfactantes (3:1 Tween 80/SDS, na concentração de 160% em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (com ajuste de pH=8,5); adicionados de triacetina; blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); triacetina e blenda; triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (5%) nas propriedades mecânicas.

Filmes *	Tensão na ruptura (MPa)**	Elongação (%)**
Gel/BI	72,68 ± 0,51 ^a	5,00 ± 0,63 ^a
Gel/BI/160S	17,16 ± 0,32 ^b	6,31 ± 0,25 ^b
Gel/Tri/BI	65,16 ± 0,62 ^a	6,67 ± 1,06 ^a
Gel/Tri/BL/160S	15,18 ± 0,44 ^b	3,52 ± 0,80 ^b
Gel/Tri/BI/CA (5%)	45,63 ± 0,87 ^a	9,39 ± 0,60 ^a
Gel/Tri/BI/CA (5%)/160S	14,77 ± 0,36 ^b	5,55 ± 0,64 ^b

* * Gel: gelatina; CA: cera de cana-de-açúcar; Tri: triacetina; BI: blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); 160S: 160% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; ** Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

Tabela 28. Efeito da adição dos surfactantes (3:1 Tween 80/SDS, na concentração de 120% em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (com ajuste de pH=8,5); adicionados de triacetina; blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); triacetina e blenda; triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (5%) nas propriedades mecânicas.

Filmes*	Tensão na ruptura (MPa)**	Elongação (%)**
Gel	95,25 ± 0,99 ^a	4,82 ± 0,48 ^a
Gel/120S	25,25 ± 0,21 ^b	2,83 ± 0,42 ^b
Gel/ Tri	102,56 ± 0,36 ^a	6,12 ± 0,14 ^b
Gel/Tri/120S	15,73 ± 0,65 ^b	84,14 ± 1,76 ^a
Gel/BI	72,68 ± 0,51 ^a	5,00 ± 0,63 ^a
Gel/BI/120S	20,13 ± 0,33 ^b	4,16 ± 1,10 ^a
Gel/Tri/BI	65,16 ± 0,62 ^a	6,67 ± 1,06 ^a
Gel/Tri/BL/120S	18,06 ± 0,65 ^b	6,26 ± 0,11 ^a
Gel/Tri/BI/CA (5%)	45,63 ± 0,87 ^a	9,39 ± 0,60 ^a
Gel/Tri/BI/CA(5%)/120S	21,58 ± 0,16 ^b	4,62 ± 0,17 ^b

* Gel: gelatina; CA: cera de cana-de-açúcar; Tri: triacetina; BI: blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); 120S: 120% mistura de surfactante (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) com relação à massa seca da gelatina; ** Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

A adição de 60% de Tween 80 (em relação à massa seca da gelatina) nos filmes (pH=8,5) reduziu os valores de TR e de E, em relação aos filmes sem adição de surfactante (Tabela 29). Os valores de TR nos filmes com a adição de Tween 80 apresentaram uma taxa de redução em torno de 70%, em relação aos filmes sem a adição de surfactante (Tabela 29). Na Tabela 29 a elongação sofre uma redução em todos os filmes com ajuste de pH e com a adição do Tween 80, esta redução varia de 40% para o filme simples de gelatina e até de 74% para os filmes de gelatina, triacetina, blenda e cera de carnaúba, em relação aos filmes sem a adição de Tween 80.

Tabela 29. Efeito da adição dos surfactantes (60% de Tween 80 em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (com ajuste de pH=8,5); adicionados triacetina; blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); triacetina e blenda; triacetina, blenda e cera de carnaúba (5%) nas propriedades mecânicas.

Filmes*	Tensão na ruptura (MPa)**	Elongação (%)**
Gel	95,25 ± 0,99 ^a	4,82 ± 0,48 ^a
Gel/60S	46,46 ± 1,79 ^b	2,89 ± 0,54 ^b
Gel/ Tri	102,56 ± 0,36 ^a	6,12 ± 0,14 ^a
Gel/Tri/60S	24,65 ± 0,82 ^b	1,50 ± 0,21 ^b
Gel/BI	72,68 ± 0,51 ^a	5,00 ± 0,63 ^a
Gel/BI/60S	26,37 ± 1,12 ^b	2,60 ± 0,31 ^b
Gel/Tri/BI	65,16 ± 0,62 ^a	6,67 ± 1,06 ^a
Gel/Tri/BI/60S	17,43 ± 0,32 ^b	1,97 ± 0,14 ^b
Gel/Tri/BI/CR (5%)	49,11 ± 1,06 ^a	9,34 ± 0,14 ^a
Gel/Tri/BI/CR(5%)/60S	20,84 ± 0,86 ^b	2,41 ± 0,53 ^b

* Gel: gelatina; CR: cera de carnaúba; Tri: triacetina; BI: blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmitico); 60S: 60% de Tween 80 em relação à massa seca da gelatina; ** Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

Observa-se de forma geral que a adição dos surfactantes nos filmes (pH=8,5) não melhorou suas propriedades mecânicas, apesar dos surfactantes adicionados terem sido selecionados pelo teste preliminar e classificados como microemulsão, ou seja, nesta concentração e combinação o surfactante poderia agir estabilizando a emulsão e melhorando as propriedades dos filmes (T=80°C). Durante o processo de secagem (24,3°C e 52,5% de umidade relativa por 24 horas) desses filmes, alterou-se a temperatura da emulsão e com isso suas propriedades provocando sua desestabilização e desorganizando a distribuição e o tamanho dos glóbulos de lipídios nos filmes, conseqüentemente alterando significativamente suas propriedades mecânicas. Este mesmo comportamento foi relatado por DEBEAUFORT, QUEZADA-GALLO e VOILLEY (1995) onde o

processo de secagem nos filmes emulsionados de metilcelulose e cera de parafina contendo 0,9% de monoestearato de glicerol afetou suas propriedades estruturais como a distribuição e o tamanho dos glóbulos de lipídio nos filmes emulsionados.

Nos filmes (pH=5,5) a adição da mistura (3:1 Tween 80/SDS) melhorou a flexibilidade do filme aumentando sua alongação, porém diminuiu a TR.

4.4 Solubilidade

A solubilidade em água (Sol) dos filmes esta relacionada diretamente com as interações intermoleculares entre seus componentes, de acordo com sua estrutura e suas características químicas (hidrofilicidade e hidrofobicidade) entre outras.

A Tabela 30 apresenta o efeito da solubilidade para os filmes simples com pH natural sem a adição de cera verificando-se um aumento da Sol com a adição da triacetina e da blenda de ácido esteárico-palmítico(adicionados separadamente ou em conjunto), em relação ao filme de gelatina, com um aumento de 41% na Sol dos filme simples de gelatina em relação aos filmes contendo triacetina e blenda. Efeito contrário da Sol foi observado para os filmes com ajuste de pH (8,5), ocorrendo uma diminuição da Sol em 66% para os filmes de gelatina em relação aos filmes contendo triacetina e blenda (Tabela 30).

Tabela 30. Solubilidade em água dos filmes compostos de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) e ceras (cana-de-açúcar e carnaúba), filmes preparados em duas condições de pH.

Filmes*	Solubilidade (%)*	
	pH= 5,5	pH=8,5
Gel	19,77 ± 1,65 ^d	100,00 ± 0,00 ^a
Gel/Tri	19,38 ± 0,02 ^d	39,45 ± 4,99 ^b
Gel/BI	27,58 ± 3,53 ^b	35,58 ± 0,86 ^c
Gel/Tri/BI	33,43 ± 2,11 ^a	33,27 ± 1,52 ^c
Gel/Tri/BI/CA 2,5%	28,03 ± 6,85 ^b	25,19 ± 1,33 ^d
Gel/Tri/BI/CA 5%	28,15 ± 2,14 ^b	26,95 ± 1,47 ^d
Gel/Tri/BI/CA 7,5%	23,39 ± 3,32 ^c	23,91 ± 1,73 ^e
Gel/Tri/BI/CA 10%	33,75 ± 1,50 ^a	17,29 ± 3,83 ^f
Gel/Tri/BI/CR 2,5%	35,74 ± 1,86 ^a	23,02 ± 3,10 ^e
Gel/Tri/BI/ CR 5%	30,45 ± 3,05 ^b	22,38 ± 0,16 ^e
Gel/Tri/BI/ CR 7,5%	30,61 ± 3,02 ^b	23,75 ± 1,62 ^e
Gel/Tri/BI/ CR 10%	28,35 ± 1,30 ^b	21,93 ± 1,63 ^e

* Gel: gelatina; CA: cera de cana-de-açúcar; CR: cera de carnaúba; Tri: triacetina; BI: blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmítico).** Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

Para os filmes de gelatina, gelatina e triacetina e de gelatina e blenda o ajuste de pH (8,5) aumentou significativamente os valores da Sol em relação aos filmes sem ajuste de pH (5,5) (Tabela 30), já para o filme de gelatina, triacetina e blenda o ajuste de pH não provocou alterações significativas nos valores de Sol. Uma hipótese para explicar este resultado pode estar associada ao ponto isoelétrico da gelatina situado entre 4,6 – 5,2. Os filmes elaborados sem ajuste de pH (pH=5,5) apresentam menores valores de Sol por estarem próximos do pl da proteína, onde a repulsão eletrostática é mínima o que favorece a agregação através das interações hidrofóbicas. Por outro lado, o aumento da densidade de

cargas da proteína, em valores de pH afastados da região do ponto isoelétrico, como é o caso dos filmes produzidos com ajuste de pH (8,5), favorecem as interações proteína-água resultando em um aumento das propriedades de hidratação e conseqüentemente um aumento na solubilidade (DAMODARAM, 1996).

A adição das ceras (cana e carnaúba) nos filmes sem ajuste de pH provocou um aumento significativo na Sol em todas as faixas de concentração estudadas (2,5 – 10%), em relação aos filmes de gelatina (Tabela 30). Resultados similares foram verificados por outros autores, onde a adição de compostos lipídicos aumentaram a Sol bruscamente depois que certa quantidade de material lipídico foi adicionada à formulação dos filmes, por exemplo, por FAKHOURI (2002), para filmes de gelatina e vários tipos de ácidos graxos em várias concentrações diferentes e por BERTAN (2003) com a adição de ácido láurico e breu branco em filmes emulsionados a base de gelatina.

Para os filmes com o ajuste de pH (8,5), verificou-se uma diminuição da Sol com a adição crescente de cera (carnaúba ou cana-de-açúcar), comparando com os filmes simples de gelatina. Este mesmo comportamento foi observado por KIM et al. (2003) que elaboraram filmes emulsionados de proteína do soro do leite e cera de sorgo, onde o aumento da concentração de cera de sorgo (0, 15 e 30%) provocou uma diminuição na Sol.

Observa-se na Tabela 30 que o ajuste de pH nos filmes emulsionados adicionados de cera de cana-de-açúcar provocou uma diminuição nos valores de Sol, em relação aos filmes sem ajuste de pH (exceto para os filmes contendo 7,5% de cera que não apresentaram diferença significativa na Sol com o ajuste de pH). O pH ácido próximo ao pI da gelatina, pode aumentar a viscosidade da solução filmogênica dificultando assim à interação do lipídio com a proteína no filme. Esta dificuldade de interações entre o lipídio-proteína confere ao filme uma estrutura frágil e heterogênea, propiciando maior Sol em relação aos filmes com ajuste de pH. Este mesmo comportamento foi verificado para os filmes adicionados de cera de carnaúba em todas as concentrações, onde o ajuste de pH promoveu redução na Sol, em relação aos filmes sem ajuste de pH (Tabela 30).

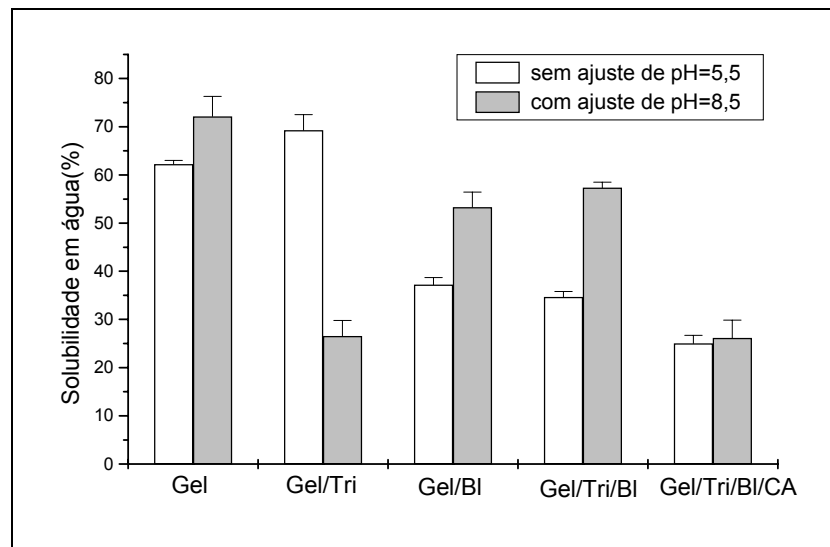


Figura 27. Solubilidade em água com e sem ajuste de pH nos filmes de gelatina (0g de material hidrofóbico – MH); adicionado de triacetina (1g de MH); blenda de ácido graxo (2g de MH); triacetina e blenda (3g de MH); triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (3,5g de MH) e a mistura 3:1 Tween 80/SDS na concentração de 120%.

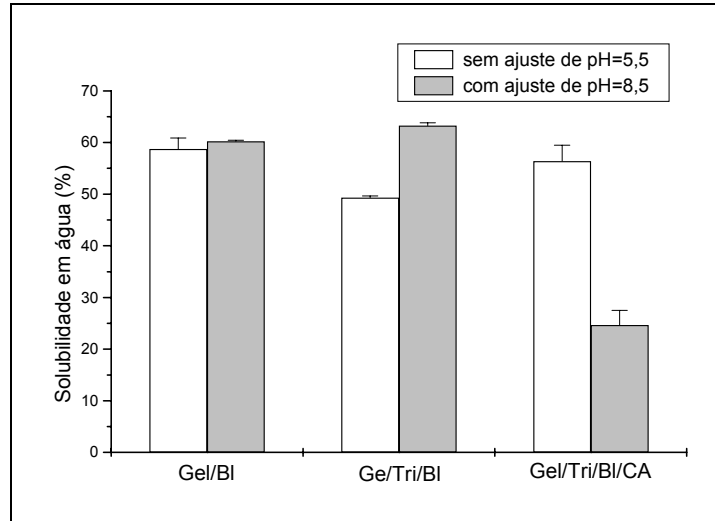


Figura 28. Solubilidade em água com e sem ajuste de pH nos filmes de gelatina (0g de material hidrofóbico – MH); adicionado de triacetina (1g de MH); blenda de ácido graxo (2g de MH); triacetina e blenda (3g de MH); triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (3,5g de MH) e a mistura 3:1 Tween 80/SDS na concentração de 160%.

A Figura 27 permite verificar que o ajuste de pH aumentou a solubilidade dos filmes simples de gelatina, filmes compostos de blenda de ácido esteárico-palmítico e dos filmes adicionados de triacetina e blenda, em relação aos filmes sem ajuste de pH todos contendo a mistura de surfactante (3:1) Tween 80/SDS, na concentração de 120%. O pH alcalino pode ter promovido uma desestabilização devido à ação da mistura de surfactantes nestes filmes formando uma estrutura instável e reduzindo as forças intermoleculares entre as cadeias da proteína. Para os filmes compostos de triacetina a adição da mistura de surfactante em pH alcalino promoveu uma redução na Sol, em relação aos filmes sem o ajuste de pH (Figura 27). Já para o filme mais complexo contendo cera de cana-de-açúcar a adição da mesma mistura de surfactante na concentração de 120% não alterou o valor de Sol com o ajuste de pH (Figura 27).

Na Figura 28 observou-se que aumentando-se a concentração da mistura de surfactantes adicionando (3:1 Tween 80/SDS) de 120 para 160% nos filmes emulsionados contendo a blenda de ácido esteárico-palmítico e com o ajuste de pH observou-se a Sol não variou, em relação aos filmes sem ajuste de pH. Já para o filme contendo triacetina, blenda e a mistura de surfactante o ajuste de pH promoveu o aumento da Sol e os filmes complexos contendo cera de cana e a mistura de surfactantes apresentou efeito contrário diminuindo a Sol, em relação aos filmes com pH ácido.

A adição dos surfactantes nos filmes emulsionados deveria agir promovendo melhor incorporação dos compostos hidrofóbicos na matriz protéica, modificando a estrutura dos filmes que esta relacionada diretamente com a solubilidade destes filmes em água e com a possibilidade que as micelas de surfactante poderia ocorrer maior afinidade lipídio-proteína.

Tabela 31. Solubilidade em água dos filmes compostos de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) e ceras (cana-de-açúcar e carnaúba) e surfactantes (diversas combinações de Tween 80/SDS e Tween 80), filmes preparados em duas condições de pH.

Filmes*	Solubilidade (%)*	
	pH= 5,5	pH=8,5
Gel	19,77 ± 1,65 ^c	100,00 ± 0,00 ^a
Gel/120S	62,20 ± 0,82 ^b	72,09 ± 4,16 ^b
Gel/160S	76,91 ± 1,43 ^a	-
Gel/60T	-	57,98 ± 3,10 ^c
Gel/Tri (10%)	19,38 ± 0,02 ^c	39,45 ± 4,99 ^b
Gel/Tri/120S	69,24 ± 3,23 ^a	26,57 ± 3,23 ^c
Gel/Tri/ 160S	74,70 ± 3,27 ^a	-
Gel/Tri/60T	-	52,58 ± 0,60 ^a
Gel/BI (20%)	27,58 ± 3,53 ^c	35,58 ± 0,86 ^c
Gel/BI/120S	37,18 ± 1,51 ^b	53,29 ± 3,12 ^b
Gel/BI/160S	58,73 ± 2,17 ^a	60,21 ± 0,25 ^a
Gel/BI/60T	-	33,02 ± 1,08 ^c
Gel/BI/80SDS	-	24,93 ± 1,23 ^d
Gel/Tri/BI	33,43 ± 2,11 ^b	33,27 ± 1,52 ^d
Gel/Tri/BI/120S	34,67 ± 1,14 ^b	57,34 ± 1,14 ^b
Gel/Tri/BI/160S	49,30 ± 0,34 ^a	63,24 ± 0,58 ^a
Gel/Tri/BI/60T	-	43,27 ± 0,71 ^c
Gel/Tri/BI/120MT	-	59,38 ± 0,27 ^b
Gel/Tri/BI/CA (5%)	28,15 ± 2,14 ^b	26,95 ± 1,47 ^a
Gel/Tri/BI/CA (5%)/120S	25,00 ± 1,73 ^b	26,11 ± 3,72 ^a
Gel/Tri/BI/CA (5%)/160S	56,37 ± 3,10 ^a	24,65 ± 2,85 ^a
Gel/Tri/BI/CA(5%)/120MT	-	12,52 ± 2,35 ^b
Gel/Tri/BI/ CR (5%)	30,45 ± 3,05	22,38 ± 0,16 ^c
Gel/Tri/BI/CR(5%)/60T	-	56,74 ± 1,65 ^a
Gel/Tri/BI/CR(5%)/80SDS	-	27,39 ± 3,83 ^c
Gel/Tri/BI/CR(5%)/120SDS	-	35,81 ± 4,69 ^b
Gel/Tri/BI/CR(5%)/100MT	-	9,99 ± 1,52 ^d

* Gel: gelatina; Tri: triacetina; BI: blenda de ácidos graxos (1:1esteárico: palmítico); CA: cera de cana-de-açúcar; CR: cera de carnaúba, 160S: 160% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 120S: 120% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 60S: 60% de Tween 80 em relação à massa seca da gelatina; 80SDS: 80% mistura de surfactantes (onde 25% da mistura Tween 80 e 75% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina;120MT: 120% mistura de surfactantes (onde 50% da mistura Tween 80 e 50% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina 100MT: 100% mistura de surfactantes (onde 50% da mistura Tween 80 e 50% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 120SDS: 120% mistura de surfactantes (onde 25% da mistura Tween 80 e 75% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; **. Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p< 0,05) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

Na Tabela 31, observou-se que a adição da mistura de surfactantes nos filmes emulsionados provocou alteração significativa na Sol comparado com os filmes sem a adição de surfactantes. Observa-se que a mistura de surfactante (3:1 SDS/ Tween 80, na concentração de 80% em relação à massa seca da gelatina) quando adicionada aos filmes (pH=8,5) contendo blenda de ácido graxo diminuiu a Sol em torno de 30%, em relação aos filmes sem a adição de surfactante. Para os filmes contendo cera de carnaúba não ocorre alteração na Sol com a adição desta mistura de surfactante. Aumentando-se a concentração desta mistura de 80 para 120% no filme contendo cera de carnaúba, a Sol aumenta em torno de 38%, em relação ao filme sem a adição de surfactante. Analisando-se a adição de outra mistura de surfactante (1:1 Tween 80/SDS, nas concentrações de 100 e 120%) aos filmes emulsionados em pH=8,5 os valores de Sol apresentaram uma taxa de redução de 55% com relação aos filmes sem a adição de surfactante.

O efeito da solubilidade com adição da mistura de surfactantes (3:1 Tween 80/SDS) nos filmes poliméricos (pH=5,5), tanto na concentração 120% como na de 160% produz um aumento na Sol dos filmes emulsionados, em relação aos filmes sem a adição de surfactantes (Tabela 31). Como esperado o aumento da Sol é maior com a adição da mistura de surfactante na concentração de 160% do que na concentração de 120%, como pode ser observado na Tabela 31. Estes resultados mostram que a adição de surfactante aumentou a solubilidade em água dos filmes emulsionados provavelmente devido ao enfraquecimento das forças intermoleculares entre as cadeias poliméricas, desestabilizando assim sua estrutura. Para os filmes a pH=8,5, a adição da mistura de surfactantes (3:1 Tween 80/SDS), contendo blenda ou blenda e triacetina, a adição da mistura de surfactante nas concentrações 120 e 160% provocaram aumento da Sol. De forma oposta, foi observado para filmes simples de gelatina e para o adicionado de triacetina, diminuição na Sol com a adição desta mesma mistura de surfactantes na concentração de 120%, em relação ao filmes sem a adição de surfactantes.

Nos filmes de gelatina, a adição de surfactantes (60% de Tween 80, em relação à massa seca da gelatina) reduziu a solubilidade (Tabela 31).

4.5 Opacidade

A opacidade envolve o aspecto visual dos filmes e esta diretamente relacionada com sua aparência final. O padrão utilizado para comparar com os valores analisados foi o filme de cloreto de polivinilideno (PVC) apresentando $11,75 \pm 0,13$ de opacidade. Este padrão foi escolhido por ser muito utilizado como embalagem para diversos produtos (BRISTON, 1988).

Tabela 32. Opacidade dos filmes compostos de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) e ceras (cana-de-açúcar e carnaúba), filmes preparados em duas condições de pH.

Filmes*	Opacidade (%)*	
	pH= 5,5	pH=8,5
Gel	$13,08 \pm 0,09^d$	$13,43 \pm 0,12^c$
Gel/Tri (10%)	$15,07 \pm 0,76^d$	$14,50 \pm 0,09^c$
Gel/BI (20%)	$27,38 \pm 0,89^a$	$14,78 \pm 0,27^c$
Gel/Tri/BI	$25,75 \pm 1,26^{b,c}$	$23,74 \pm 0,62^b$
Gel/Tri/BI/CA (2,5%)	$27,75 \pm 0,93^a$	$24,05 \pm 0,62^b$
Gel/Tri/BI/CA (5%)	$23,59 \pm 0,79^c$	$25,68 \pm 0,80^{a,b}$
Gel/Tri/BI/CA (7,5%)	$27,12 \pm 0,31^a$	$26,25 \pm 0,83^a$
Gel/Tri/BI/CA (10%)	$28,81 \pm 0,35^a$	$26,08 \pm 0,75^a$
Gel/Tri/BI/CR (2,5%)	$22,81 \pm 0,93^c$	$24,70 \pm 0,73^b$
Gel/Tri/BI/ CR (5%)	$26,97 \pm 3,31^{a,b}$	$24,97 \pm 0,65^b$
Gel/Tri/BI/ CR (7,5%)	$27,84 \pm 0,01^a$	$27,25 \pm 0,22^a$
Gel/Tri/BI/ CR (10%)	$26,83 \pm 5,30^{a,b}$	$27,19 \pm 0,09^a$

* Gel: gelatina; CA: cera de cana-de-açúcar; CR: cera de carnaúba; Tri: triacetina; BI: blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico-palmítico).** Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

A Tabela 32 indica que para os filmes simples sem a presença de ceras, a opacidade aumentou significativamente quando a blenda de ácido esteárico-palmítico foi adicionada em relação ao filme de gelatina. A adição de triacetina (pH natural) aumenta levemente a opacidade do filme de gelatina. O ajuste de pH manteve a mesma opacidade dos filmes de gelatina ou de gelatina e triacetina em comparação aos filmes com pH natural. Filmes de gelatina, triacetina e blenda praticamente também mantêm a opacidade com e sem ajuste de pH. Na série de filmes sem a adição das ceras a única variação de opacidade observada foi para filmes contendo gelatina e blenda, onde o ajuste de pH produziu um decréscimo acentuado na opacidade do filme resultante com uma redução de 43% na porcentagem de opacidade em relação à mesma formulação em pH natural. Os filmes contendo somente gelatina (com e sem ajuste de pH) apresentam valores de opacidade maiores que os filmes de PVC.

Filmes completos (gelatina, triacetina e blenda) contendo as duas diferentes ceras em quantidades crescentes apresentaram valores de opacidade muito mais altos que os filmes contendo somente gelatina ou o filme de PVC (Tabela 32). No entanto o tipo de cera (carnaúba ou cana) e as concentrações estudadas (2,5 - 10%) não mostraram diferenças significativas devido a esses fatores na condição de pH natural. O ajuste de pH, também não indicou diferenças acentuadas devido da concentração ou do tipo de cera utilizados. No entanto os valores de opacidade ligeiramente menores foram produzidos, quando o pH é aumentado, o que poderia permitir melhores incorporações dos lipídios na matriz protéica e conseqüentemente menor opacidade. Observações visuais dos filmes indicaram o mesmo comportamento, com filmes em pH ajustado aparentemente menos opacos. O aumento da opacidade devido à inclusão da cera foi observado em filmes de isolado protéico do soro do leite e cera de candelila (KIN; USTUNOL, 2001). GONTARD et al. (1994) observaram que o aumento da concentração dos compostos hidrofóbicos (ácido oléico, cera de parafina, cera de carnaúba, cera de abelha, entre outros) também promoveu um aumento na opacidade dos filmes emulsão de glúten.

Para todas as propriedades dos filmes analisadas até o momento, como PVA, resistência mecânica e solubilidade em água, foi verificado de forma geral que o ajuste de pH nos filmes emulsionados parece dificultar a ação do surfactante na emulsão filmogênica, interferindo de forma negativa em suas propriedades. O mesmo comportamento pode ser observado nos valores de opacidade, conforme apresentados nas Figuras 29 e 30. A adição da mistura de surfactantes (3:1 Tween 80/SDS) tanto nas concentrações 120 como na de 160% (em relação à massa seca da gelatina) nos filmes emulsionados (pH=8,5) contendo cera de cana provocou um aumento na opacidade, em relação aos filmes sem ajuste de pH.

Comportamento negativo semelhante devido a adição de surfactantes em diferentes quantidades ou misturas quando o pH é ajustado para 8,5 pode ser observado na Tabela 33. De forma geral as porcentagens de opacidade aumentam sobre estes efeitos (aumento de pH e presença de surfactantes). Os dois tipos de cera estudados não foram importantes na presença de surfactantes em pH alcalino, para alterar os valores de opacidade obtidos.

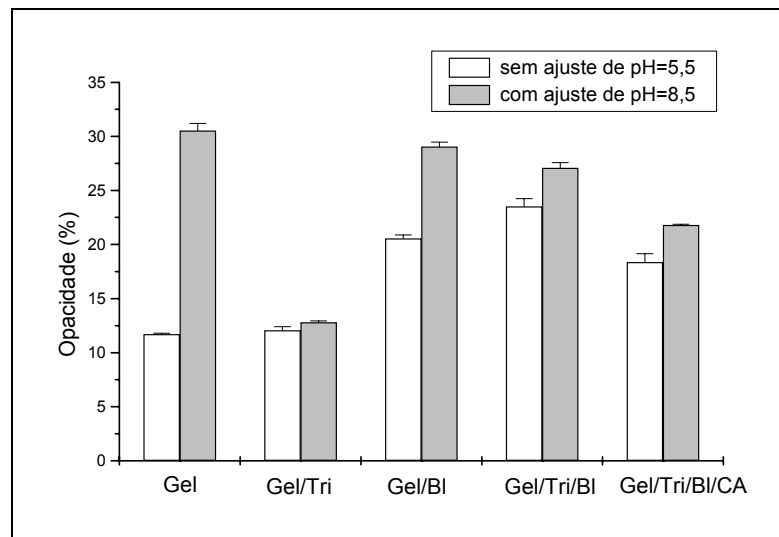


Figura 29. Comportamento da opacidade com e sem ajuste de pH nos filmes de gelatina (0g de material hidrofóbico – MH); adicionado de triacetina (1g de MH); blenda (2g de MH); triacetina e blenda (3g de MH); triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (3,5g de MH) e a mistura 3:1 Tween 80/SDS na concentração de 120%.

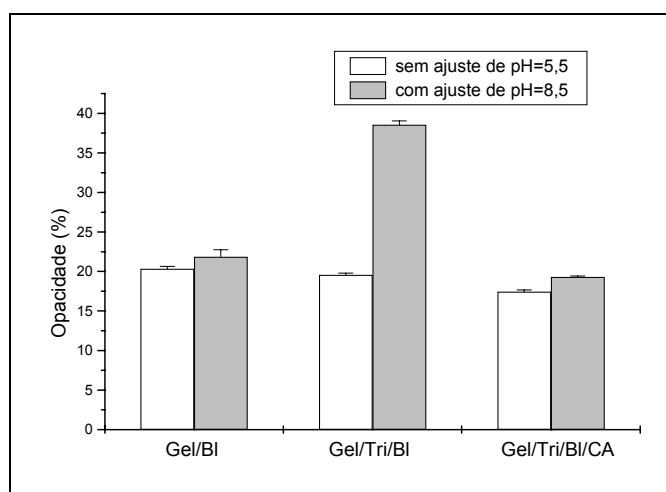


Figura 30. Opacidade com e sem ajuste de pH dos filmes de gelatina (0g de material hidrofóbico – MH); adicionado de triacetina (1g de MH); blenda (2g de MH); triacetina e blenda (3g de MH); triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (3,5g de MH) e a mistura 3:1 Tween 80/SDS na concentração de 160%.

A adição da mistura de surfactantes 120S e 160S (3:1 Tween 80/SDS) no filme completo contendo triacetina, blenda de ácido esteárico-palmítico e cera de cana diminuiu significativamente a opacidade dos filmes tanto em pH alcalino como em pH ácido, ao se comparar com o filme sem a adição de surfactante (Tabela 33). Este mesmo comportamento foi verificado adicionando-se o Tween 80 na concentração de 60% - 60T (em relação à massa seca da gelatina) para o filme completo contendo cera de carnaúba a pH 8,5. Efeito contrário foi observado com a adição das misturas 100MT e 80 SDS (1:1 tween 80/SDS, concentração 100% e 3:1 SDS/ Tween 80, na concentração 80%) nos filmes contendo cera de carnaúba onde ocorre um aumento da opacidade, em relação aos filmes sem a adição de surfactante. A mistura 1:1 Tween 80/SDS, na concentração 120% (120MT) adicionada aos filmes completos contendo cera de cana também provocou um aumento na opacidade, em relação aos filmes sem a adição de surfactantes a pH.8,5. Já as misturas de surfactantes (3:1 SDS/ Tween 80, na concentração de 120%, 120SDS) adicionadas aos filmes emulsionados contendo

cera de carnaúba em pH 8,5, não causou alterações significativas na opacidade, em relação aos filmes sem a adição de surfactantes.

Era esperado que os filmes apresentassem menor opacidade com a adição do surfactantes, devido ao aspecto translúcido observado na solução filmogênica durante a elaboração dos filmes (T=80°C por 30 minutos). Este comportamento ocorreu somente para situações onde os filmes contendo os surfactantes se encontravam em pH natural, quando comparados com os filmes de mesma formulação sem a adição de surfactantes e também em pH natural. Quando o pH foi ajustado para 8,5 a maior parte dos filmes resultantes (Tabela 33) teve a porcentagem de opacidade aumentada, embora na temperatura de produção (60°C) a solução filmogênica visualmente estivesse transparente. Com a redução da temperatura, a solução filmogênica começa a ficar esbranquiçada. A eliminação de água pode ter provocado modificações na estrutura da emulsão (alterações na distribuição e tamanho dos glóbulos de lipídios), os glóbulos de lipídios podem coalescer e formar agregados podendo alterar a opacidade do filme e até formar manchas opacas onde os agregados estiverem concentrados (VILLALOBOS et al., 2005).

Tabela 33. Efeito da adição de surfactante (diversas combinações de Tween 80/SDS) na opacidade dos filmes compostos de gelatina, triacetina, blenda de ácidos graxos (1:1 esteárico e palmítico) e ceras (cana-de-açúcar e carnaúba), filmes preparados em duas condições de pH.

Filmes*	Opacidade (%)*	
	pH= 5,5	pH=8,5
Gel	13,08 ± 0,09 ^b	13,43 ± 0,12 ^b
Gel/120S	11,71 ± 0,07 ^c	30,54 ± 0,67 ^a
Gel/160S	15,00 ± 0,64 ^a	-
Gel/60T	-	28,28 ± 0,72 ^a
Gel/Tri (10%)	15,07 ± 0,76 ^a	14,50 ± 0,09 ^a
Gel/Tri/120S	12,05 ± 0,35 ^b	12,79 ± 0,14 ^b
Gel/Tri/ 160S	14,34 ± 0,88 ^{a,b}	-
Gel/Tri/60T	-	12,37 ± 0,17 ^b
Gel/BI (20%)	27,38 ± 0,90 ^a	14,78 ± 0,27 ^e
Gel/BI/120S	20,55 ± 0,33 ^b	29,07 ± 0,41 ^a
Gel/BI/160S	20,34 ± 0,32 ^b	21,84 ± 0,91 ^c
Gel/BI/60T	-	19,53 ± 1,35 ^d
Gel/BI/80SDS	-	25,53 ± 0,40 ^b
Gel/Tri/BI	25,75 ± 1,26 ^a	23,74 ± 0,62 ^d
Gel/Tri/BI/120S	23,51 ± 0,74 ^a	27,08 ± 0,50 ^c
Gel/Tri/BI/160S	19,57 ± 0,24 ^b	38,56 ± 0,48 ^a
Gel/Tri/BI/60T	-	21,45 ± 0,20 ^d
Gel/Tri/BI/120MT	-	29,35 ± 1,10 ^b
Gel/Tri/BI/CA (5%)	23,59 ± 0,79 ^a	25,68 ± 0,80 ^b
Gel/Tri/BI/CA (5%)/120S	18,37 ± 0,78 ^b	21,81 ± 0,07 ^c
Gel/Tri/BI/CA (5%)/160S	17,43 ± 0,24 ^b	19,29 ± 0,15 ^c
Gel/Tri/BI/CA(5%)/120MT	-	29,35 ± 1,10 ^a
Gel/Tri/BI/ CR (5%)	26,97 ± 3,31	24,97 ± 0,65 ^c
Gel/Tri/BI/CR(5%)/60T	-	19,53 ± 1,35 ^d
Gel/Tri/BI/CR(5%)/80SDS	-	26,90 ± 0,53 ^b
Gel/Tri/BI/CR(5%)/120SDS	-	23,74 ± 0,11 ^c
Gel/Tri/BI/CR(5%)/100MT	-	33,85 ± 0,02 ^a

* Gel: gelatina; Tri: triacetina; BI: blenda de ácidos graxos (1:1esteárico: palmítico); CA: cera de cana-de-açúcar; CR: cera de carnaúba, 160S: 160% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 120S: 120% mistura de surfactantes (onde 75% da mistura Tween 80 e 25% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 120MT: 120% mistura de surfactantes (onde 50% da mistura Tween 80 e 50% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina 100MT: 100% mistura de surfactantes (onde 50% da mistura Tween 80 e 50% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 120SDS: 120% mistura de surfactantes (onde 25% da mistura Tween 80 e 75% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 80SDS: 80% mistura de surfactantes (onde 25% da mistura Tween 80 e 75% da mistura SDS) em relação à massa seca da gelatina; 60T: 60% de Tween 80 em relação à massa seca da gelatina. **Média e desvio padrão das triplicatas. Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste TUKEY.

4.6 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura tornou possível a visualização de possíveis imperfeições, a presença de poros, a separação dos componentes utilizados na formulação dos filmes e a estrutura da superfície dos filmes obtidos.

As micrografias eletrônicas de varredura foram obtidas em relação à superfície dos filmes. Os filmes foram analisados quanto ao aumento da concentração do material lipídico, o efeito do pH (5,5 e 8,5) e quanto à adição dos surfactantes.

Nas Figuras 31 e 32, pode-se observar o efeito da adição dos componentes hidrofóbicos (triacetina, blenda de ácido esteárico-palmítico e cera de carnaúba e de cana-de-açúcar) na morfologia da superfície dos filmes nos dois pHs estudados. A adição de triacetina nos filmes à base de gelatina provocou alterações na morfologia da superfície dos filmes formando glóbulos de triacetina de tamanhos variados e dispersos irregularmente tanto nos filmes com pH=5,5 (Figura 31B) quanto para o filme com pH=8,5 (Figura 32B). A adição de substâncias lipídicas como a blenda de ácido esteárico-palmítico modificou a superfície dos filmes a base de gelatina (pH=5,5) apresentando glóbulos de lipídios irregulares e de tamanhos diferentes, como mostrado na Figura 31C, o mesmo comportamento foi observado nos filmes compostos de triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar e carnaúba, mostrados respectivamente nas Figuras 31E e 31F. Nos filmes com pH=8,5 a adição dos compostos lipídicos provocou alterações significativas na superfície dos filmes comparados ao filme simples de gelatina (Figura 32A). A adição da blenda, da blenda e triacetina e da blenda, triacetina, cera de cana-de-açúcar ou de carnaúba nos filmes emulsionados (pH=8,5) alteram a superfície regular do filme de gelatina formando estruturas dispersas irregularmente, que podem ser visualizadas nas Figuras 32B, 32C, 32D, 32E e 32F.

A adição dos componentes hidrofóbicos alterou a superfície dos filmes a base de gelatina promovendo o aparecimento de glóbulos de tamanho diferente e distribuição irregular, como também verificado por MARTIN-POLO; MAUGIN e VOILLEY (1992) em filmes emulsionados onde a adição de materiais lipídicos

causou irregularidade na morfologia de superfície dos filmes resultantes. YANG e PAUSON (2000a) relataram que a adição de blenda de ácido esteárico-palmítico em filmes de goma gelana promoveu alta irregularidade na superfície. McHUGH e KROCHTA (1994b) observaram, em filmes emulsionados de proteína do soro do leite, que o lado do filme que ficava em contato com a placa durante o processo de secagem apresentava maior brilho e uniformidade devido a maior concentração de material protéico, enquanto que o lado em contato com o ar apresentou-se mais opaco e irregular pela presença de lipídios, menos densos e que tendem a migrar para a superfície.

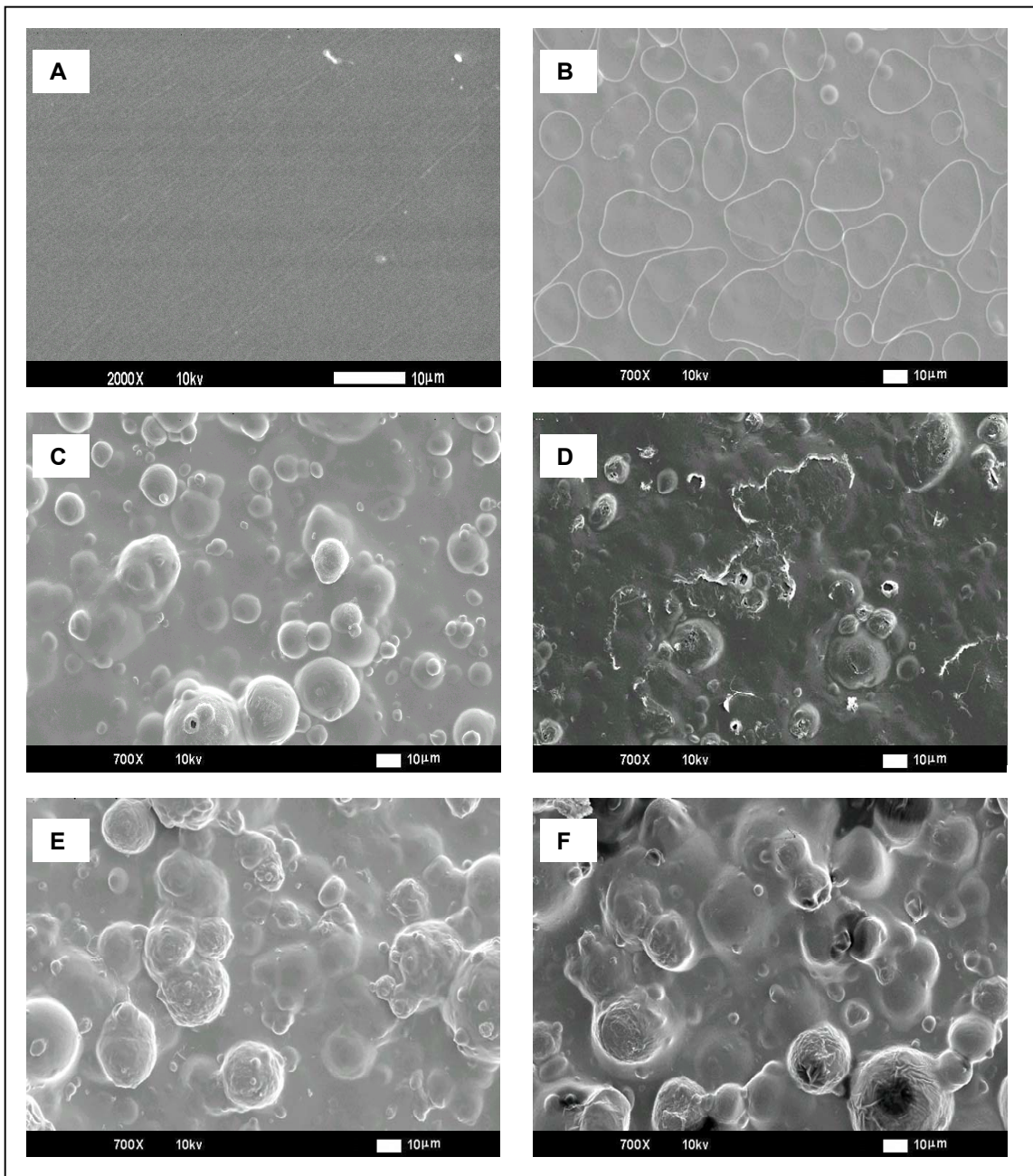


Figura 31. Imagens captadas por microscopia eletrônica de varredura dos seguintes filmes (sem ajuste de pH=5,5): (A) Gelatina (2000x); (B) Gelatina/Triacetina (700x); (C) Gelatina/Blenda de ácido esteárico-palmitico (700x); (D) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmitico (700x); (E) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmitico/Cera de cana-de-açúcar 5% (700x); (F) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmitico/Cera de carnaúba 5% (700x).

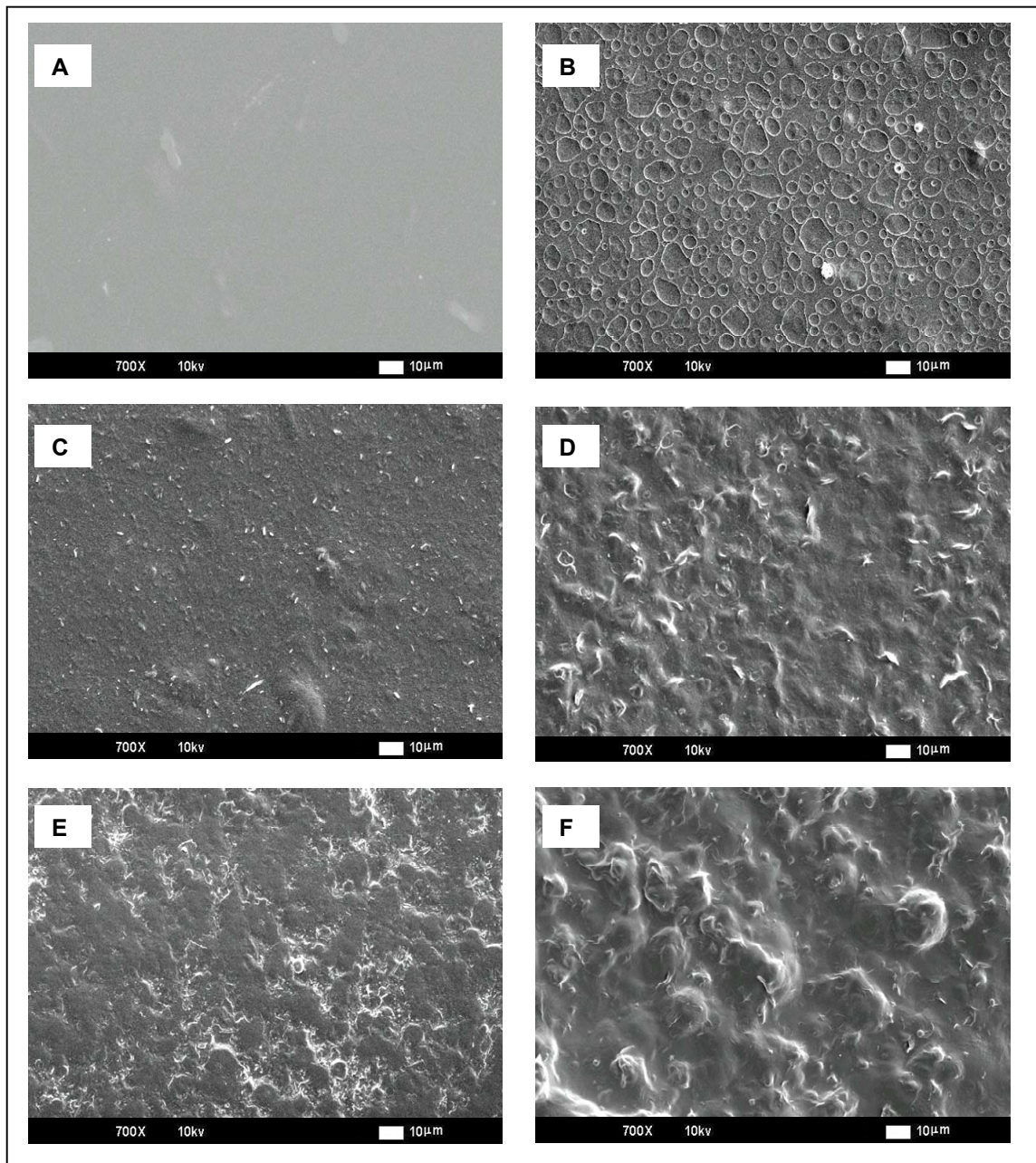


Figura 32. Imagens captadas por microscopia eletrônica de varredura dos seguintes filmes (com ajuste de pH=8,5): (A) Gelatina (700x); (B) Gelatina/Triacetina (700x); (C) Gelatina/Blenda de ácido esteárico-palmítico (700x); (D) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico (700x); (E) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de cana-de-açúcar 5% (700x); (F) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de carnaúba 5% (700x).

Os filmes com ajuste de pH (8,5) apresentaram em todas as formulações uma superfície menos irregular e os glóbulos de lipídios de tamanho menor, o que pode estar relacionado com o distanciamento do pl da proteína (em torno de 4,6 – 5,2) onde a proteína (pH =8,5) teria maior solubilidade devido a sua alta ionização e alta força de repulsão favorecendo assim uma maior interação com o material lipídico.

A adição de triacetina nos filmes emulsionados em pH=8,5 (Figura 32B) apresenta glóbulos de triacetina com tamanho inferior, com relação a este mesmo filme com pH ácido (pH=5,5) como pode ser visualizado na Figura 31B. O ajuste de pH nos filmes contendo substâncias lipídicas provocou alterações significativas, como mostrado nas Figuras 32C, 32D, 32E e 32F diminuindo o tamanho das partículas insolúveis formando uma estrutura menos irregular na superfície dos filmes, comparando com os filmes sem ajuste de pH (Figuras 32C, 32D, 32E e 32F).

A variação do pH pode influenciar diretamente a eficiência do surfactante em estabilizar a emulsão modificando a estrutura final dos filmes emulsionados nos quais os surfactantes foram adicionados. O ajuste de pH (pH=8,5) nos filmes contendo a cera de cana adicionados da mistura de surfactante (3:1 Tween 80/ SDS) tanto na concentração de 160% como na concentração de 120% (em relação à massa seca da gelatina) (Figura 34C e 36E, respectivamente) produz uma superfície menos irregular, em relação aos filmes sem ajuste de pH (Figuras 33E e 35E). Esta observação mostra que os surfactantes agem de forma mais eficaz em pH básico, formando uma estrutura mais regular, o que pode ser devido a maior estabilização da emulsão filmogênica e a melhor incorporação das substâncias hidrofóbicas na matriz polimérica em pH=8,5.

A adição da mistura de surfactante (3:1 Tween 80/SDS na concentração de 160%, em relação à massa seca da gelatina) nos filmes de gelatina (pH=5,5) (Figura 33A) causou uma certa irregularidade porém não significativamente ao ser comparada com o filme de gelatina sem a adição de surfactante (Figura 31A). A adição de (3:1 Tween 80/SDS na concentração de 160%) afetou a estrutura da superfície dos filmes compostos de triacetina, blenda, triacetina e blenda e triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (5%) em pH=5,5 como pode ser observado nas Figuras 33B, 33C, 33D e 33E, respectivamente, ocorrendo uma diminuição na quantidade e na tamanho dos glóbulos de lipídios na superfície, com relação aos mesmos filmes sem a adição da mistura de surfactante (Figuras 31B, 31C, 31D e 31E). Alterando-se o pH para 8,5, a adição de 3:1 Tween 80/SDS, na concentração de 160% nos filmes compostos de gelatina e blenda, blenda e triacetina e blenda, triacetina e cera de cana-de-açúcar (5%), como observado nas Figuras 34A, 34B e 34C, respectivamente, agiu diminuindo os glóbulos de lipídio em tamanho e a superfície apresenta-se quase regular com a presença de alguns micro furos (apenas nos filmes contendo blenda e blenda e triacetina) (Figuras 34A, 34B e 34C), comparados aos filmes sem a adição de surfactante (Figuras 32C, 32D e 32E).

Diminuindo-se a concentração da mistura de surfactante (3:1 Tween 80/SDS) de 160% para 120% tanto nos filmes sem ajuste de pH=5,5 (Figuras 35A, 35B, 35C, 35D e 35E) como nos filmes com ajuste de pH=8,5 (Figuras 36A, 36B, 36C, 36D e 36E) o mesmo comportamento foi observado em relação à mistura de surfactante na concentração de 160%.

A adição da mistura de surfactante (1:1 Tween 80/SDS, na concentração de 120%) nos filmes compostos de gelatina contendo triacetina e blenda e triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (5%) apresentados nas Figuras 34D e 34E, respectivamente, produziu uma superfície na forma de escamas mais regulares (Fig. 34D) e uma superfície toda irregular com a presença de glóbulos de tamanhos diferentes (Figura 34E), com relação ao filme sem a adição do surfactante (Figura 32E).

A adição do surfactante Tween 80 (na concentração de 60%, com relação à massa seca da gelatina) nos filmes com ajuste de pH (8,5) produziu uma melhora na superfície do filme diminuindo os glóbulos dispersos nos filmes compostos a base de gelatina adicionado de triacetina; triacetina e blenda e triacetina, blenda e cera de carnaúba (5%), Figuras 37B, 37C e 37D, respectivamente, com relação aos filmes sem a adição de surfactante (Figuras 32B, 32D e 32F). Já nos filmes simples de gelatina a adição do Tween 80 parece ter aumentado a irregularidade da superfície do filme (Figura 37A), se comparado com o filme sem a adição de surfactante (Figura 32A).

Várias combinações de surfactantes foram testadas como a adição da mistura 3:1 SDS/Tween 80 (na concentração 80%, em relação à massa seca da gelatina) nos filmes (pH=8,5) compostos de triacetina e blenda e de triacetina, blenda e cera de carnaúba (Figuras 38A e 38B, respectivamente) onde a adição desta mistura aumentou a irregularidade da superfície do filme analisada pela MEV, se comparada com os filmes sem a adição de surfactante (Figura 32D e 32F). Aumentando-se a concentração da mistura (3:1 SDS/Tween 80) de 80 para 120% nos filmes emulsionados (pH=8,5) contendo cera de carnaúba (Figura 38C) a irregularidade da superfície diminui apresentando apenas algumas partículas insolúveis, com relação ao filme contendo 80% de 3:1 SDS/Tween 80 (Figura 38B) e também com relação ao filme sem a adição de surfactante (Figura 32F). Os filmes (pH=8,5) adicionados da mistura 1:1 Tween 80/SDS (na concentração de 100%, com relação à massa seca da gelatina) (Figura 38D) apresentaram um aumento na irregularidade no tamanho e distribuição das partículas na superfície do filme, com relação ao filme sem a presença do surfactante (Figura 32F).

O aumento na irregularidade da superfície de alguns filmes com a adição de algumas misturas de surfactantes, pode também ter sido produzido pelo processo de secagem do filme alterando a distribuição dos glóbulos de lipídio na superfície e o seu tamanho. DEBEAUFORT, QUEZADA-GALLO e VOILLEY (1995) verificaram que o processo de secagem dos filmes afeta diretamente a estrutura do filme e analisaram a distribuição dos lipídios utilizando várias formas de secagem, alterando a temperatura, umidade relativa e a velocidade da circulação

de ar em filmes emulsionados de metilcelulose e cera de parafina. Concluíram que a secagem lenta a 25°C e 40% UR foi mais eficiente na distribuição dos glóbulos de lipídios (dispersos de maneira mais homogênea em toda a espessura do filme), que a secagem rápida a 45°C e 15% UR onde os glóbulos de parafina ficaram concentrados na superfície do filme em contato com o ar apresentando assim uma distribuição heterogênea e glóbulos de lipídios maiores.

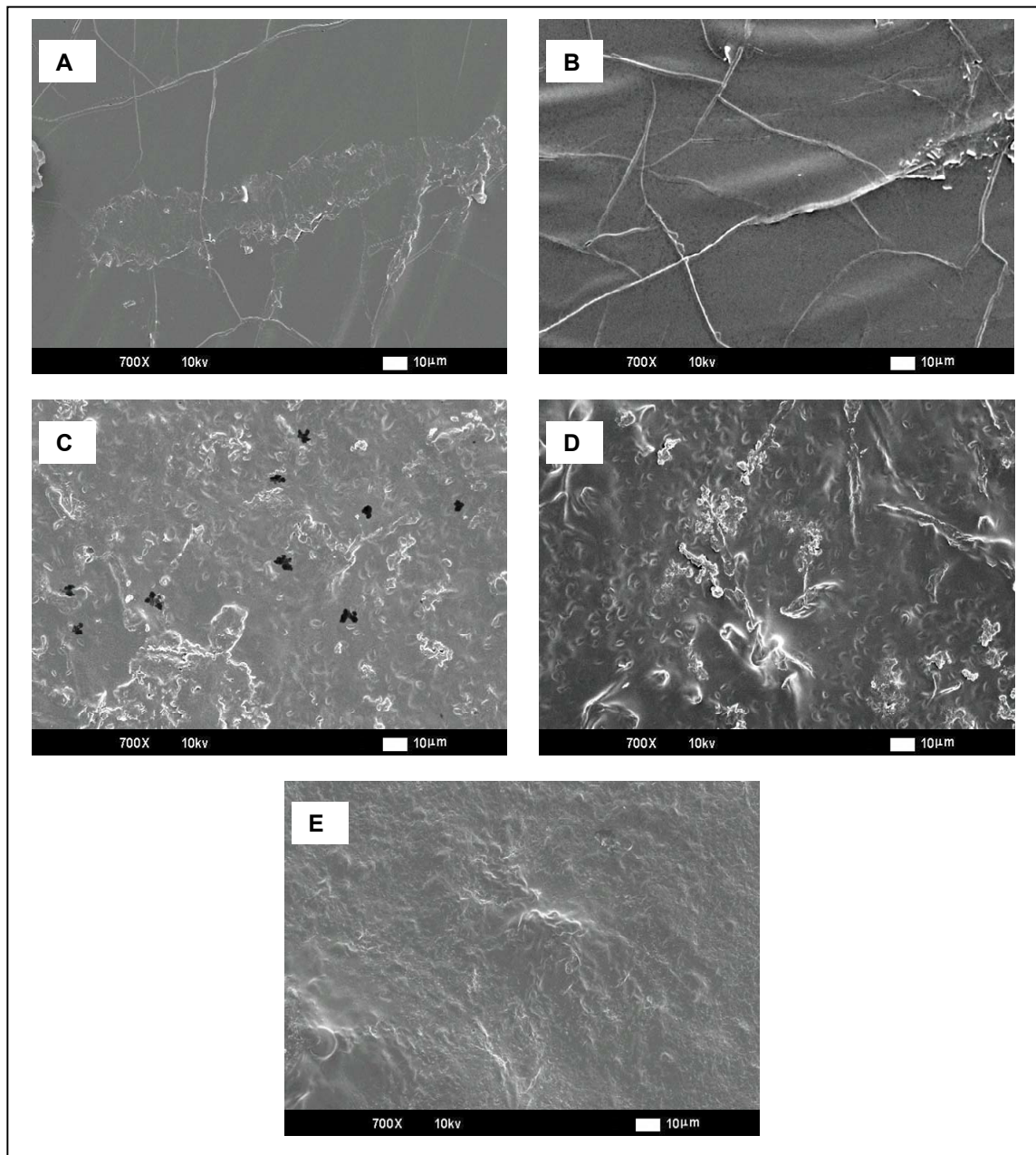


Figura 33. Imagens captadas por microscopia eletrônica de varredura dos seguintes filmes adicionados de 160% da mistura de surfactantes, (75% da mistura Tween 80 e 25% SDS) (sem ajuste de pH=5,5): (A) Gelatina (700x); (B) Gelatina/Triacetina (700x); (C) Gelatina/Blenda de ácido esteárico-palmitico/ (700x); (D) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmitico (700x); (E) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmitico/Cera de cana-de-açúcar 5% (700x).

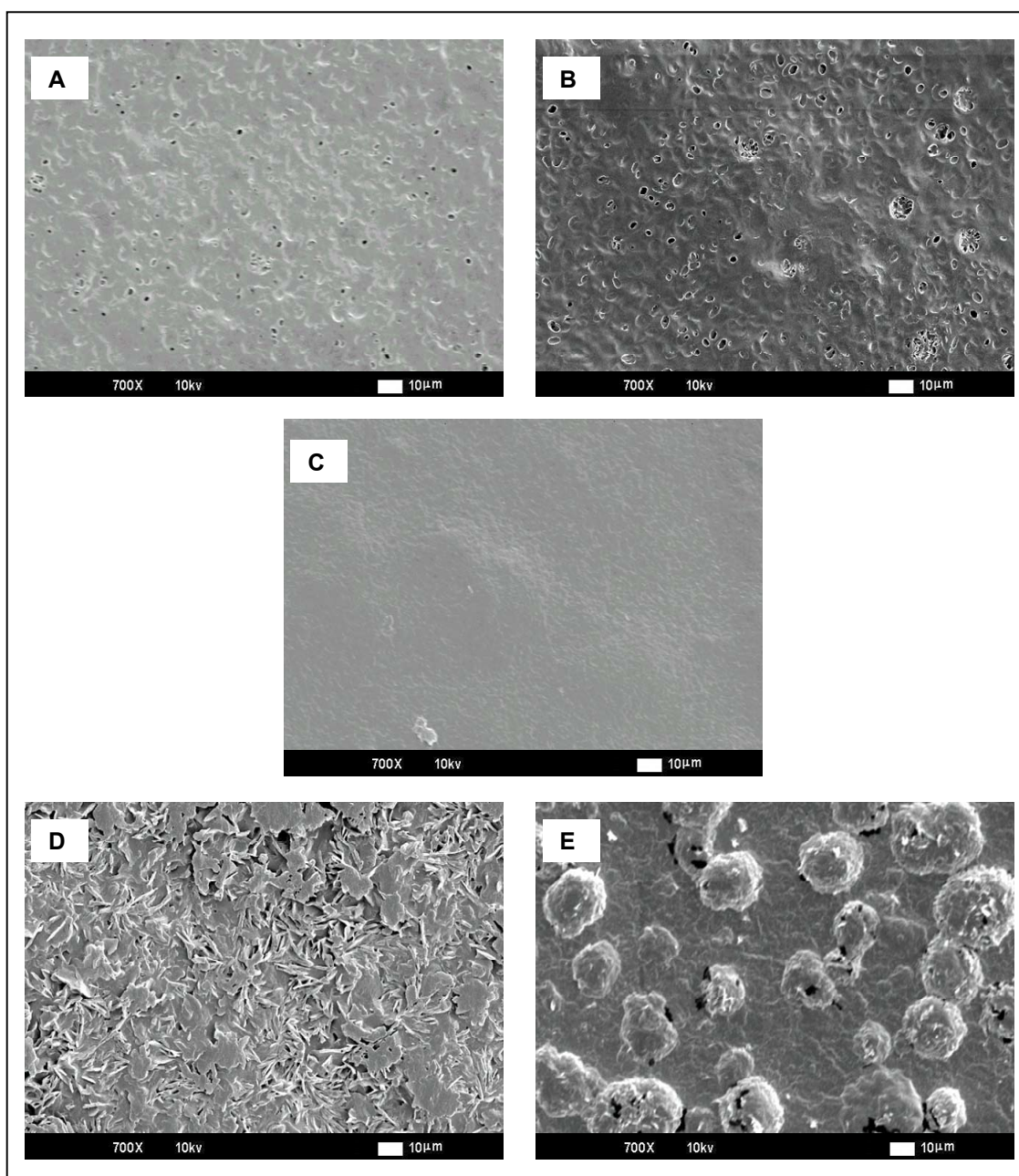


Figura 34. Imagens captadas por MEV dos seguintes filmes adicionados de 160% da mistura de surfactantes, (75% da mistura Tween 80 e 25% SDS) (com ajuste de pH=8,5): (A) Gelatina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico (700x); (B) Gelatina/Triacetina/Blenda de ácido esteárico-palmítico (700x); (C) Gelatina/Triacetina/Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de cana-de-açúcar 5% (700x) e adicionando 120% da mistura de surfactantes, (50% da mistura Tween 80 e 50% SDS) (com ajuste de pH=8,5) nas seguintes formulações: (D) Gelatina/Triacetina/Blenda de ácido esteárico-palmítico (700x); (E) Gelatina/Triacetina/Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de cana-de-açúcar 5% (700x).

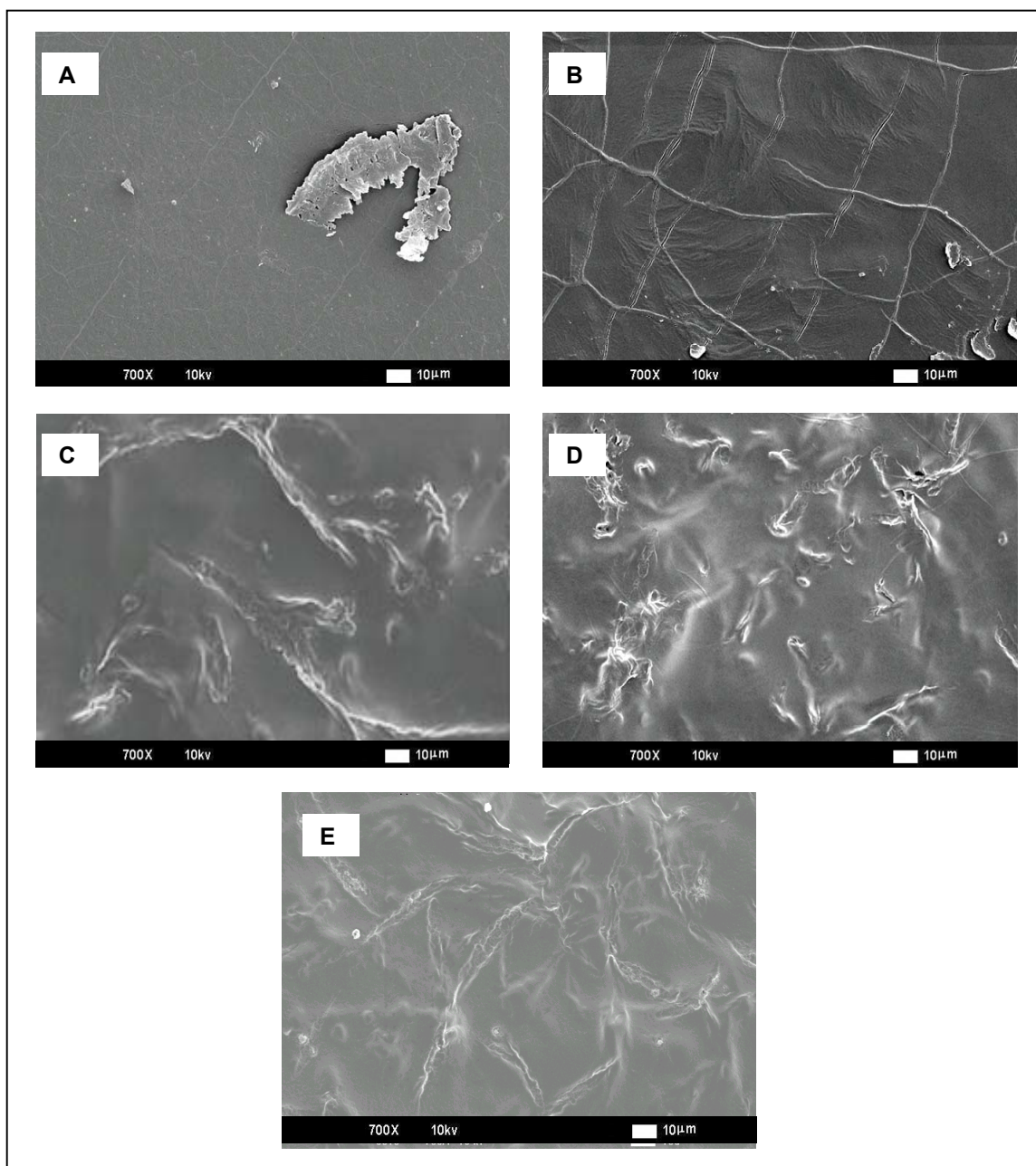


Figura 35. Imagens captadas por microscopia eletrônica de varredura dos seguintes filmes adicionados de 120% da mistura de surfactantes, (75% da mistura Tween 80 e 25% SDS) (sem ajuste de pH=5,5) de ácido esteárico-palmitico/ (700x); (D) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmitico (700x); (E) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmitico/Cera de cana-de-açúcar 5% (700x).

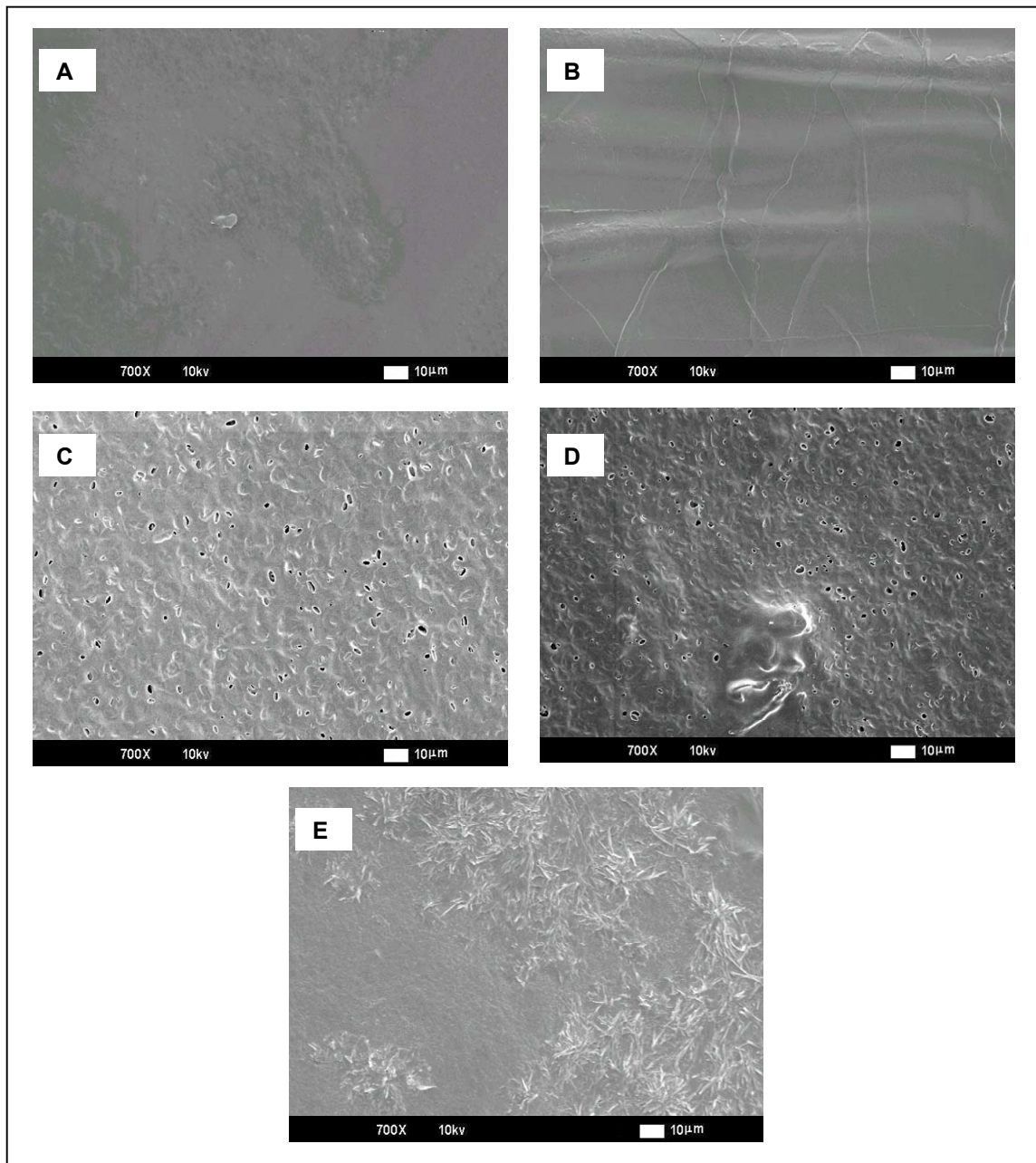


Figura 36. Imagens captadas por microscopia eletrônica de varredura dos seguintes filmes adicionados de 120% da mistura de surfactantes, onde 75% da mistura Tween 80 e 25% SDS (com ajuste de pH=8,5): (A) Gelatina (700x); (B) Gelatina/Triacetina (700x); (C) Gelatina/Blenda de ácido esteárico-palmitico/ (700x); (D) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmitico (700x); (E) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmitico/Cera de cana-de-açúcar 5% (700x).

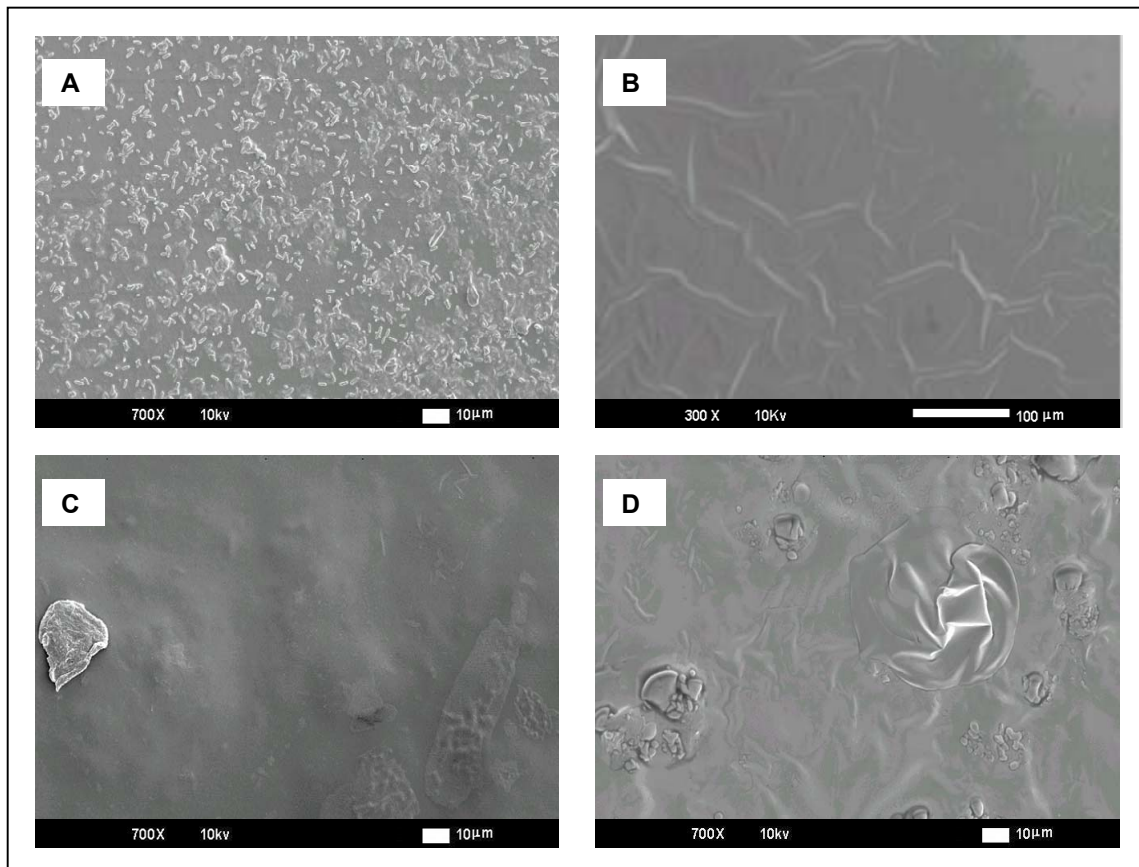


Figura 37. Imagens captadas por microscopia eletrônica de varredura dos seguintes filmes adicionados de 60% de Tween 80 (com ajuste de pH=8,5): (A) Gelatina (300x); (B) Gelatina/Triacetina (300x); (C) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico (700x); (D) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de carnaúba 5% (700x).

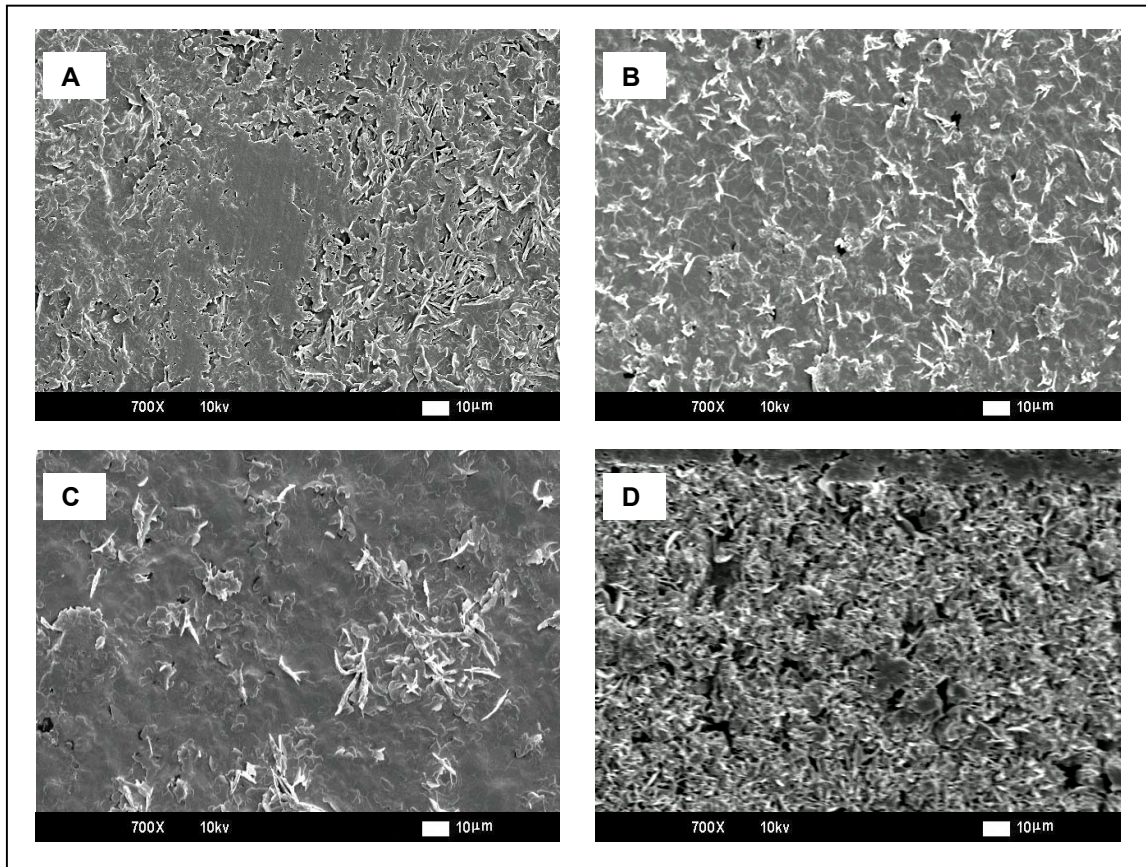


Figura 38. Imagens captadas por microscopia eletrônica de varredura dos seguintes filmes adicionados de 80% da mistura de surfactante, (75% da mistura SDS e 25% da mistura Tween80) (com ajuste de pH=8,5): (A) Gelatina/Blenda de ácido esteárico-palmítico (700x); (B) Gelatina/Triacetina/Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de carnaúba 5% (700x) (C) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de carnaúba 5%/ 120% de mistura de surfactantes, (25% da mistura Tween 80 e os outros 75% SDS) (700x); (D) Gelatina/Triacetina/ Blenda de ácido esteárico-palmítico/Cera de carnaúba 5%/ 100% de mistura de surfactantes, (50% da mistura Tween 80 e os outros 50% SDS) (700x).

4.7 Microscopia confocal de varredura laser

Neste trabalho a MCVL foi utilizada para complementar a MEV, permitindo uma visualização interna dos filmes enquanto a MEV imagens de superfície. Foram observados 5 tipos de imagens pela MCVL entre elas: DIC (Contraste Interferencial Diferencial de fase), FITC proteína corada com FITC (isotiocianato de fluoresceína), Nile Red material hidrofóbico corado com Nile Red, Merge (imagens obtidas pela sobreposição de FITC, Nile Red e DIC) e FITC-Nile Red (sobreposição das imagens de FITC e Nile Red). A microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) apresenta-se hoje como uma ferramenta muito importante na obtenção de imagens de alta resolução. Esta técnica permite visualizar a estrutura morfológica do filme em qualquer nível de profundidade no interior da matriz do filme, combinando princípios de microscopia e fluorescência.

Nos filmes de gelatina e triacetina (10%) com pH=5,5 observa-se na Figura 39, a distribuição das partículas de triacetina na matriz protéica, na Figura 39A, onde as partículas de triacetina observadas no modo DIC aparecem pequenas e distribuídas de forma homogênea. Os pontos vermelhos são caracterizados pelas partículas de triacetina (Figura 39B). Na Figura 39C evidencia-se a dispersão homogênea da matriz protéica no filme, enquanto na Figura 39D tem-se a sobreposição das 3 imagens captadas mostrando a distribuição das partículas de triacetina que sofreram ligeira migração para a superfície do filme, observação feita visualmente.

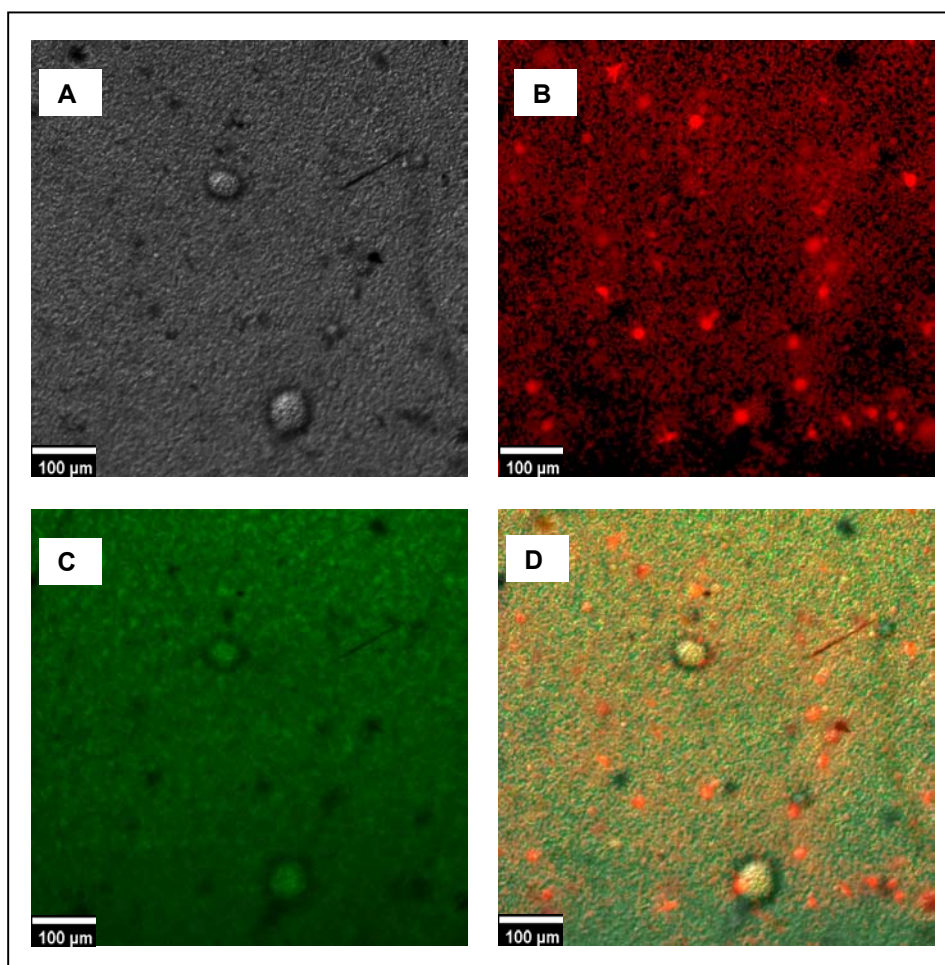


Figura 39. Imagens captadas por microscopia confocal a laser (20x) de filme (sem ajuste de pH=5,5) de gelatina, triacetina (10%). (A) DIC (Contraste Interferencial Diferencial de fase); (B) Nile Red (triacetina corada com Nile Red); (C) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (D) Merge (sobreposição da gelatina corada –FITC, triacetina corada com Nile Red e do DIC).

A adição de ácido graxo na forma de blenda de esteárico-palmítico nos filmes a base de gelatina (pH=5,5), pode ser observada na Figura 40. A blenda de ácidos graxos esta distribuída de forma irregular e seus glóbulos apresentam tamanhos diferenciados, com o mesmo comportamento verificado através da MEV (Figura 31C). Ao se sobrepor às imagens de FITC (Figura 40C) (proteína corada de verde) e Nile Red (Figura 40B) (material hidrofóbico corado de vermelho), pode-se observar os glóbulos de lipídios na coloração alaranjada (Figura 40D e 40E).

Nos filmes (pH=5,5) compostos de triacetina e blenda de ácido esteárico-palmítico (Figura 41C), observa-se que o tamanho dos glóbulos de lipídios são inferiores e sua distribuição esta menos irregular dentro da estrutura do filme, quando comparado com o filme contendo apenas blenda de ácido esteárico-palmítico (Figura 40D). Esta comparação pode ser melhor visualizada na sobreposição da imagem de FITC-Nile Red Figuras 40D (filmes contendo blenda) e na 41C (contendo além da blenda a triacetina).

Ao se adicionar as ceras de cana-de-açúcar (Figura 42A, B e C) e de carnaúba (Figura 43A, B e C) aos filmes compostos (pH=5,5) de gelatina, triacetina e blenda observou-se que os glóbulos de lipídios tendem a ficar com tamanhos variados e mais irregulares com a adição das ceras em relação aos filmes de gelatina, triacetina e blenda com pH ácido (Figura 41C). A adição destas ceras (de cana-de-açúcar ou carnaúba) nos filmes em pH alcalino (Figuras 42D, E e F) para os filmes contendo cera de cana e Figuras 43D, E e F para os filmes contendo cera de carnaúba observa-se que os filmes sofrem uma mudança acentuada em sua morfologia onde glóbulos de material lipídico não são mais observados. Os filmes não apresentam uma matriz totalmente heterogênea, mas ela é bastante melhorada por decorrência do ajuste de pH em concordância com os resultados obtidos para PVA onde filmes com pH ajustado para 8,5 e sem a adição de surfactante tiveram a PVA abaixada em relação aos filmes em pH natural.

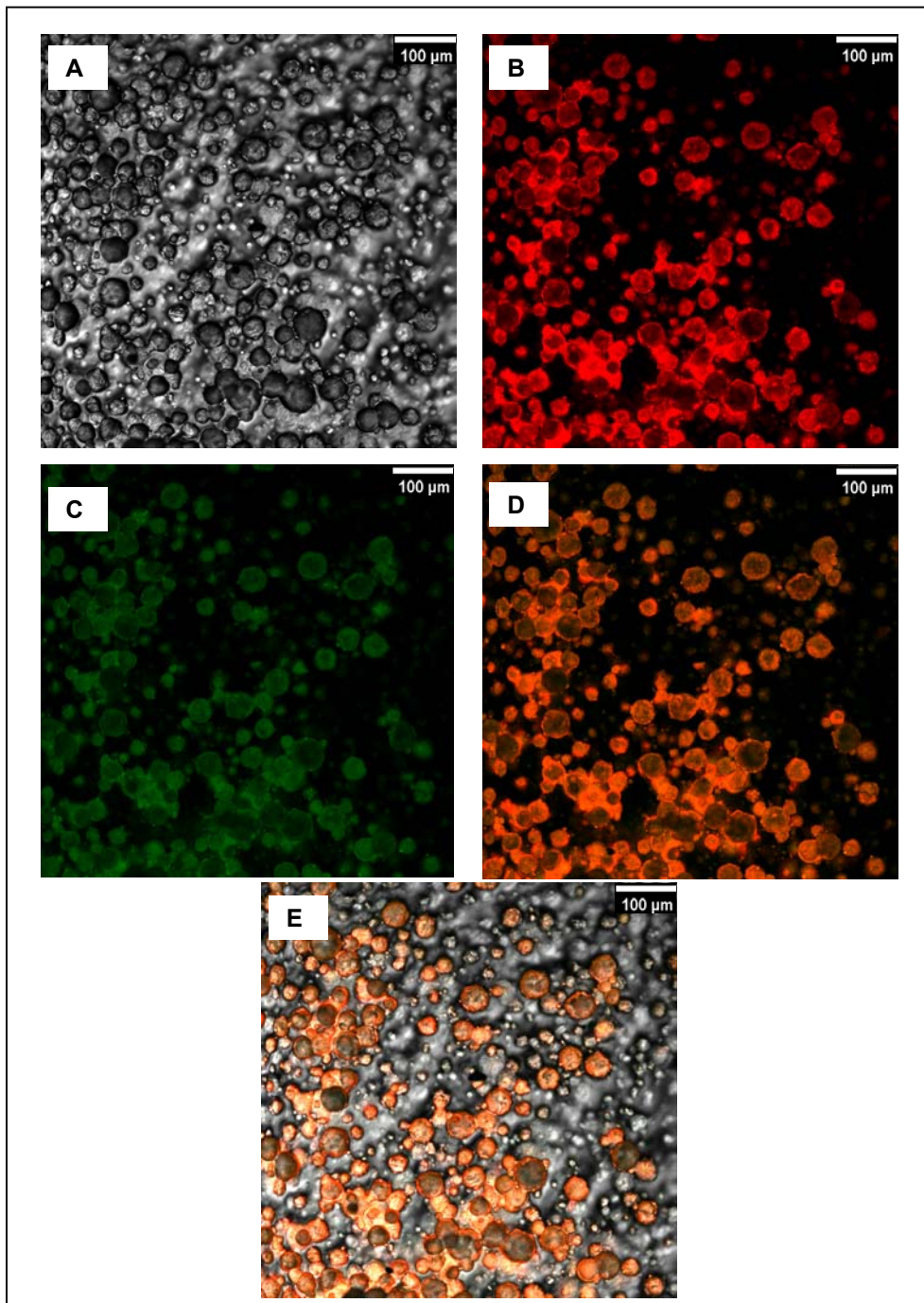


Figura 40. Imagens captadas por microscopia confocal a laser (20x) de filme (sem ajuste de pH=5,5) de gelatina e blenda de ácido esteárico-palmitico (20%). (A) DIC (Contraste Interferencial Diferencial de fase); (B) Nile Red (blenda corada com Nile Red); (C) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (D) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada –FITC, blenda corada com Nile Red); (E) Merge (sobreposição da gelatina corada –FITC, triacetina corada com Nile Red e do DIC).

Em todas as análises efetuadas até agora, o ajuste de pH interferiu significativamente nas propriedades funcionais dos filmes emulsionados e na sua morfologia superficial. Nas Figuras 41 a 43, verificam-se distribuições diferenciadas entre os filmes elaborados em pH ácido e pH alcalino.

Ao se comparar os filmes com ajuste de pH (pH=8,5) em relação aos filmes sem ajuste de pH (pH=5,5), observou-se que o ajuste de pH nos filmes emulsionados melhorou de forma geral a distribuição dos glóbulos de lipídios e também reduziu o tamanho destes, facilitando assim sua incorporação dos lipídios na matriz protéica.

No caso dos filmes adicionados da mistura de surfactantes (3:1 Tween 80/SDS) na concentração de 160%, apresentadas nas Figuras 44C (sem ajuste de pH) e 44F (com ajuste de pH), observa-se que neste caso o ajuste de pH não apresenta diferença significativa nas duas imagens de MCVL- FITC- Nile red sobrepostas nas duas condições de pH. O mesmo comportamento foi observado para a mesma mistura de surfactante na concentração de 120% (em relação à massa seca da gelatina), como pode ser observado nas Figuras 45C (para os filmes sem ajuste de pH) e 45F (para os filmes com ajuste de pH). Efeito negativo da associação do pH alcalino e a adição de surfactantes foi evidenciado na avaliação das propriedades físicas dos filmes nos itens anteriores.

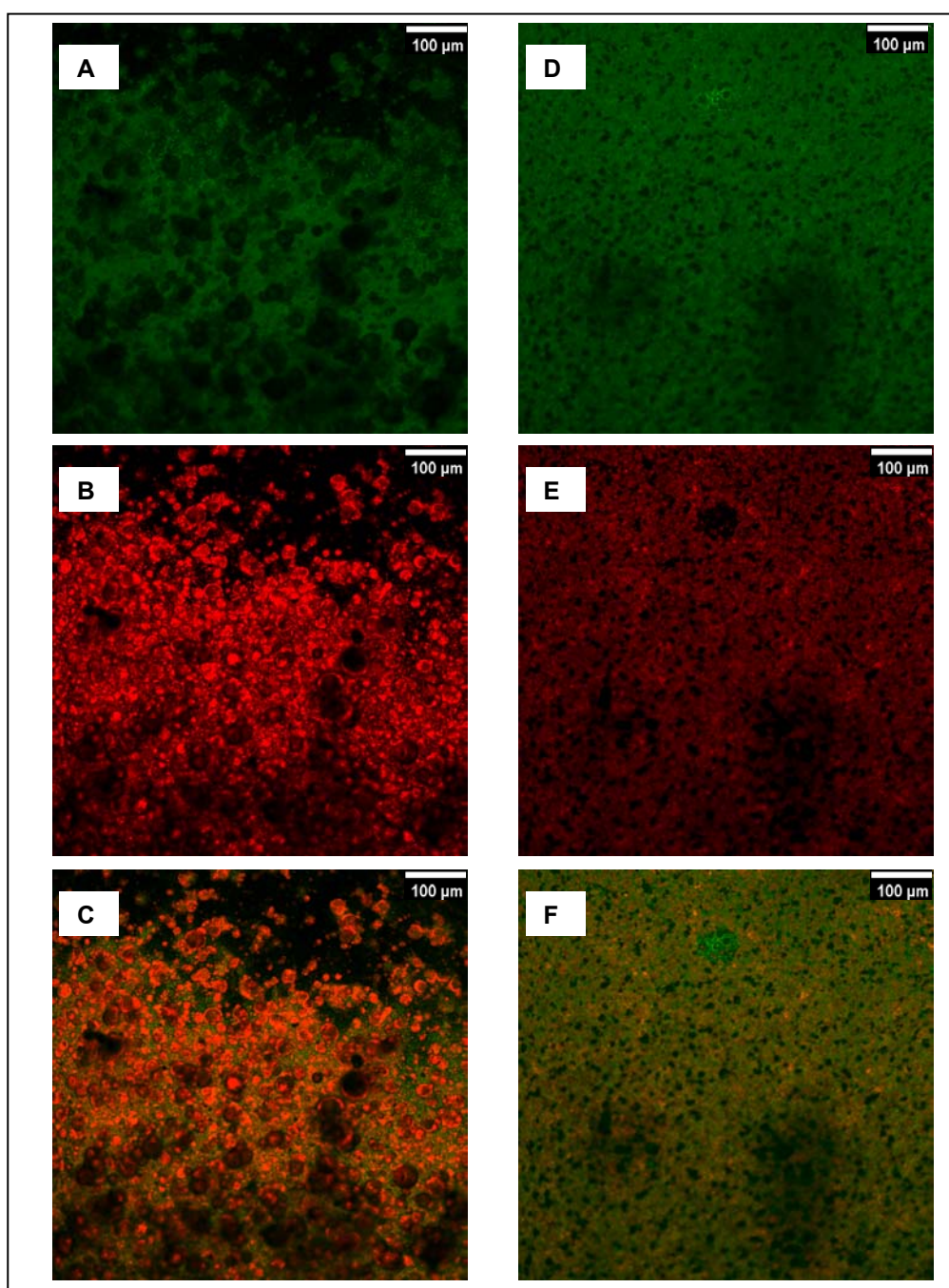


Figura 41. Imagens captadas por microscopia confocal a laser (20x) de filme de gelatina, triacetina(10%), blenda de ácido esteárico-palmitico (20%), sem ajuste de pH=5,5: (A) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (B) Nile Red (triacetina e blenda corada com Nile Red); (C) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada –FITC, triacetina e blenda corada com Nile Red); e filmes com ajuste de pH=8,5: (D) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (E) Nile Red (triacetina e blenda corada com Nile Red); (F) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada – FITC, triacetina e blenda corada com Nile Red).

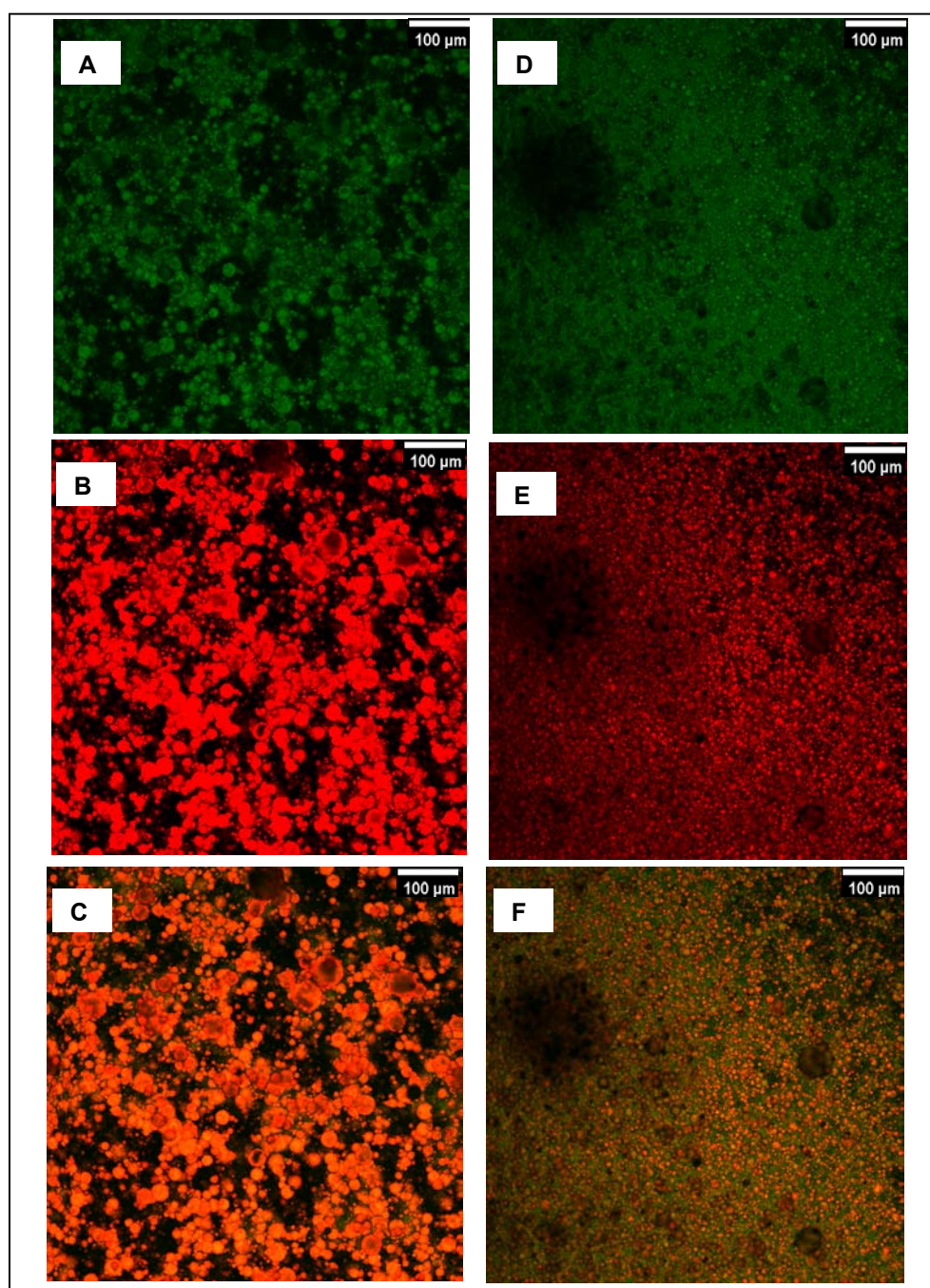


Figura 42. Imagens captadas por microscopia confocal a laser (20x) de filme de gelatina, triacetina (10%), blenda de ácido esteárico-palmitico (20%) e cera de cana-de-açúcar (5%), sem ajuste de pH=5,5: (A) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (B) Nile Red (triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); (C) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada –FITC, triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); e filmes com ajuste de pH=8,5: (D) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (E) Nile Red (triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); (F) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada – FITC, triacetina, blenda e cera corada com Nile Red).

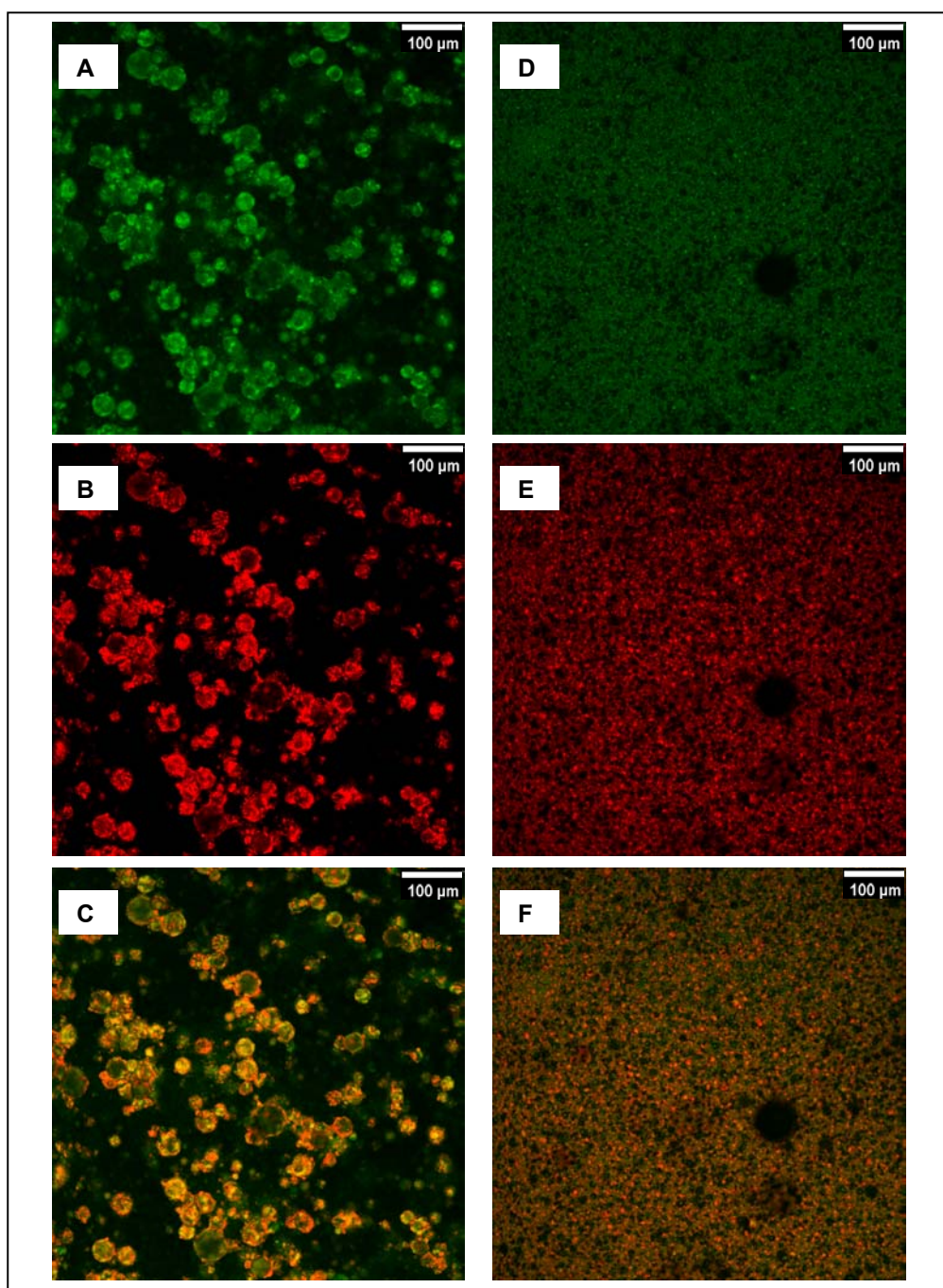


Figura 43. Imagens captadas por microscopia confocal a laser (20x) de filme de gelatina, triacetina (10%), blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) e cera de carnaúba (5%), sem ajuste de pH=5,5: (A) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (B) Nile Red (triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); (C) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada –FITC, triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); e filmes com ajuste de pH=8,5: (D) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (E) Nile Red (triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); (F) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada – FITC, triacetina, blenda e cera corada com Nile Red).

A mistura de surfactante (3:1 Tween 80/SDS, na concentração de 160%) adicionada aos filmes (pH=5,5) de triacetina, blenda e cera de cana-de-açúcar (Figura 44C) alterou profundamente a estrutura morfológica comparado aos filmes sem a adição do surfactante (Figura 42C). Nas imagens (Figura 44C e 45C) dos filmes contendo a mistura de surfactante (3:1 Tween 80/SDS) nas concentrações 160 e 120%, respectivamente, tem-se a sobreposição da FITC e do Nile Red onde as imagens mostraram-se em geral homogêneas e com coloração amarelo-alaranjado com a presença de pontos pretos menores nos filmes com pH=5,5, se comparados com os filmes sem a adição de surfactante (Figura 42C). Em pH alcalino (pH=8,5) as imagens dos filmes adicionados da mistura de surfactante (3:1 Tween 80/SDS) tanto na concentração de 160 (Figura 44F) como na de 120% (Figura 45F) apresentam imagem semelhante aos filmes sem ajuste de pH (Figuras 44C e 45C), exceto pelos pontos pretos que ficam maiores e mais numerosos.

Ao se sobrepor às imagens observa-se outras cores como amarelo laranja, o aparecimento dessas cores na MCVL parece ser consequência da mistura em diversas proporções dos corantes (FITC e Nile Red). A mistura do verde com o vermelho em diversas proporções produz variação de coloração entre laranja a amarelo (OTTERSTATTER, 1999).

A adição do Tween 80, na concentração de 60% (Figuras 46C) nos filmes emulsionados contendo cera de carnaúba, produz uma imagem que apresenta cores bem distintas com amarelo no fundo manchas verdes e glóbulos marrons dispersos irregularmente (sobreposição do FITC e Nile Red). Esta morfologia irregular alterou a valor da PVA de 5,12 gmm/m²dkPa (para os filmes de cera de carnaúba sem a adição de Tween 80) para 10,05 gmm/m²dkPa (para os filmes de cera de carnaúba contendo Tween 80). A mistura de surfactante 1: 1 Tween 80/SDS pode ser melhor evidenciada na Figura 46F com a sobreposição do FITC e Nile Red mostrando uma coloração uniforme com fundo alaranjado com manchas pretas e glóbulos verdes dispersos. Já na mistura 3:1 SDS/Tween 80 (Figura 47D) adicionada aos filmes (pH=8,5) contendo cera de carnaúba, a sobreposição do FITC, Nile Red e DIC mostra partículas (pretas e alaranjadas)

dispersas de forma homogênea em toda a área analisada com fundo de coloração verde-amarelado.

A eficiência da ação do surfactante (na forma de mistura de 2 surfactantes ou utilizados puros) pode ser melhor verificada nas imagens de MCVL com sobreposição de FITC-Nile Red, onde as colorações alaranjadas ou amareladas denota que os compostos lipídicos de certa forma incorporaram-se mais efetivamente na matriz protéica do filme.

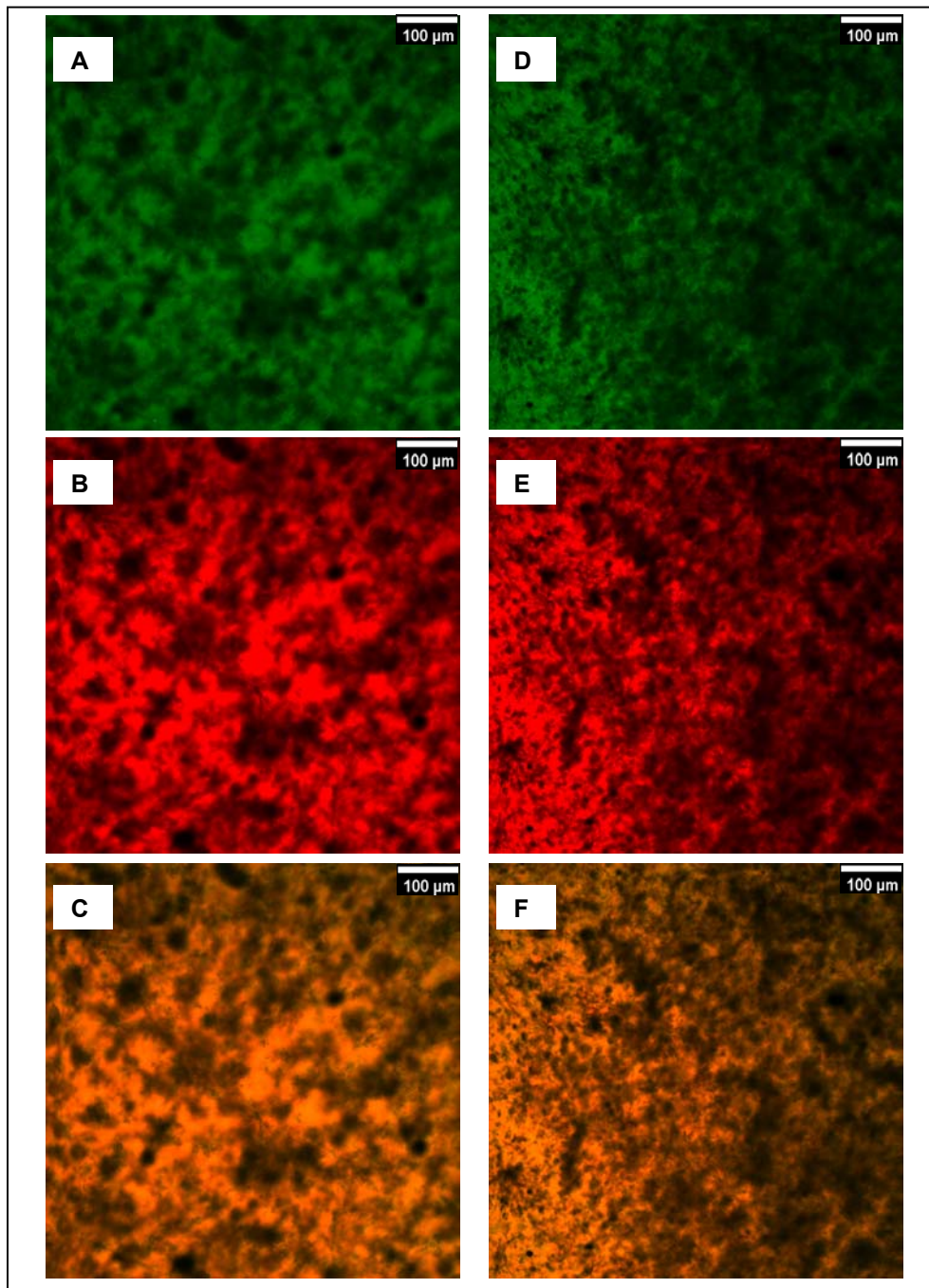


Figura 44. Imagens captadas por microscopia confocal a laser (20x) de filme de gelatina, triacetina (10%), blenda de ácido esteárico-palmítico (20%), cera de cana-de-açúcar (5%) e 160% da mistura de surfactantes (75% de Tween/25% SDS), sem ajuste de pH=5,5: (A) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (B) Nile Red (triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); (C) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada –FITC, triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); e filmes com ajuste de pH=8,5: (D) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (E) Nile Red (triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); (F) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada – FITC, triacetina, blenda e cera corada com Nile Red).

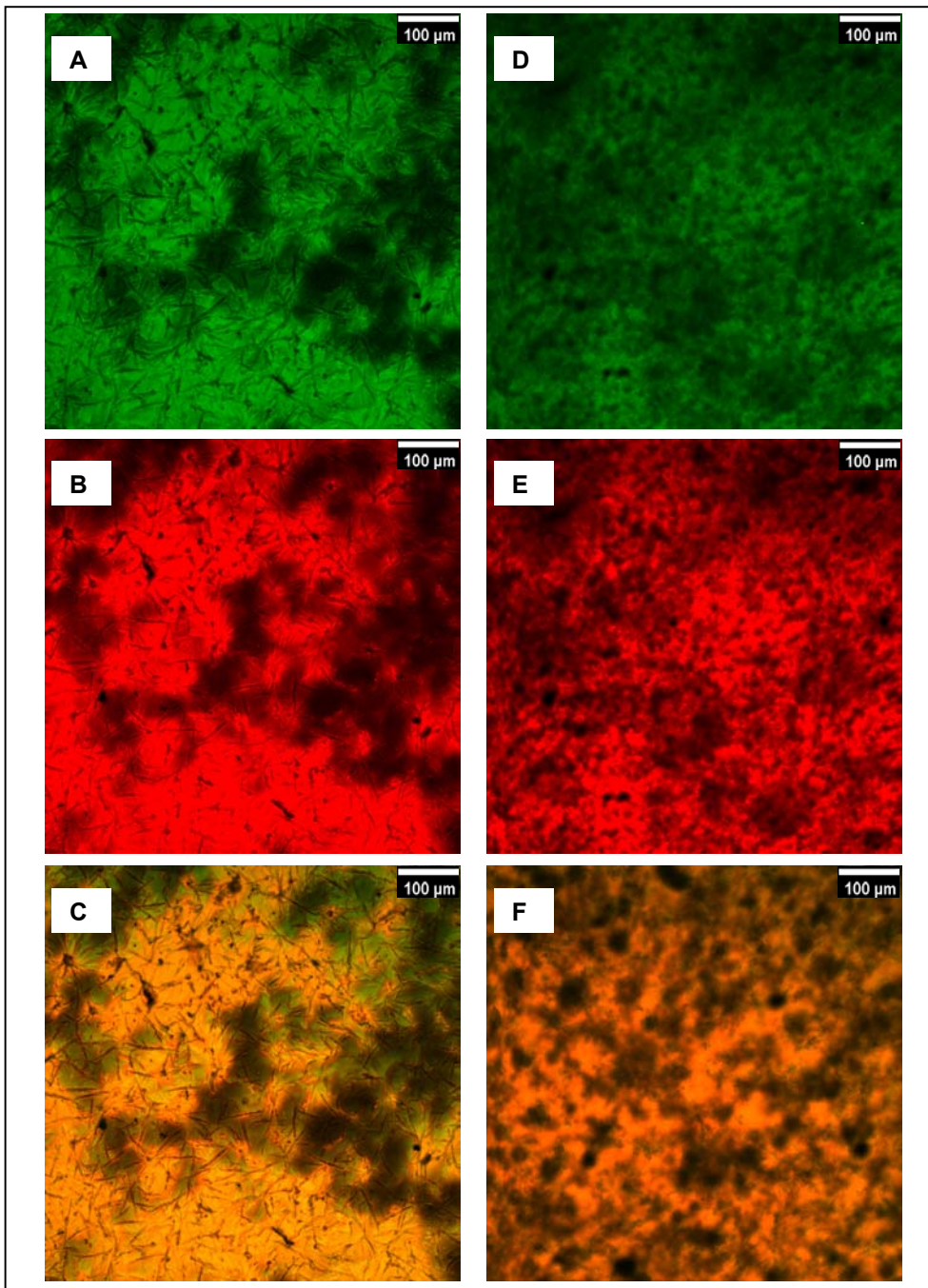


Figura 45. Imagens captadas por microscopia confocal a laser (20x) de filme de gelatina, triacetina (10%), blenda de ácido esteárico-palmitico (20%), cera de cana-de-açúcar (5%) e 120% da mistura de surfactantes (75% de Tween/25% SDS), sem ajuste de pH=5,5: (A) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (B) Nile Red (triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); (C) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada –FITC, triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); e filmes com ajuste de pH=8,5: (D) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (E) Nile Red (triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); (F) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada – FITC, triacetina, blenda e cera corada com Nile Red).

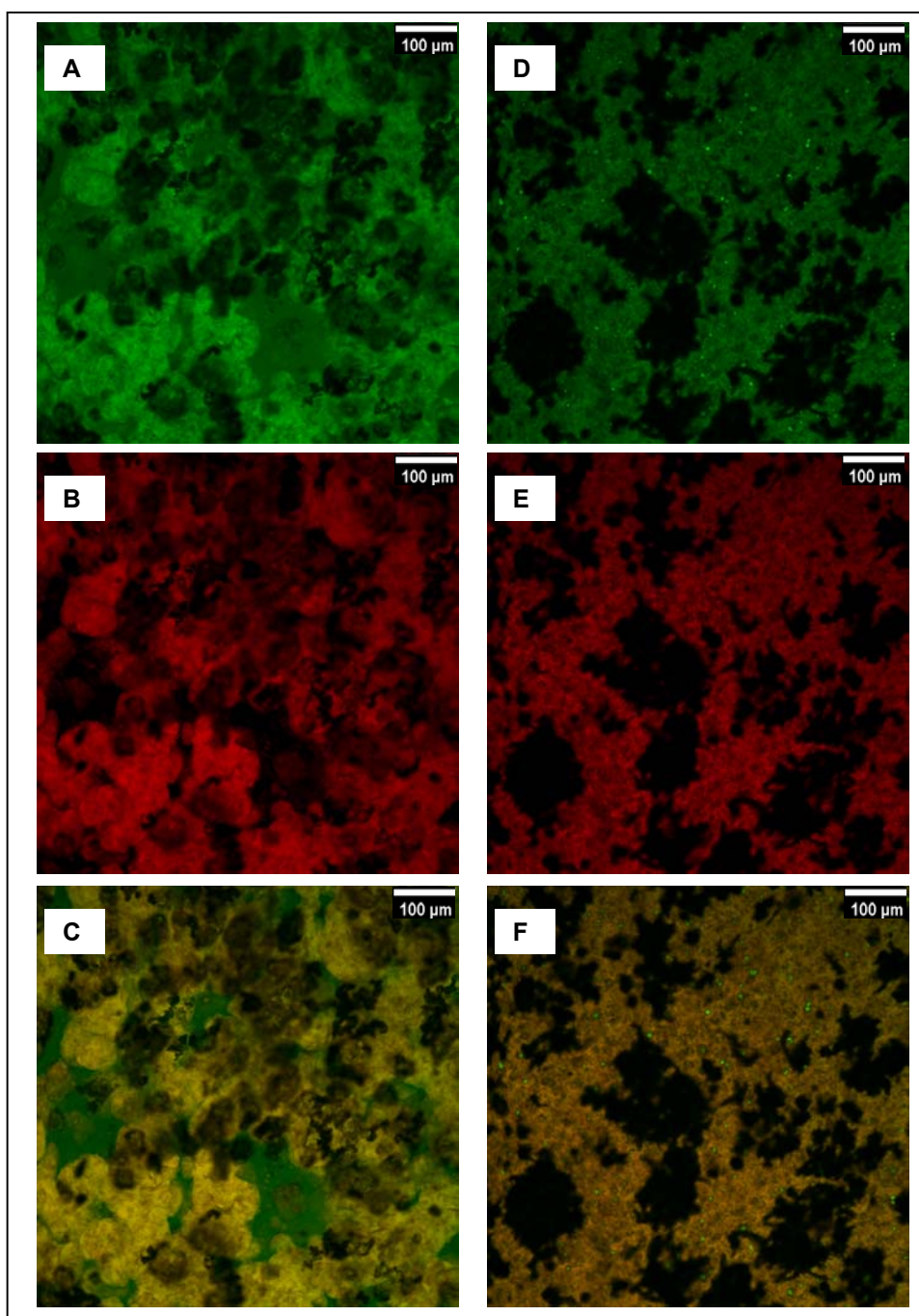


Figura 46. Imagens captadas por microscopia confocal a laser (20x) de filme (com ajuste de pH=8,5) de gelatina, triacetina (10%), blenda de ácido esteárico-palmitico (20%), cera de carnaúba (5%), adicionados de 60% de Tween: (A) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (B) Nile Red (triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); (C) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada –FITC, triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); e filmes adicionados de 100% de mistura de surfactante (50% de Tween/50% de SDS) : (D) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (E) Nile Red (triacetina, blenda e cera corada com Nile Red); (F) FITC-Nile Red (sobreposição da gelatina corada – FITC, triacetina, blenda e cera corada com Nile Red).

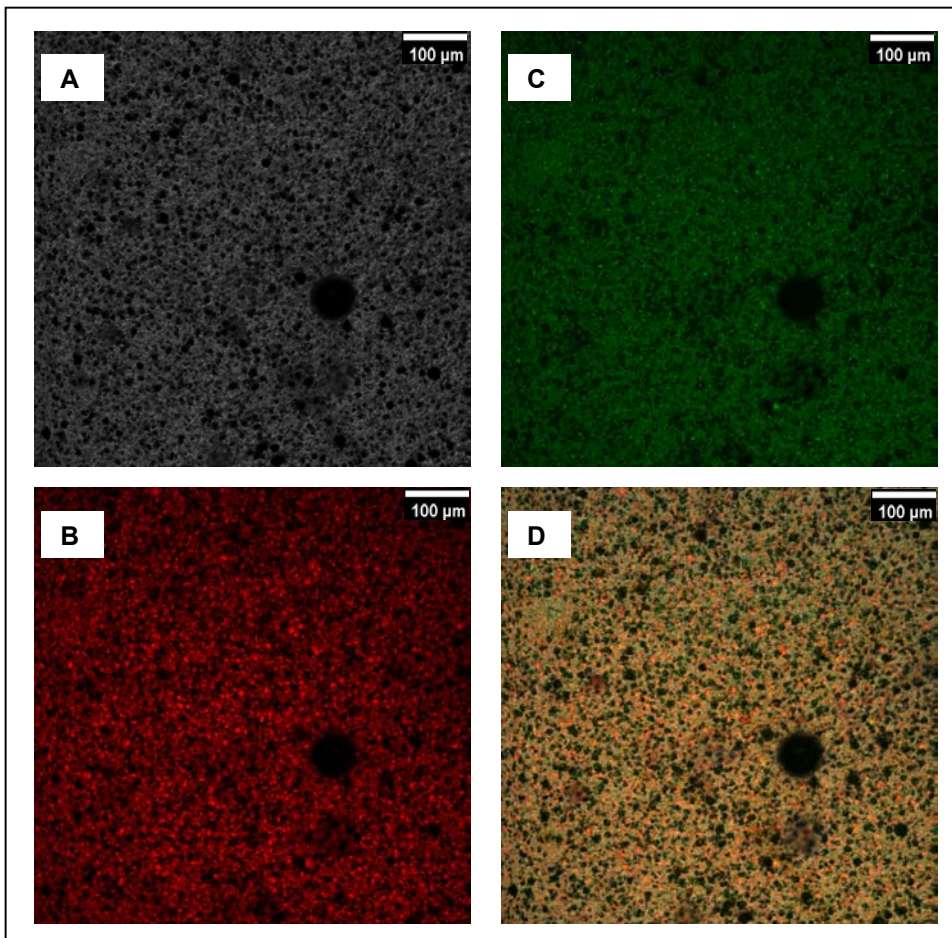


Figura 47. Imagens captadas por microscopia confocal a laser (20x) de filme (com ajuste de pH=8,5) de gelatina, triacetina (10%), blenda de ácido esteárico-palmitico (20%), cera de carnaúba (5%) e 80% de mistura de surfactante (75% de SDS/ 25% de Tween): (A) DIC (Contraste Interferencial Diferencial de fase); (B) Nile Red (triacetina, blenda e cera coradas com Nile Red); (C) FITC (isotiocianato de fluoresceína corando a gelatina); (D) Merge (sobreposição da gelatina corada –FITC, triacetina, blenda e cera coradas com Nile Red e do DIC).

4.8 Isotermas de Sorção

A isoterma de sorção descreve matematicamente o comportamento entre o conteúdo de umidade e atividade de água de materiais biológicos. A obtenção da isoterma é muito importante para os biofilmes, pois mede o quanto os filmes são sensíveis à umidade determinando assim o seu tempo de armazenamento e sua funcionalidade em geral (YANG; PAULSON, 2000b). Além de determinar a funcionalidade dos biofilmes a isoterma é uma ferramenta que oferece informações importantes do teor de umidade de equilíbrio dos filmes poliméricos, indicando o comportamento dos filmes protéicos quanto às propriedades de barreira em diferentes umidades relativas (KIN; USTUNOL, 2001).

O teor de umidade de equilíbrio foi determinado e as equações BET (Brunauer-Ermmett-Teller) e GAB (Guggenheim-Anderson-de Bôer) foram determinadas para ajustar os dados experimentais. Os resultados obtidos para cada filme mostraram que o modelo GAB foi o que apresentou maiores valores de R^2 (Tabela 34 e 35) para a maioria das formulações analisadas e desta forma as curvas obtidas para cada filme foram ajustadas segundo o modelo GAB conforme também adotado para filmes emulsionados de gelatina e breu branco (BERTAN, 2003), em filmes a base de gelatina (LIN; MINE; TUNG, 1999) e em filmes emulsionados de proteína do soro do leite (KIN; USTUNOL, 2001).

As isotermas de sorção observadas nas Figuras 48 e 49 apresentam forma sigmoideal, forma mais característica de sistemas com alto teor protéico, que se apresentam mais sensíveis à variação da umidade relativa. A forma sigmoideal das isotermas de sorção foram observadas para os filmes a base de proteína de trigo (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1993). LIN; MINE e TUNG (1999) explicam este comportamento da curva pela 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.

Analisando-se a Figura 48 observa-se que o filme de gelatina, triacetina, blenda de ácido esteárico-palmítico e cera de cana-de-açúcar em pH=5,5

absorveu mais água em toda faixa de atividade de água (a_w) estudada que o mesmo filme com ajuste de pH=8,5. A adição da mistura de surfactante (3:1 Tween 80/SDS, na concentração 160%) nos filmes sem ajuste de pH aumentou a adsorção de água, com relação aos filmes sem adição de surfactante (foi o filme que mais absorveu água, o ajuste de pH (8,5) nos filmes emulsionados contendo 3:1 Tween 80/SDS, na concentração 160% causou a redução na adsorção de água na faixa de 0 até 0,4 de a_w e aumento da absorção acima de 0,4 a_w).

Na Tabela 34, observa-se que o filme a base de gelatina de cera de cana-de-açúcar com a presença da mistura 3:1 Tween 80/SDS, na concentração de 160% (pH=5,5), que absorveu mais água, foi também o que apresentou maior quantidade de água na monocamada GAB ou BET. Por outro lado o filme que adsorveu menos umidade na isoterma apresentou menor valor de água na monocamada (M_o).

Tabela 34. Constantes dos modelos do GAB e do BET de isoterma de adsorção a 25°C, obtidos a partir do ajuste dos dados experimentais para os filmes a base de gelatina.

Modelo	Constantes*	Gel/Tri/BI/	Gel/Tri/BI/	Gel/Tri/BI/	Gel/Tri/BI/
		CA (pH=5,5)**	CA (pH=8,5)**	CA/160S (pH=5,5)**	CA/160S (pH=8,5)**
BET	M ₀	0,0699	0,0585	0,0821	0,0568
	C	31,11	24,68	17,95	35,43
	R ²	0,9886	0,9988	0,9878	0,9979
GAB	M ₀	0,0891	0,0662	0,0963	0,0635
	K	0,74	0,86	0,85	0,89
	C	48,56	46,57	39,10	86,71
	R ²	0,9992	0,9991	0,9994	0,9989

* M₀ indica a quantidade de umidade que foi adsorvido na camada simples ligado-se aos sítios ativos filme; C: constante relacionada com a primeira camada de sorção; R²: coeficiente de determinação e K: é um parâmetro do modelo GAB que independe da composição, relacionado com a sorção da multicamada; **Gel: gelatina; Tri: triacetina; BI: blenda ácido esteárico-palmitico; CA: cera de cana-de-açúcar; CR: cera de carnaúba; 160S (mistura de 75% de Tween 80/25% de SDS com concentração de 160%, em relação à massa seca da gelatina).

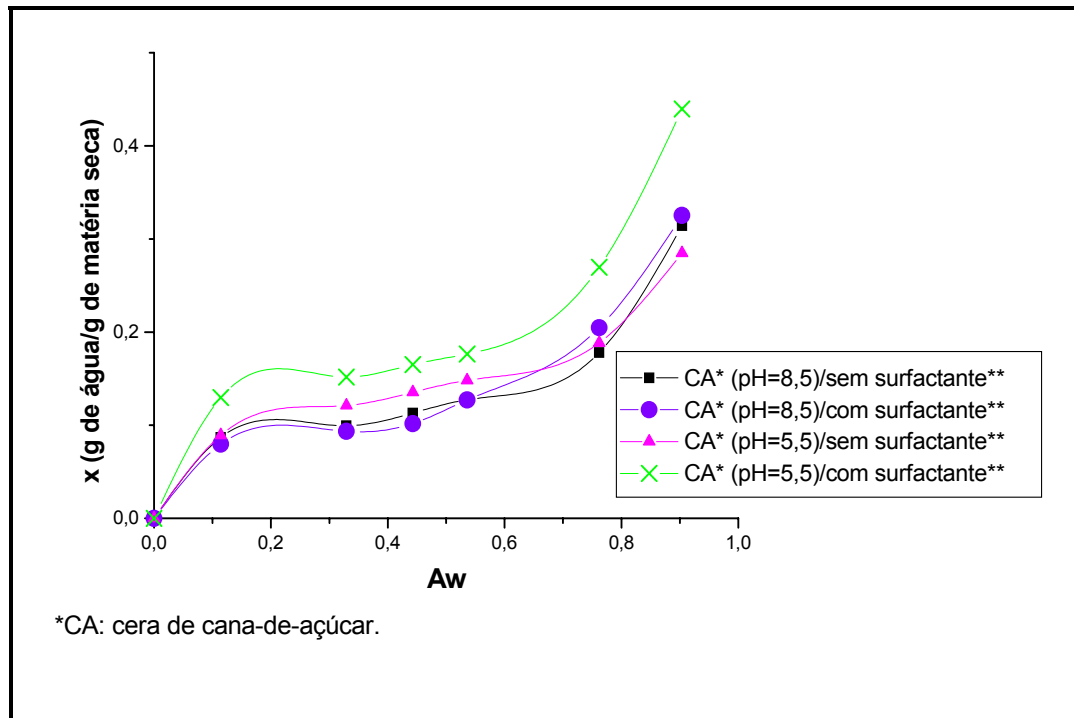


Figura 48. Isortema de adsorção dos filmes sem pH=5,5 ou com ajuste de pH=8,5 de gelatina, triacetina (10%), blenda de ácido esteárico-palmitico, cera de cana-de-açúcar (5%) com a presença ou ausente de surfactante (160% de mistura de surfactante, onde 75% de tween/25% de SDS), ajustadas pela equação de GAB, na temperatura de 25°C.

Em todas as formulações estudadas com ajuste de pH (8,5), o pH básico diminui a adsorção de água de maneira geral tanto nos filmes contendo surfactantes como nos filmes sem a adição de surfactantes, como foi verificado nas Figuras 49 e 50. Observando-se a Figura 49, verificou-se que os filmes de gelatina, triacetina, blenda e cera de carnaúba em pH 8,5 absorveram menor quantidade de água que o mesmo filme sem ajuste de pH=5,5 (onde o filme contendo cera de carnaúba adsorveu mais água). A adição da mistura de surfactante (3:1 SDS/Tween 80, na concentração de 80%) foi mais eficiente na redução da quantidade de água adsorvida, em todas as faixas de a_w , se comparados com os filmes adicionados da mistura (100% de Tween 80, na

concentração de 60%) e com o filme contendo cera de carnaúba (pH=8,5) sem a adição de surfactante. Com exceção dos filmes de gelatina, triacetina, blenda e cera de carnaúba (pH=5,5) todos as outras formulações adsorveram pouca umidade em $a_w < 0,5$, observando-se que acima de 0,5 ocorre uma grande aumento na adsorção de água. Nos filmes contendo substâncias hidrofóbicas a adsorção tende a se reduzir comparado com as formulações contendo apenas proteínas hidrofílicas (como a gelatina). Os filmes protéicos são mais sensíveis à umidade, devido sua característica hidrofílica sendo esperado uma progressiva hidratação e inchamento da matriz polimérica quando exposto a um ambiente com alta umidade relativa conforme evidenciado na isoterma de adsorção.

Na Tabela 35, pode-se observar que o filme adicionado de cera de carnaúba sem ajuste de pH (5,5) apresentou maior taxa de absorção de água como também observado na Figura 49, e em consequência maior valor de M_0 . Alterando-se o pH para 8,5 e adicionando a mistura 3:1 SDS/Tween 80 este filme apresenta redução do valor de M_0 em 54% e consequentemente diminui a absorção de água pelo filme. Observa-se tanto nos filmes contendo cera de cana-de-açúcar como nos filmes de carnaúba, que o ajuste de pH para 8,5 e conjuntamente a adição da mistura de surfactantes (3:1 Tween 80/SDS, na concentração de 160% para os filmes de cana-de-açúcar e 3:1 SDS/Tween 80, na concentração de 80% para os de carnaúba) reduziu a absorção de água e diminuiu o valor de M_0 .

Tabela 35. Constantes dos modelos do GAB e do BET de isoterma de adsorção a 25°C, obtidos a partir do ajuste dos dados experimentais para os filmes a base de gelatina.

Modelo	Constantes	Gel/Tri/BI/	Gel/Tri/BI/	Gel/Tri/BI/	Gel/Tri/BI/
		CR (pH=5,5)	CR (pH=8,5)	CR/80SDS (pH=8,5)	CR/60T (pH=8,5)
BET	Xm	0,1222	0,0627	0,0558	0,0647
	C	15,57	74,74	16,09	20,07
	R ²	0,9796	0,9856	0,9602	0,9898
GAB	Xm	0,1900	0,0737	0,0643	0,0762
	K	0,52	0,83	0,87	0,85
	C	458,28	97,23	31,20	52,26
	R ²	0,9999	0,9899	0,9889	0,9645

* M₀ indica a quantidade de umidade que foi adsorvido na camada simples ligado-se aos sítios ativos filme; C: constante relacionada com a primeira camada de sorção; R²: coeficiente de determinação e K: é um parâmetro do modelo GAB que independe da composição, relacionado com a sorção da multicamada; **Gel: gelatina; Tri: triacetina; BI: blenda ácido esteárico-palmitico; CR: cera de carnaúba; 80SDS (mistura de 75% de SDS /25% de Tween 80, na concentração de 80%, em relação à massa seca da gelatina); 60T (100% de Tween 80, na concentração de 60%, em relação à massa seca da gelatina).

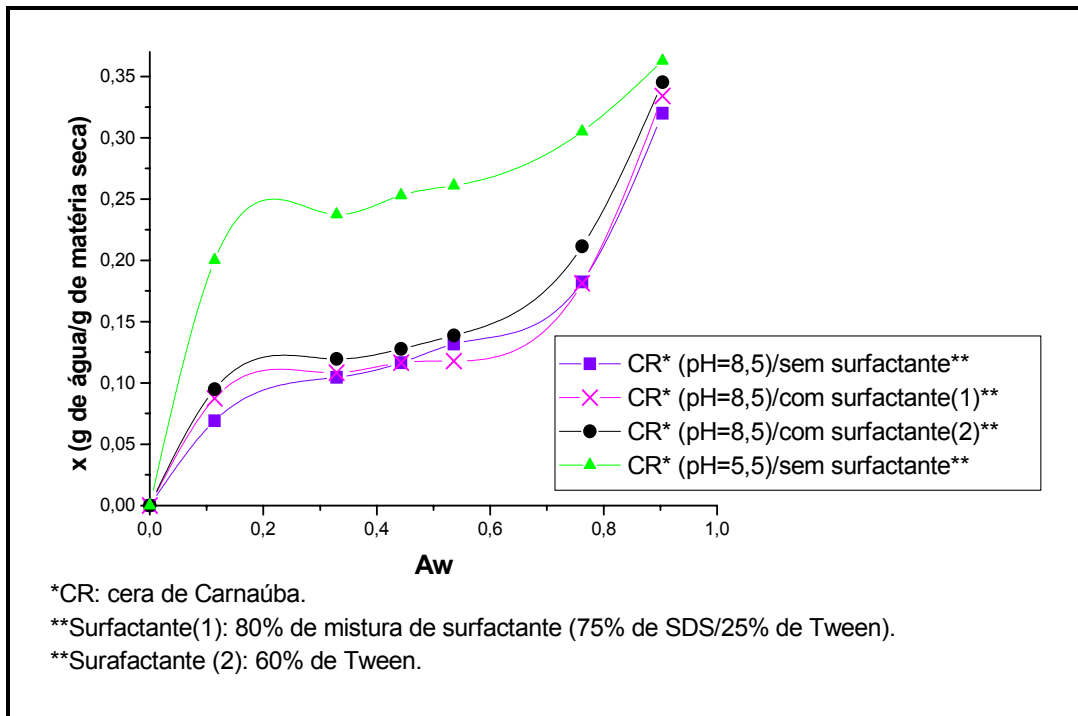


Figura 49. Isotherma de adsorção dos filmes sem pH=5,5 ou com ajuste de pH=8,5) de gelatina, triacetina (10%), blenda de ácido esteárico-palmítico, cera de carnaúba (5%) com a presença ou ausente de surfactante (160% de mistura de surfactante, onde 75% de tween/25% de SDS ou 3:1 Tween 80/SDS), ajustadas pela equação de GAB, na temperatura de 25°C.

4.9 Análise Térmica

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi à análise térmica utilizada por fornecer informações qualitativas e quantitativas sobre as mudanças físicas e químicas que envolvem processos endotérmicos (absorção de calor), exotérmicos (liberação de calor) ou mudanças na capacidade calorífica. A técnica de DSC permite ainda obter informações como valores de transição vítrea, temperatura e tempo de cristalização e ponto de fusão entre outros.

Na Tabela 36 pode-se verificar os filmes de gelatina e triacetina apresentam apenas uma fusão, enquanto os filmes compostos de lipídios (blenda de ácido esteárico e cera de cana ou carnaúba) apresentam dois picos de fusão. Já com a adição do surfactante (dependendo da mistura de surfactante) nos filmes emulsionados estes apresentaram até três picos de fusão. A temperatura de fusão dos filmes simples e dos filmes compostos adicionados de triacetina, blenda e cera (carnaúba e cana-de-açúcar) variou na faixa de 78,14 a 104,42°C. Para os filmes de gelatina adicionados de blenda de ácido esteárico, ácido láurico e breu branco, BERTAN (2003) obteve valores de T_m na faixa de 85,62-91,87°C, enquanto CARVALHO (2002) obteve valores de $T_m = 65,1^\circ\text{C}$ para o filme simples de gelatina.

A adição de componentes lipídicos (blenda de ácido esteárico-palmítico, cera de cana-de-açúcar e de carnaúba) nos filmes a base de gelatina resultou no aparecimento de mais um pico de fusão, sendo o ponto de fusão dos ácidos palmítico, esteárico, das ceras de cana-de-açúcar e de carnaúba respectivamente 63, 69,3 (BOBBIO, BOBBIO, 2003), 85,2 e 75,3°C (VIEIRA, 2003). O aparecimento de dois picos com a adição das substâncias hidrofóbicas nos filmes emulsionados, sugere que estas substâncias não estão completamente incorporadas na matriz da gelatina confirmando o comportamento observado na MEV (microscopia eletrônica de varredura) e na MCVL (microscopia confocal de varredura a laser).

Tabela 36. Temperatura de fusão (T_m) dos filmes compostos de gelatina, obtidos a partir da calorimetria diferencial de varredura (DSC).

Filmes*	T_{m_1} ($^{\circ}\text{C}$)**	T_{m_2} ($^{\circ}\text{C}$)**	T_{m_3} ($^{\circ}\text{C}$)**
Gel/Tri (pH=8,5)	76,25 \pm 2,01	-	-
Gel/Tri (pH=5,5)	64,83 \pm 2,12	92,5 \pm 0,24	-
Gel/Tri/BI (pH=8,5)	72,17 \pm 0,71	89,49 \pm 1,19	-
Gel/Tri/BI (pH=5,5)	59,92 \pm 0,12	91,00 \pm 0,47	-
Gel/Tri/BI/CA (pH=8,5)	72,17 \pm 0,71	86,25 \pm 0,11	-
Gel/Tri/BI/CA (pH=5,5)	60,17 \pm 1,18	103,17 \pm 0,23	-
Gel/Tri/BI/CA/160S (pH=8,5)	100,75 \pm 0,82	-	-
Gel/Tri/BI/CA/160S (pH=5,5)	58,84 \pm 0,94	78,14 \pm 1,13	90,17 \pm 0,94
Gel/Tri/BI/CR (pH=8,5)	74,25 \pm 0,59	103,67 \pm 0,23	-
Gel/Tri/BI/CR/80SDS (pH=8,5)	81,25 \pm 0,11	104,42 \pm 0,12	-

*Gel: gelatina; Tri: triacetina; BI: blenda ácido esteárico-palmítico; CA: cera de cana-de-açúcar; CR: cera de carnaúba; 160S (mistura de 75% de Tween 80/25% de SDS com concentração de 160%, em relação à massa seca da gelatina) e 80SDS: (mistura de 75% de SDS/ 25% de Tween 80, concentração de 80%). ** Média e desvio padrão das repetições.

Nas Figuras 50 a 52, pode-se observar os termogramas obtidos para os filmes emulsionados adicionados das substâncias hidrofóbicas (triacetina, blenda e cera de cana ou carnaúba). A adição de blenda nos filmes contendo gelatina e triacetina (pH=8,5) promoveu o aparecimento de mais um pico endotérmico em torno de 70 $^{\circ}\text{C}$ (próximo ao ponto de fusão dos ácidos graxos da blenda) e o deslocamento do pico da gelatina para 89 $^{\circ}\text{C}$ (Figura 50).

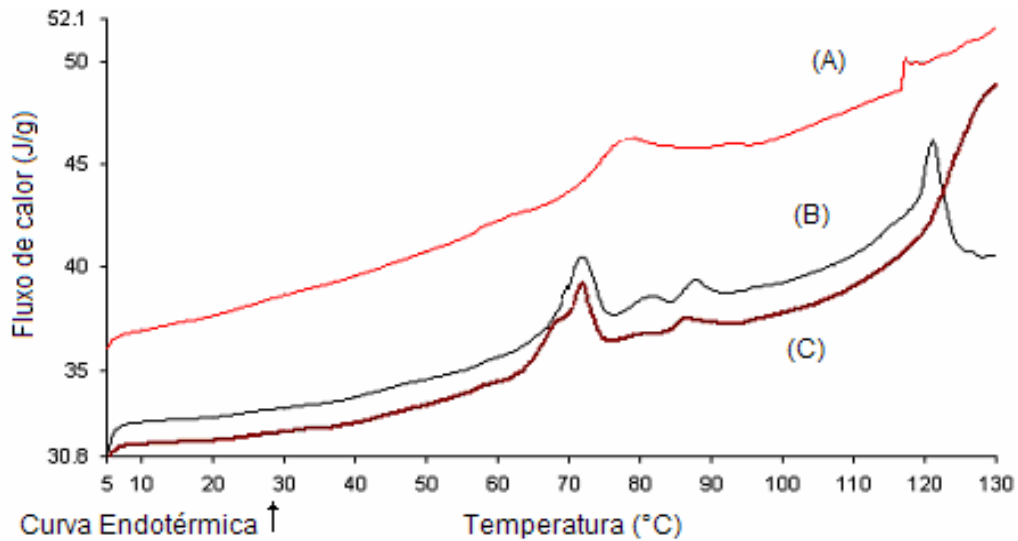


Figura 50. Termograma obtido por DSC dos filmes (com ajuste de pH=8,5) de gelatina, triacetina (10%) (A), gelatina, triacetina (10%) e blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) (B) e gelatina, triacetina (10%) e blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) e cera de cana-de-açúcar (5%) (C).

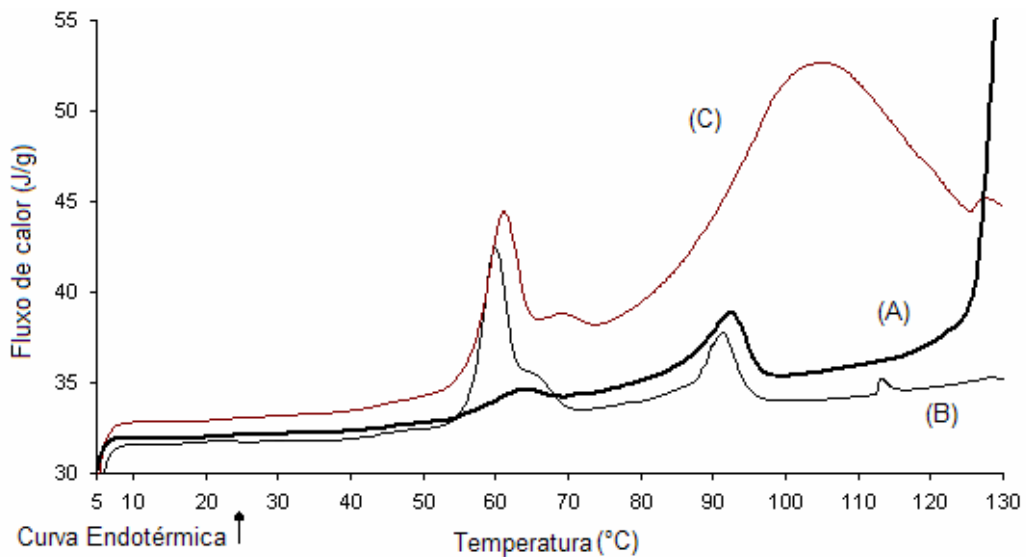


Figura 51. Termograma obtido por DSC dos filmes (sem ajuste de pH=5,5) de gelatina, triacetina (10%) (A), gelatina, triacetina (10%) e blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) (B) e gelatina, triacetina (10%) e blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) e cera de cana-de-açúcar (5%) (C).

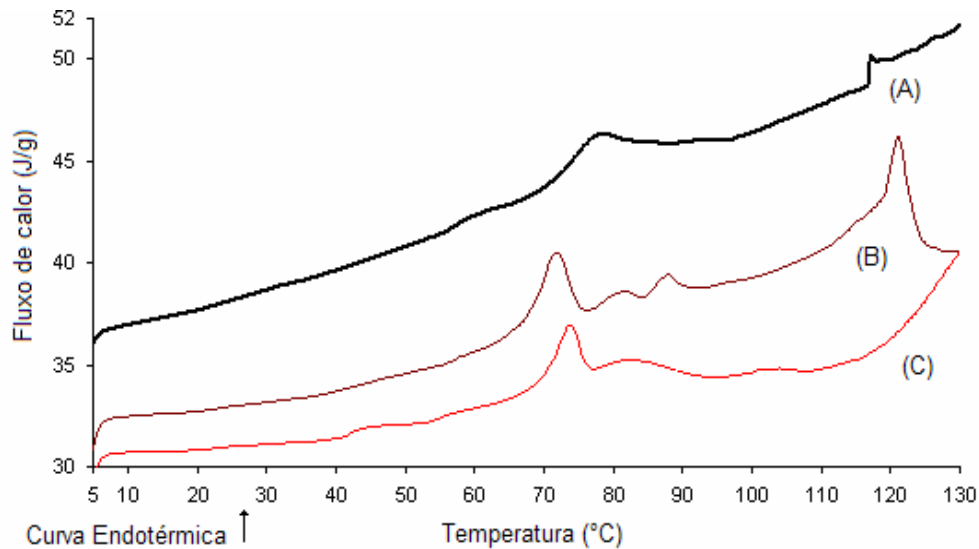


Figura 52. Termograma obtido por DSC dos filmes (com ajuste de pH=8,5) de gelatina, triacetina (10%) (A), gelatina, triacetina (10%) e blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) (B) e gelatina, triacetina (10%) e blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) e cera de carnaúba (5%) (C).

Nos filmes de gelatina e triacetina (Figura 53) foi observado dois picos de fusão nos filmes com pH=5,5 (Figura 51), já nos filmes com pH=8,5 (Figura 50) observou-se apenas um pico, indicando que a mudança do pH melhorou a incorporação de triacetina na matriz protéica, resultado também evidenciado pela MEV. O efeito do ajuste de pH (Figura 51) nos filmes contendo triacetina e blenda provocou redução da T_m primeiro pico, em relação aos filmes sem ajuste de pH (Figura 50) e no segundo pico o ajuste de pH apresenta efeito contrário. A adição de cera de cana-de-açúcar nos filmes contendo triacetina e blenda o ajuste de pH provocou modificações semelhantes nos valores de T_m se comparados com os filmes contendo triacetina e blenda.

Para os filmes de cana-de-açúcar e mistura de surfactante (3:1 Tween 80/SDS, na concentração de 160%) com pH ajustado (pH=8,5) foi observado apenas um pico de fusão, quando comparado com os filmes sem a adição do surfactante (Figura 57), evidenciando que o surfactante melhorou a incorporação das substâncias hidrofóbicas na matriz filmogênica como mostrado na MEV e

MCVL. Por outro lado, foi observado para filmes com esta mesma formulação sem ajuste de pH (pH= 5,5) três picos de fusão (Figura 56).

Nos filmes contendo cera de carnaúba a adição da mistura de surfactante 3:1 SDS/Tween 80, na concentração de 80% não provocou alteração no número de picos (dois picos de fusão), em relação à mesma formulação sem a adição de surfactante (Figura 58)

A adição dos surfactantes de maneira geral deveria melhorar a incorporação dos lipídios na matriz protéica provocando a redução dos picos de fusão porém para a adição de 160S (pH=5,5) foi observado aumento no número de picos (Figura 56), o que pode ter sido influenciado pela processo de secagem do filme prejudicando a atuação otimizada do surfactante. O ajuste de pH para 8,5 para a mesma mistura 160S (Figura 57) produziu como desejado a redução dos picos endotérmicos e deslocou a T_m total para 100°C. Já a mistura 80S não alterou a quantidade dos picos endotérmicos, mas aumentou a T_m para 81,25°C (Figura 58).

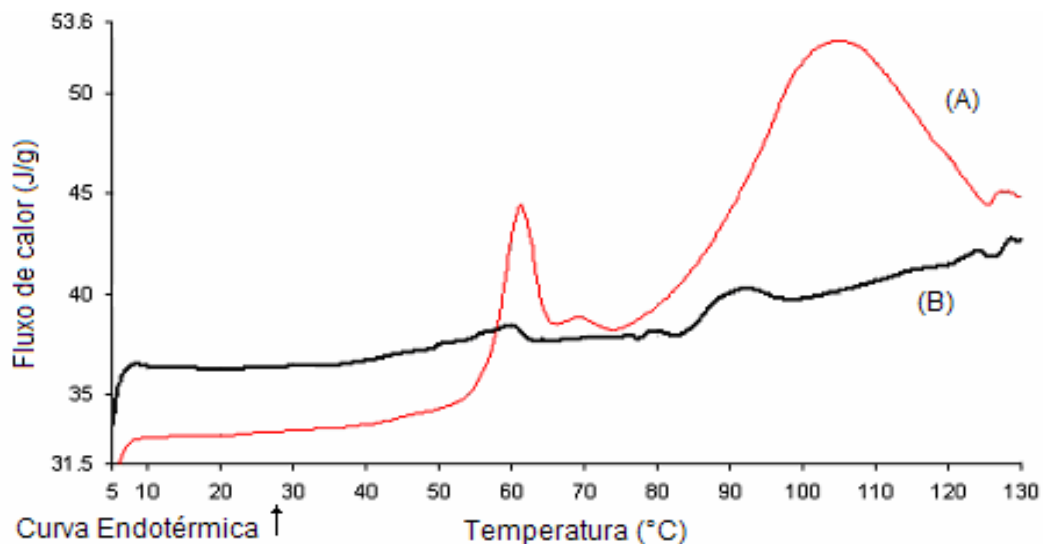


Figura 53. Termograma obtido por DSC dos filmes (sem ajuste de pH=5,5) de gelatina, triacetina (10%) e blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) e cera de cana-de-açúcar (5%) sem o surfactante (A) e com surfactante (160% da mistura de surfactante – 75% de Tween/25% de SDS) (B).

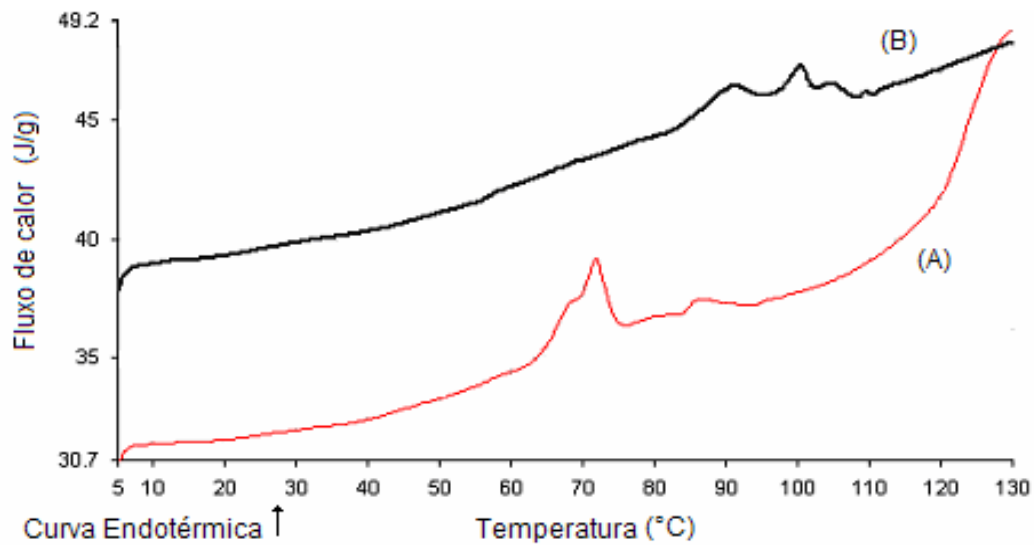


Figura 54. Termograma obtido por DSC dos filmes (com ajuste de pH=8,5) de gelatina, triacetina (10%) e blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) e cera de cana-de-açúcar (5%) sem o surfactante (A) e com surfactante (160% da mistura de surfactante – 75% de Tween/25% de SDS) (B).

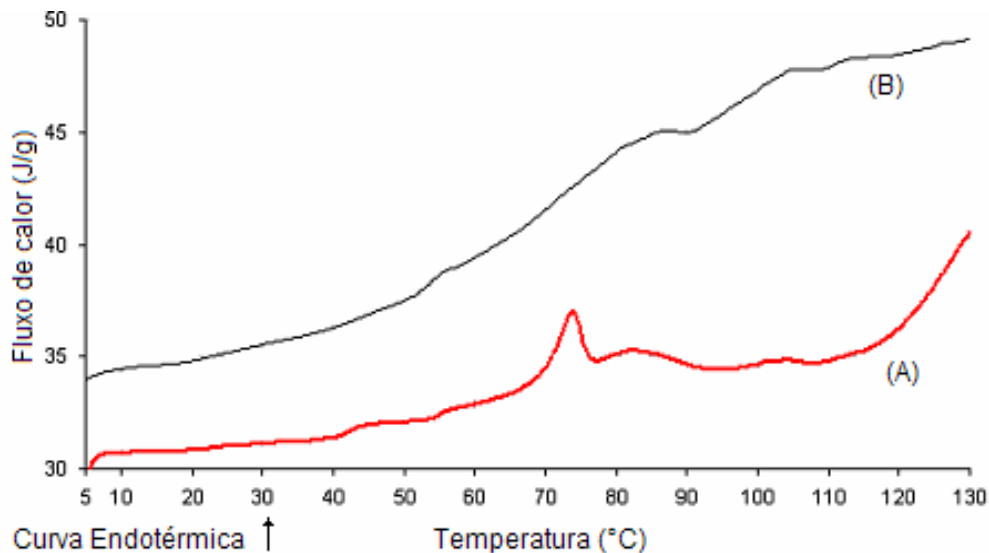


Figura 55. Termograma obtido por DSC dos filmes (com ajuste de pH=8,5) de gelatina, triacetina (10%) e blenda de ácido esteárico-palmítico (20%) e cera de carnaúba (5%) sem o surfactante (A) e com surfactante (80% da mistura de surfactante – 75% de SDS /25% de Tween) (B).

5. CONCLUSÕES

Os filmes elaborados a base de gelatina contendo triacetina, blenda de ácidos graxos e cera (carnaúba ou cana-de-açúcar) com e sem a adição de surfactante apresentaram-se visualmente homogêneos, manuseáveis e levemente opacos.

A adição da cera (cana-de-açúcar ou carnaúba) aos filmes de gelatina em pH ácido provocou uma diminuição nos valores de PVA e TR e um aumento nos valores de alongação, solubilidade em água, opacidade e de adsorção de água, com relação ao filme simples de gelatina. Ajustando-se o pH destes filmes para 8,5 os valores de PVA, alongação e opacidade aumentam, já os valores de TR, solubilidade em água e a adsorção de água diminuem com relação ao filme simples de gelatina.

O ajuste de pH (8,5) nos filmes emulsionados contendo cera tendem de forma geral a diminuir os valores de PVA, TR, solubilidade e aumentar a alongação, com relação aos filmes sem ajuste de pH.

A adição da mistura de surfactantes nos filmes com pH alcalino tende a diminuir os valores de TR, alongação, opacidade e a adsorção em água e aumentar a PVA e a solubilidade em água, com relação ao filme sem adição de surfactante. Em pH ácido o surfactante age nos filmes diminuindo a PVA, TR, opacidade e aumentando a alongação, solubilidade em água e a adsorção de água, com relação aos filmes sem a adição de surfactante.

As misturas de surfactantes adicionada aos filmes que se apresentaram mais eficientes na incorporação dos lipídios na matriz protéica melhorando assim suas propriedades funcionais, foram as misturas 3:1 Tween 80/SDS, nas concentrações 160 e 120% (em relação à massa seca da gelatina) adicionada aos filmes contendo cera de cana, já para os filmes contendo cera de carnaúba foram 3:1 SDS/Tween 80 (na concentração de 80%) e Tween 80 (na concentração de 60%).

A equação de GAB foi escolhida por melhor representar os dados de isoterma de adsorção dos filmes emulsionados, na forma sigmoidal (R^2 maiores).

Os resultados microestruturais (MEV e MCVL) com a adição da cera (carnaúba ou cana-de-açúcar) nos filmes indicaram boa distribuição das substâncias hidrofóbicas porém produziram maior heterogeneidade na morfologia da matriz polimérica, com relação aos filmes sem a adição da cera. O ajuste de pH e a adição da mistura de surfactantes nos filmes emulsionados contendo cera promoveram boa distribuição e diminuição do tamanho dos glóbulos de lipídios apresentando uma estrutura mais regular.

A análise térmica por DSC indicou que a adição da cera e a adição de surfactantes nos filmes emulsionados promoveu aumento no número de picos de fusão (2 a 3 picos), exceto para os filmes contendo a mistura de surfactantes 160S em pH alcalino que apresentou apenas um pico de fusão sugerindo homogeneidade na estrutura deste filme. O ajuste de pH não afetou o número de picos de fusão em relação aos filmes sem ajuste de pH.

6. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

- ✓ Realizar testes preliminares mais elaborados da adição do surfactantes na solução filmogênica medindo a tensão superficial, força iônica na interface proteína–lipídio, tamanho de partícula da emulsão e determinar as concentrações micelares críticas.
- ✓ Ampliar o espectro de surfactantes estudados a serem incluídos nas formulações filmogênicas.
- ✓ Construir diagramas de fase (temperatura x concentração de surfactantes x formação de micelas/microemulsão) e estudar condições de secagem dos filmes nas temperaturas otimizadas (definidas pelos diagramas) onde a incorporação lipídica é efetiva.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADAMENAS, J. **O negócio é fazer cera**. Química e derivados, p. 24-29, 1982.

ADAMSOM, A. W. **Physical Chemistry of surfaces**, John Wiley & Sons. New York, p. 526-539, 1997.

ADAMSOM, A. W.; GAST, P. A. **Physical Chemistry of Surfaces**, 2^{ed}. Montreal: Willey-Interscience, p. 465-490, 1997.

AMARANTE, C.; BANKS, N. H. Postharvest physiology and quality of coated fruits and vegetables. In: Janick, J. (Ed.) **Horticultural Reviews**, New York: John Wiley e Sons, Inc., v. 26, p. 161-238, 2001.

ALLEN, L.; NELSON, A. I.; STEINBERG, M. P.; MCGILL, J. N. I. Development and physical testing of a starch-algin coating. **Food Technology**, v. 17, p. 1437-1441, 1963.

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

AVENA-BUSTILLOS, R. J.; KROCHTA, J. M. Water vapor permeability of caseinate based edible films as affected by pH, calcium crosslinking and lipid content. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 58, n. 4, p.904-907, 1993.

AZZAM, A. M. **Further investigations on cane wax refining and bleaching**. Fette Seifen Anstrichmittel, v. 88, n. 5, p. 191-194, 1986.

BATISTA, J. A. Desenvolvimento, caracterização e aplicação de biofilmes a base de pectina, gelatina e ácidos graxos em bananas e sementes de brócolos. **Dissertação de mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2004. 157p.

BENNET, H. **Commercial Waxes**. 2 ed. New York: Chemical Publishing, 1956. 688p.

BERGENSTAHL, G. **Physical aspects of an emulsifier functionality**, in Food Emulsifiers and their applications, Hansenhuettl, g. L. and Hartel, R. W. Eds., Champman and Hall, New York, 1997, cap. 6.

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

BERTAN, L. C. Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e compostos a base de gelatina, ácidos graxos e breu branco. **Dissertação de mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2003. 157p.

BERTSCH, M.; MAYBURD, A. L.; KASSNER, R. J. The identification of hydrophobic sites on the surface and proteins using absorption difference spectroscopy of bromophenol blue. **Analytical Biochemistry**, New York; 313, p.187-1995, 2003.

BODMEIER, R.; PAERATAKUL, O. Plasticizer uptake by aqueous colloidal polymer dispersions used for the coating of solid dosage forms. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.152, p. 17-26, 1997.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 3^o ed. São Paulo: Varela. p. 11 e 135, 2001.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. Lipídios. **Introdução à química de alimentos**. 3^o ed. São Paulo: Varela. p. 139-176, 2003.

BOS, M.; NYLANDER, T.; ARNEBRANT, T.; CLARK, D. C. **Protein/emulsifier interaction, in Food Emulsifiers and their applications**, Hasenhuettl, G. L. and Hartel, R. W., Eds., Chapman and Hall, New York, 1997, chap. 5.

BRISTON, J. H. **Plastic films**. 3ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. p. 349, 407, 1988.

CALLEGARIN, F.; GALLO, J-A. Q.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Lipids and biopackaging. **Journal of American Oil Chemistry Society**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 1183-1192, 1997.

CARVALHO, R. A. Desenvolvimento e caracterização de biofilmes a base de gelatina. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 1997. 128p.

CARVALHO, R. A. Elaboração e caracterização de filmes à base de gelatina modificada enzimática e quimicamente. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2002. 227p.

CHAMBI, H. N. M. Desenvolvimento de filmes a partir de caseína e gelatina modificadas enzimaticamente com tripsina e transglutaminase. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2004. 99p.

CHARALAMBOUS, G.; DOXASTAKIS, G. **Food emulsifiers: chemistry, technology, functional properties and applications**, Elsevier, Amsterdam, 1989.

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

CHICK, J.; HERNANDEZ, R. J. Physical, thermal, and barrier characterization of casein-wax-based edible films, **Food Engineering and Physical Properties**, v. 67, n. 3, 2002.

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

CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Stability of myofibrillar protein-based biopackagings during storage. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technology**, London, v. 29, n. 4, p. 344-348, 1996.

DAMODARAM, S. Aminoacids, peptides and proteins. In: FENNEMA, O. (Ed.) **Food Chemistry**, 3ra. Ed. New York: Marcel Dekker, 1996. Cap. 6, p. 321-429.

DAVIS, E. A. Factors determining emulsion type: Hydrophile-lipophile balance and beyond, **Colloids and Surfaces**, v.91, n.9, 1994.

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J-A; VOLLEY, A. Edible films and coatings tomorrow's packagings: a review. **Critical review in Food Science and Technology**, Oxford, v.30, n. 2, p. 183-190, 1995.

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J-A.; VOILLEY, A. Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 38, n. 4, p. 299-313, 1998.

DEFFENBAUGH, L. B. **Carbohydrate/emulsifier interactions**, in **Food Emulsifiers and their applications**, Hasenhuettl, G. I. and Hartel, R. W., Eds., Chapman and Hall, New York, 1997, chap. 4.

DICKINSON, E. **Introduction to Food Colloids**, Oxford University Press, Oxford, 1992.

DICKINSON, S.; McCLEMENTS, D. J. **Advantaces in food colloids**, Chapman & Hall, London, 1995.

DONHOWE, I. G.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: characteristic, formation, definitions and testing methods. In: KROCHTA, J. M.; BALDWIN, E. A.; NISPEROS-CARRIEDO, M. O. Edible coating and films to improve food quality, **Lancaster**: Technomic Publishing Company, Inc., p. 1-24, 1994.

EVANS, D. F.; WENNERSTROM, H. **The colloidal domain: where physics, chemistry, biology and technology meet**, VCH Publishers, New York, 1994.

FAKHOURI, F. M. Coberturas comestíveis aplicadas na preservação de goiabas in natura (*Psidium guajava* L.) **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2002.

FAKHOURI, F. M.; BATISTA, J. A.; GROSSO, C. Efeito de coberturas comestíveis aplicadas em goiabas *in natura* (*Psidium guajava* L.) Desenvolvimento e caracterização de filmes comestíveis de gelatina, triacetina e ácidos graxos. **Brazilian Journal Technology**. v. 6, n. 2, p. 301-308, 2003.

FAIRLEY, P., MONAHAN, F. J., GERMAN, J. B., KROCHTA, J. M., Mechanical properties and water vapor permeability of edible films from whey protein isolate and sodium Dodecil sulfate. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 44, p. 438-443, 1996.

GALLO, J-A. Q.; DEBEAUFORT, F.; CALLEGARIN, F.; VOILLEY, A. Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based films. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 180, p. 37-46, 2000.

GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Microstrutural characterization of plasticized starch-based films. **Starch/Stärke**, La Plata, v. 52, n. 4, p. 118-124, 2000.

GENNADIOS, A.; WELLER, L. Edible films and coatings from wheat and corn proteins. **Food Technology, Chicago**, v. 44, n. 10, p. 63-69, 1990.

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

GENNADIOS, A.; WELLER, C.L. Moisture adsorption by grain protein films. **Transactions of the ASAE**. v. 37, n. 2, p. 535-539, 1994a.

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

GONTARD, N. Films et enrobages comestibles: etude et amelioration des propriétés filmogènes du gluten. **Tese (DOUTOR en Sciences des Aliments)**, Universite Montpellier, Academic de Montpellier, Montpellier, 1991. 174p.

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**, Chicago, v. 57, n.1, p.190-200, 1992.

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

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

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

GONTARD, N.; MARCHESSEAU, S.; CUQ, J-A.; GUILBERT, S. Water vapor permeability of edible bilayer films of wheat gluten and lipids, **International Journal Food Science Technology**, v. 30, p. 49-56, 1995.

GONTARD, N.; RING, S. Edible wheat gluten film: influence of water content on glass transition temperature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, p. 3474-3478, 1996.

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

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

GUILBERT, S.; GONTARD, N.; GORRIS, G. M. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 29, n. 1-2, p. 10-17, 1996.

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

GREENER, I. K., FENNEMA, O. Barrier properties and surfaces characteristics of edible, bilayers films. **Journal of Food Science**, v.54, n.6, p. 1393-1399, 1989a.

GREENER, I. K., FENNEMA, O. Evaluation edible, bilayers films for use as moisture barriers for food. **Journal of Food Science**, v.54, n.6, p. 1400-1406, 1989b.

GRIFFITHS, P. C.; CHEUNG, A. Y. F. Interaction between surfactants and gelatin in aqueous solutions, **Materials Science and Technology**, v. 18, p. 591-599, 2002.

HAGENMAIER, R. D.; BAKER, R. A. Edible coatings from morpholine – free wax microemulsions. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 45, p. 349-352, 1997.

HASENHUETTL, G. L.; HALTER, R. W. **Food Emulsifiers and Their Applications**, Chapman and Hall, New York, 1997.

HERNANDEZ, E.; BAKER, R. A. Candelilla wax emulsion, preparation and stability. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 5, p. 1392-1387, 1991

HIEMENZ, P. C. **Principles of colloid and surface chemistry**, Dekker, New York, 1986.

ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and surface forces**, Academic Press, London, 1992.

JANGCUHD, A.; CHINNAN, M. S. Properties of peanut protein film: sorption isotherm and plasticizer effect. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, London, v.32, n.1, p.89-94, 1999.

JOHNSTON-BANKS, F. A. **Gelatin**, In: Food Gels, London, Peter Harris, Elsevier Applied Science, Ch 7, p. 233-289, 1990.

JOKAY, L.; NELSON, G. E.; POWELL, E. L. Development edible bilayer amylaceous coatings for foods. **Food Technology**. V. 21, p. 1064, 1967.

JOWITT, R.; ESCHER, F.; HALLTOM, B.; MEFFERT, H. F. T.; SPIESS, W. E. L.; VOS, G. **Physical Properties of Foods**, London and New York, Ed. Applied Science Publishers, 1983.

KAMPER, S. L.; FENNEMA, O. Water vapor permeability of edible, fatty acid bilayer film. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, p. 1482-1485, 1984.

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

KIM, K. M.; HWANG, K. T.; WELLER, C. L.; HANNA, M. A. Preparation and characterization of soy protein isolate films modified with sorghum wax. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 79, n. 6, p. 615-619, 2002.

KIM, K. M.; MARX, D. B.; WELLER, C. L.; HANNA, M. A. Influence of sorghum wax, glycerin, and sorbitol on physical properties of soy protein isolate films. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 80, n. 1, p.71-76, 2003.

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

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

LABUNZA, T. P.; KANANE, A. CHEN, J. Y. Effect of temperature sorption and water activity shift of two dehydrated foods. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 4, p. 385-391, 1986.

LAI, H. M.; PADUA, G. W.; WEI, L. S. Properties and microstructure of zein sheets plasticized with palmitic and stearic acids, **Cereal Chemistry**, v. 74, p. 83-90, 1997.

LAMPRECHT, A.; SCHAFFER, U. F.; LEHR, C-M. Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate. **Europe Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.49, p.1-9, 2000.

LANXESS ENERGIZING CHEMISTRY. **Triacetina**. Disponível em: http://www.porofofor.de/pma/downloads/spanisch/Triacetin_s.pdf acesso em 11/12/2005.

LARIOS, M. E.; PEREZ, M. D.; MARRERO, R. M. Estudio de la distribución de la cera em lãs distintas partes de la cana. **Centro Azucar**, v. 20, n. 3, p. 6-10, 1993

LI, S., PARISH, E. J. **The chemistry of waxes and sterols**. In: AKOH, C; MIN, D. B. Food Lipids-Chemistry, Nutrition and Biotechnology. New York. Marcel Dekker, Chap. 4, p. 98-114, 1998.

LIN, S. Y., CHEN, K. S., RUN-CHU, L. Organic esters of plasticizers affecting the water absorption adhesive property, glass transition temperature and plasticizer permanence of Eudragit acrylic films. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 68: p. 343-350, 2000.

LIN, L-T; MINE, Y.; TUNG, M. A. Barrier and tensile properties of transglutaminase cross-linked gelatin films as affected by relative humidity, temperature and glycerol content. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 64, n.4, p. 616-622, 1999.

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

MARTIN-POLO, M.; VOILLEY, A. Comparative study of water permeability of edible film composed of Arabic gum and of glycerolmonostearate. **Science des Aliments**. v. 10, n. 2, p. 473-483, 1990.

MARTIN-POLO, M.; MAUGUIN, C.; VOILLEY, A. Hydrophobic films and their efficiency against moisture transfer. I. Influence of the preparation technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 3, p. 407-412, 1992.

McCLEMENTS, D. J. **Food emulsions: principles practice and techniques**, cap. 4, p.105, 1999.

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

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

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

MINATTI, E. Um novo modelo para a interação entre polímeros neutros hidrossolúveis e surfactantes, **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Santa Catarina, 2005.

MORRILON, V; DEBEAUFORT, F; BLOND, G.; CAPELLE, M; VOILLEY; A. Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Dijon, v. 42, n. 1, p. 67-89, 2002.

MYERS, D. **Surfactant Science Technology**, VCH Publishers, Weinheim, Germany, 1988.

OTTERSTATTER, G. **Coloring of Food, Drugs and Cosmetics**. Ed. Marcel Dekker, New York, p. 1, 1999.

PALMU, P. S. T. Preparação, propriedades e aplicação de biofilmes comestíveis a base de glúten de trigo. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2003. 244p.

PARK, J. H.; WELLER, C. L.; VERGANO, P. J.; TESTIN, R. F. Permeability and mechanical properties of cellulose-based edible films. **Journal of Food Science**. v. 58, n. 6, 1993.

PARK, H. J.; CHINNAN, M. gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. **Journal of Food Engineering**. Oxford, v.25, n.4, p. 497-507, 1995.

PATURAU, J. M. **By-products of the cane sugar industry**. New York: Elsevier Publishing Company, 1989, p. 123.

PEROVAL, C.; DEBEAUFORT, F.; DESPRÉ, D.; VOILLEY, A. Edible arabinoxylan-based films. 1. Effects of lipids types on water vapor permeability, film structure, and other physical characteristics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 3977-3983, 2002.

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

PEREZ-GAGO, M. B.; KROCHTA, J. M. Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/ beeswax emulsion films. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.49, p. 996-1002, 2001.

POPPE, J. **Gelatin**, In: **Thickening and gelling Agents for Food**, New York., Ed. Alan Imeson, Blackie Academic & Professional, Ch. 7, p. 144-168, 1997.

ROSEN, M. J. **Surfactants and interfacial phenomenon**, Wiley-Interscience, New York, 1978.

ROZÁRIO, C. H. R. Desenvolvimento de um processo para obtenção de policosanol a partir de cera de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). **Dissertação de mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2006.

SARMENTO, A. L. S. C. Elaboração e Caracterização de biofilmes a partir de gelatina reticulada. **Dissertação de mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 1999.

SGARBIERI, V. **Alimentação e Nutrição**. Campinas: Ed. Unicamp, p.287, 1987.

SGARBIERI, V. **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, degradação e modificação**. São Paulo, Ed. Varela, p.84, 1996.

SHELLHAMMER, T. H.; KROCHTA, J. M. Whey protein emulsion film performance: effect of lipid type and amount. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 62, n. 2, p.390-398, 1997.

SHERWIN, C. P.; SMITH, D. E.; FULCHER, G. Effect of fatty acid type on dispersed phase particle size distribution in emulsion films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 11, p. 4534-4538, 1998.

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

SMAILI, S. S. Microscopia de fluorescência um novo jeito de olhar as células. **Ciência Hoje**, São Paulo, Abril, p. 67-69, 2001.

SOUZA, S. M. A. Elaboração e caracterização de filmes comestíveis biodegradáveis a base de proteínas miofibrilares de origem bovina. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2001. 207p.

SOBRAL, P. L. J. Propriedades funcionais de gelatina em função da espessura. **Ciência e Engenharia (Science and Engineering Journal)**, Uberlândia, v. 8, p. 60-67, 1999.

SOBRAL, P. J. A. Proteínas de origem animal na tecnologia de biofilmes. **Tese de Livre Docência**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de São Paulo, 2000.

TALENS, P.; KROCHTA, J. M. Plasticizing effects of beeswax and carnauba wax on tensile and water vapor permeability properties of whey protein films. **Food Engineering and Physical Properties**, Valencia, v.70, n. 3, p. 239-243, 2005.

THOMAZINE, M.; CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. I. A. Physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 3, p. 172-176, 2005

TULLOCH, A. P. **Composition of some natural waxes**. *Cosmetic and Perfumery*, v. 89, n. 11, p. 53-54, 1974.

VIEIRA, T. M. F. S. Obtenção de cera de cana-de-açúcar a partir de subproduto da indústria sucro-alcooleira: extração, purificação e caracterização. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2003. 139p.

VILLALOBOS, R.; CHANONA, J.; HERNANDEZ, P.; GUTIERREZ, G.; CHIRALT, A. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 1, p. 53-61, 2005.

WELLER, C. L.; GENNADIOS, A.; SARAIVA, R. A. Edible bilayer films from zein and grain sorghum wax or carnauba wax. **Lebensm. Wiss. U. technol.**, v. 31, p. 279-285, 1998.

YANG, L. PAULSON, A. T. Mechanical and water barriers properties of edible gellan film. **Food Research International**, Amsterdam, v. 33, n. 7, p. 563-570, 2000a.

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

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

ZIELINSKI, R. J. **Synthesis and composition of food-grade emulsifiers, in Food emulsifiers and their applications**, Hasenhuettl, G. L. and Hartel, R. W., Eds., Chapman and Hall, New York, 1997, chap. 2.

ANEXO**ANEXO I – Caracterização físico-química da gelatina**

Tabela 37. Caracterização físico-química da gelatina segundo o laudo cedida pela indústria.

Gelatina tipo B	
Lote	PL/2V535/99
Bloom (6,66%)	270g
Massa molecular (Da)	$3,83 \cdot 10^5$
Viscosidade (6,66%)	50,0 mps
pH (1,0%)	5,7
Umidade	9,5%
SO ₂	≤ 40 ppm
Resíduos por ignição	≤ 2%
Cromo	≤ 2 ppm
Granulometria	30 mesh

ANEXO II – Cromatografias Gasosas das ceras de cana-de-açúcar derivatizadas com Reagente de Grignard

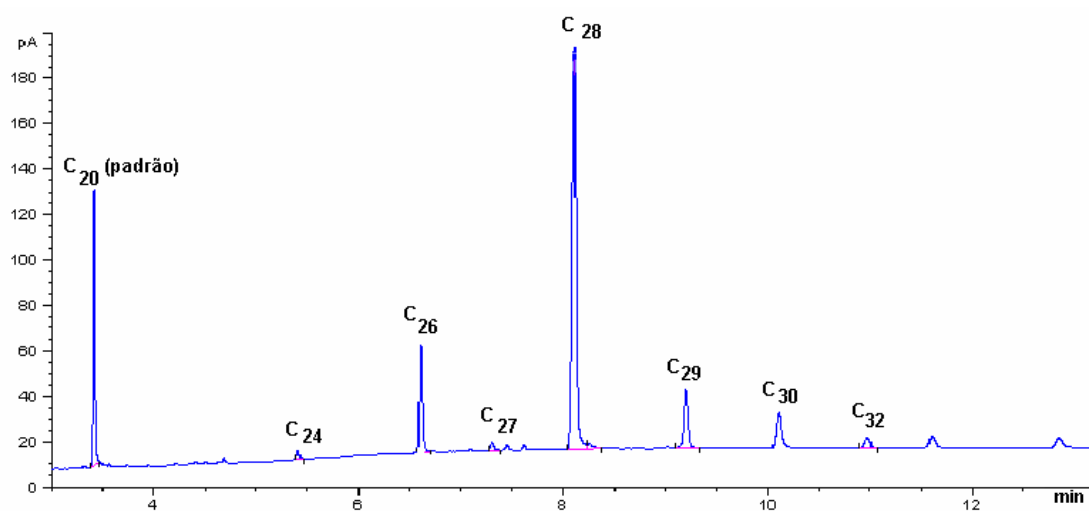


Figura 56. Cromatograma da cera de cana-de-açúcar purificada

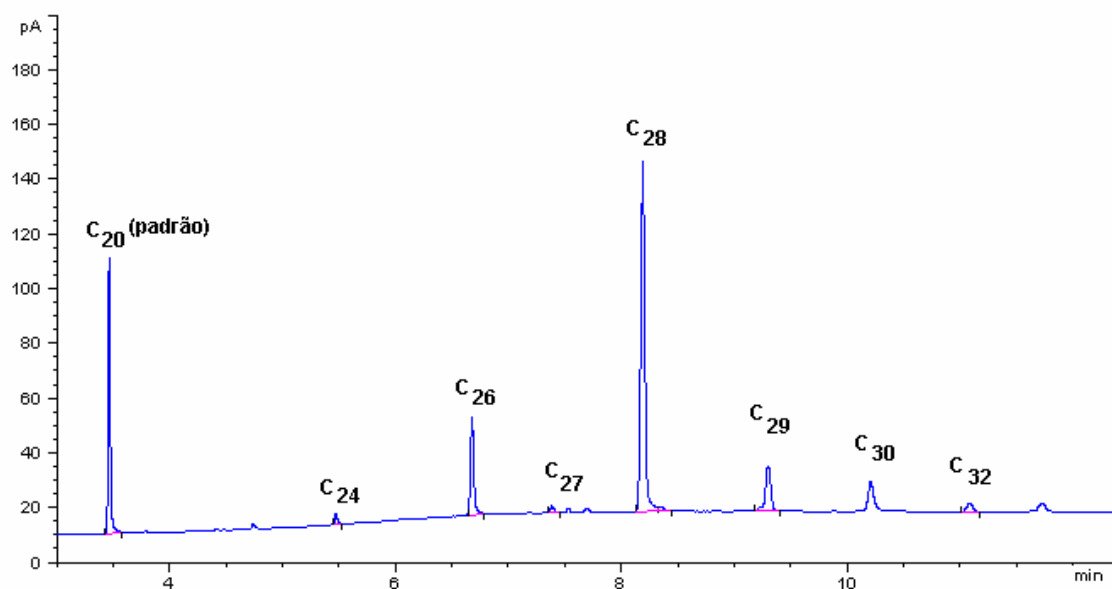


Figura 57. Cromatograma da cera de cana-de-açúcar despigmentada

ANEXO III – Dados da microscopia confocal de varredura a laser

Samples: Level 12 bit 1.0

Dimensions:

X 1024 0.690534 μm

Y 1024 0.690534 μm

Ch 3

Intensity Mapping:

Map Ch0: Range=00112 to 04095

Map Ch1: Range=00019 to 04095

Map Ch2: Range=00000 to 04095

Acquisition Parameters:

Channel 1=Fluorescence

Channel 1 Dye=FITC

Channel 2=Fluorescence

Channel 2 Dye=Nile Red

Channel 3=Transmission

Channel 3 Dye=Transmitted

Date=03-16-2005

Time=09:28:31

PMT Voltage Ch1=661

Offset Ch1=0

Gain Ch1=1.000000

PMT Voltage Ch2=439

Offset Ch2=2

Gain Ch2=1.297000

PMT Voltage Ch3=228

Offset Ch3=0
Gain Ch3=1.200000
Frame Filter=4 frame Kalman Filter
Zoom Size=1.000000
Scan Speed=4000
Magnification=20X
Laser-Shutter Ar=Open
Laser-ND Ar=25% transmittance
Laser-Shutter HeNe-G=Open
Laser-ND HeNe-G=55% transmittance
Laser-Shutter HeNe-R=Closed
SecondsPerScanLine=5076
DelayToFirstImagePixelInSecs=0
SourceOfData=PMT 1 PMT 2 PMT 3
Scan Start Mode=Scan started immediately
Sequential Scanning Mode=Frame-sequential
Acquisition GUID={84315436-9613-11D9-95DD-91B3FBBB9995}

Description:

DIC leveling performed on Transmission channel from Live

Display Settings:

Gamma 0=0.639000

Gamma 1=0.276000

Gamma 2=1.293000