ANA CRISTINA DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE EMBALAGEM BIODEGRADÁVEL
ATIVA A BASE DE FÉCULA DE MANDIOCA E AGENTES
ANTIMICROBIANOS NATURAIS**

São Paulo
2011

ANA CRISTINA DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE EMBALAGEM BIODEGRADÁVEL
ATIVA A BASE DE FÉCULA DE MANDIOCA E AGENTES
ANTIMICROBIANOS NATURAIS**

Tese apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Engenharia

São Paulo
2011

ANA CRISTINA DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE EMBALAGEM BIODEGRADÁVEL
ATIVA A BASE DE FÉCULA DE MANDIOCA E AGENTES
ANTIMICROBIANOS NATURAIS**

Tese apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Engenharia

Área de Concentração:
Engenharia Química

Orientadora:
Prof^a. Titular Carmen C. Tadini

São Paulo
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Ana Cristina de

Desenvolvimento de embalagem biodegradável ativa a base de fécula de mandioca e agentes antimicrobianos naturais / A.C. de Souza. -- São Paulo, 2011.

136 p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1. Plásticos biodegradáveis 2. Filmes comestíveis 3. Amido 4. Argilas 5. Antifúngicos 6. Casting I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II. t.

Aos meus pais Rita e Idemar

AGRADECIMENTOS

Em especial à professora Carmen Cecília Tadini pela dedicação, confiança, carinho e orientação durante esses quatro anos de trabalho.

À FAPESP, processo 06/06816-9, pelo apoio financeiro.

Ao professor Herminio Cipriano Sousa por me permitir desenvolver uma etapa deste trabalho no Laboratório de Engenharia de Alta Pressão e Tecnologia Supercrítica da Universidade de Coimbra, Portugal. Em especial, à pos doc Ana Maria A. Dias e à Mara E. M. Braga, e aos colegas de laboratório Sofia, Clara, Mariline, Agostinho e Pedro Sancho.

Aos professores Antonio Carlos Vieira Coelho e Kátia Nicolau Matsui pelas correções e sugestões apresentadas durante a qualificação deste trabalho. E também aos professores que muito gentilmente aceitaram fazer parte da banca examinadora.

À professora Miriam Dupas Hubinger, do Laboratório de Engenharia de Processos da UNICAMP, pela disponibilização do equipamento DSC de seu laboratório. À doutoranda Vanessa Martins da Silva por me ajudar com as análises.

Aos funcionários do laboratório Ivan e Andres pela ajuda durante esses anos.

A todos os amigos do laboratório, em especial, Helena, Otília, Diana, Carola, Vanessa, Paula, Nathalia, Cynthia e Janaína, pela amizade, convívio diário e momentos de descontração. Sem vocês, meu doutorado não teria sido o mesmo.

Aos alunos de iniciação científica que me ajudaram na concretização dos trabalhos experimentais: Ewerton, Rafael, José Otávio, Bruna, Fernanda e Gisele.

Aos amigos brasileiros que conheci em Coimbra, Tiago e Rochele, e, *por supuesto*, ao argentino Diego, que contribuíram muito para a minha adaptação e fizeram de minha estadia um período inesquecível.

Ao Fabio, por todo carinho, dedicação e companheirismo.

Aos meus pais, Rita e Idemar, que não mediram esforços em toda minha formação acadêmica. Aos meus irmãos, Lara e Matheus, e à minha cunhada Vanessa, por todos os bons momentos que passamos juntos. Ao meu lindo sobrinho Henrique, que enche minha vida de felicidade. A todos da minha família que sempre me incentivaram e vibraram com as minhas conquistas.

Muito obrigada!

COIMBRA

Coimbra, velha cidade
De ruas medievais,
Do Penedo da Saudade
Onde tantos imortais
Poetas e trovadores,
Tiveram os seus amores
Nos tempos da mocidade.

Coimbra dos estudantes
E das tricanas bonitas,
Das noites inebriantes
Da tua Queima das Fitas.

Coimbra, cidade linda,
Foste sempre e és ainda
A cidade capital
Do amor em Portugal!

Tens na Fonte dos Amores
O amor simbolizado
Por D. Pedro e D. Inês
Num romance consagrado.

Rio Mondego, o Choupal,
O teu Jardim da Sereia
E a Escada Monumental
Junto à Universidade.
Fazem de ti, sem igual,
A mais bonita cidade!
Deste nosso Portugal!

Coimbra de tradições,
Cidade-mãe de doutores
E da velha Universidade;
Fazes vibrar corações
Por tantas recordações,
Numa palavra...és saudade!

Fernando Reis Costa
(Professor universitário e poeta)

RESUMO

Aliado ao fato dos biomateriais ainda serem pouco explorados pelas indústrias alimentícias, este trabalho propôs o desenvolvimento de embalagens que sejam, além de biodegradáveis, também ativas através do uso de um agente antimicrobiano natural capaz de inibir a proliferação de fungos correntes em produtos de panificação (*Penicillium commune* e *Eurotium amstelodami*).

Primeiramente, filmes biodegradáveis a base de fécula de mandioca foram elaborados pela técnica de *casting*, usando açúcares e glicerol como plastificantes. O aumento do conteúdo de glicerol causou diminuição da resistência máxima à tração e elevação dos valores de propriedades de barreira.

Numa segunda etapa do trabalho, a introdução de nanopartículas de argila esmectita influenciou positivamente as propriedades de barreira dos filmes, devido à diminuição observada nos valores de permeabilidade ao vapor de água e coeficiente de permeabilidade ao oxigênio. Nesta fase, a variação do conteúdo de glicerol também afetou significativamente as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes biodegradáveis.

As concentrações inibitórias mínimas dos óleos essenciais de cravo e de canela contra os fungos estudados foram definidas e o óleo essencial de canela foi selecionado, para ser incorporado aos filmes biodegradáveis, em três conteúdos distintos, pois foi o composto que mostrou uma inibição mais eficiente. A atividade antimicrobiana dos filmes biodegradáveis com incorporação de óleo essencial de canela foi testada sobre os micro-organismos escolhidos através de testes de difusão em halo, cujos resultados foram suficientes para demonstrar o potencial ativo da embalagem desenvolvida.

Como método alternativo de incorporação do agente antimicrobiano, gás carbônico (CO₂) em estado supercrítico foi utilizado como solvente. Os resultados obtidos foram promissores, uma vez que se observou incorporação de agente antimicrobiano dentro da matriz polimérica em quantidade suficiente para inibir a proliferação dos fungos testados.

Palavras-chave: embalagem biodegradável, embalagem ativa, amido, *casting*.

ABSTRACT

This work concerned the development of biodegradable and active packaging based on cassava starch and natural antimicrobial agents that efficiently inhibit growth of fungi commonly found in bread products (*Penicillium commune* and *Eurotium amstelodami*).

Biodegradable films were prepared by the casting technique, using sugars and glycerol as plasticizers. An increase in glycerol content caused a decrease in tensile strength and an elevation on barrier properties results.

In a second phase of the work, incorporation of nanoclays diminished water vapor and oxygen permeability thus improving film packaging properties.

Two antimicrobial agents were tested (cinnamon and clove essential oils) and cinnamon essential oil was chosen to be incorporated in biodegradable films based on cassava starch because it was more efficient against *Penicillium commune* and *Eurotium amstelodami*. Antimicrobial activity of biodegradable films with cinnamon essential oil was evaluated by means of a halo diffusion test in which an inhibition zone around a sample of the biodegradable and active film was analysed.

As alternative method of antimicrobial agent incorporation, carbon dioxide (CO₂) in supercritical state was used as solvent. Promising results were obtained since the amount of antimicrobial agent incorporated inside the polymeric matrix was sufficient to inhibit proliferation of fungi.

Key-words: biodegradable packaging, active packaging, starch, casting.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação estrutural da amilose (Fonte: TESTER; KARKALAS; QI, 2004) .	32
Figura 2 – Representação estrutural da amilopectina (Fonte: TESTER; KARKALAS; QI, 2004)	33
Figura 3 – Representação esquemática dos três tipos de cadeias presentes na estrutura ramificada da amilopectina. Cadeia A em vermelho, cadeia B em azul, ambas sem grupos redutores, e cadeia C em preto, com grupo redutor.	33
Figura 4 – Representação das diferentes estruturas de compósitos polímero/argila.	44
Figura 5 – Representação estrutural a) cinamaldeído e b) eugenol.	54
Figura 6 – Diagrama Pressão (P)/Temperatura (T) e os equilíbrios entre os estados sólido, líquido e gasoso; definição de região supercrítica para o CO ₂	55
Figura 7 – a) Diagrama esquemático do equipamento de impregnação supercrítica e b) Fotografia do equipamento de impregnação supercrítica utilizado neste trabalho (Patente EP 1 611 877 A1 (CIPRIANO DE SOUSA et al., 2006).	66
Figura 8 – a) Célula de alta pressão do equipamento de impregnação supercrítica e b) Suportes de aço inoxidável onde as amostras de filmes biodegradáveis eram colocadas. ...	66
Figura 9 – Representação esquemática da cápsula de alumínio vedada com parafina	69
Figura 10 – Representação esquemática das células A e B do equipamento OXTRAN para determinar a taxa de permeabilidade ao oxigênio.	71
Figura 11 – a) Fatia de pão embalado em filme biodegradável contendo açúcares e glicerol e b) Filme biodegradável contendo argila e glicerol (foto de Eduardo César Soares Faria de Oliveira).	76
Figura 12 – Superfície de resposta para a resistência máxima à tração ($R_{máx}$) [MPa] em função dos conteúdos de glicerol (G) e de nanopartículas de argila (A).....	85

Figura 13 – Superfície de resposta para a permeabilidade ao vapor de água (PVA) [$\text{g}_{\text{água}} \cdot \text{mm} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$] em função dos conteúdos de glicerol (G) e de nanopartículas de argila (A).....	88
Figura 14 – Termograma do filme biodegradável elaborado a partir da formulação contendo glicerol (0,75 g/100 g) e argila (0,10 g/100 g), mostrando dois valores distintos de temperaturas de transição vítrea.....	91
Figura 15 – Difratoograma das nanopartículas de argila pura.....	91
Figura 16 – Difratoograma dos filmes biodegradáveis elaborados com 0,75 g de glicerol/100 g de solução filmogênica.	92
Figura 17 – Difratoograma dos filmes biodegradáveis elaborados com 1,25 g de glicerol/100 g de solução filmogênica.	92
Figura 18 – Placas de Petri controle contendo os fungos <i>E. amstelodami</i> e <i>P. commune</i> . ..	95
Figura 19 – Placas de Petri inoculadas com o fungo <i>E. amstelodami</i> , com disco de papel filtro embebido em duas concentrações diferentes de óleo essencial de cravo.....	95
Figura 20 – Placas de Petri inoculadas com o fungo <i>E. amstelodami</i> , com disco de papel filtro embebido em duas concentrações diferentes de óleo essencial de canela.	96
Figura 21 – Placas de Petri inoculadas com o fungo <i>P. commune</i> , com disco de papel filtro embebido em duas concentrações diferentes de óleo essencial de cravo.	96
Figura 22 – Placas de Petri inoculadas com o fungo <i>P. commune</i> , com disco de papel filtro embebido em duas concentrações diferentes de óleo essencial de canela.	96
Figura 23 – Placas de Petri inoculadas com os fungos <i>E. amstelodami</i> e <i>P. commune</i>	101
Figura 24 – Placas de Petri inoculadas com o fungo <i>E. amstelodami</i> , com cortes circulares dos filmes biodegradáveis elaborados com óleo essencial de canela, de acordo com as formulações OE1, OE2 e OE3.	101

Figura 25 – Placas de Petri inoculadas com o fungo <i>P. commune</i> , com cortes circulares dos filmes biodegradáveis elaborados com óleo essencial de canela, de acordo com as formulações OE1, OE2 e OE3.	101
Figura 26 – Espectros do filme biodegradável a base de amido antes e depois de ser submetido ao tratamento com fluido supercrítico.	106
Figura 27 – Espectros do cinamaldeído puro e do filme biodegradável a base de amido antes e depois da impregnação de cinamaldeído com fluido supercrítico.	107
Figura 28 – Espectros do óleo essencial de canela puro e do filme biodegradável a base de amido antes e depois da impregnação de óleo essencial de canela com fluido supercrítico.	108
Figura 29 – Curvas de calibração dos agentes antimicrobianos incorporados às amostras de filmes biodegradáveis.	109
Figura 30 – Liberação de cinamaldeído impregnado em amostras de filme biodegradável através de tecnologia supercrítica.	110
Figura 31 – Liberação de óleo essencial de canela presente em amostras de filme biodegradável, incorporado pelo método tradicional e por tecnologia de fluido supercrítico.	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Conteúdos de glicerol e argila utilizados na elaboração dos filmes durante a segunda etapa do trabalho experimental.	62
Tabela 2 – Conteúdos de glicerol, óleo essencial de canela e emulsificante utilizados na elaboração dos filmes durante a quarta etapa de trabalho experimental.....	64
Tabela 3 – Tempo de exposição (T_e) [h] e taxa de despressurização (T_d) [$\text{bar} \cdot \text{min}^{-1}$] usados nos tratamentos dos filmes biodegradáveis a alta pressão.	67
Tabela 4 – Resistência máxima à tração ($R_{m\acute{a}x}$) [MPa] dos filmes biodegradáveis elaborados para escolha do método de incorporação de glicerol.	78
Tabela 5 – Elongação na ruptura (E) [%] dos filmes biodegradáveis elaborados para escolha do método de incorporação de glicerol.	78
Tabela 6 – Resistência máxima à tração ($R_{m\acute{a}x}$) [MPa] e elongação na ruptura (E) [%] dos filmes biodegradáveis elaborados pelo método 1, de acordo com o conteúdo de glicerol....	79
Tabela 7 – Permeabilidade ao vapor de água (PVA) [$\text{g} \cdot \text{mm} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{KPa}^{-1}$] e coeficiente de permeabilidade ao oxigênio ($P'O_2$) [$\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$] de filmes biodegradáveis elaborados pelo método 1 e de acordo com a proporção glicerol-fécula de mandioca e, em comparação aos dados de celofane e de polietileno de alta densidade.	81
Tabela 8 – Resistência máxima à tração ($R_{m\acute{a}x}$) [MPa] dos filmes biodegradáveis elaborados de acordo com o planejamento fatorial $2^1 \times 3^1$	83
Tabela 9 – Elongação na ruptura (E) [%] dos filmes biodegradáveis elaborados de acordo com o planejamento fatorial $2^1 \times 3^1$	85
Tabela 10 – Permeabilidade ao vapor de água (PVA) [$\text{g} \cdot \text{mm} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$] dos filmes biodegradáveis elaborados de acordo com o planejamento fatorial $2^1 \times 3^1$	86
Tabela 11 – Coeficiente de permeabilidade ao oxigênio [$\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$] dos filmes biodegradáveis elaborados de acordo com o planejamento fatorial $2^1 \times 3^1$	88

Tabela 12 – Resultados da T_{g-1} [°C] dos filmes biodegradáveis elaborados de acordo com o planejamento fatorial $2^1 \times 3^1$.	89
Tabela 13 – Resultados da T_{g-2} [°C] dos filmes biodegradáveis elaborados de acordo com o planejamento fatorial $2^1 \times 3^1$.	89
Tabela 14 – Áreas de inibição [%] referentes a cada óleo essencial avaliado contra os fungos <i>P.commune</i> e <i>E. amstelodami</i> .	94
Tabela 15 – Resistência máxima à tração ($R_{máx}$) [MPa] e alongação na ruptura (E) [%] de filmes biodegradáveis com adição de óleo essencial de canela.	98
Tabela 16 – Permeabilidade ao vapor d'água (PVA) [$g \cdot mm \cdot m^{-2} \cdot dia^{-1} \cdot KPa^{-1}$] e coeficiente de permeabilidade ao oxigênio ($P'O_2$) [$cm^3 \cdot m^{-1} \cdot dia^{-1} \cdot Pa^{-1}$] de filmes biodegradáveis com adição de óleo essencial de canela.	99
Tabela 17 – Áreas de inibição [%] referentes a cada formulação de filme biodegradável contra os fungos <i>P.commune</i> e <i>E. amstelodami</i> .	100
Tabela 18 – Aparência visual das amostras de filmes biodegradáveis submetidas ao tratamento com CO ₂ -sc nas diferentes condições operacionais testadas.	104
Tabela 19 – Permeabilidade ao vapor de água (PVA) [$g \cdot mm \cdot m^{-2} \cdot dia^{-1} \cdot kPa^{-1}$] dos filmes biodegradáveis sem tratamento e com tratamento com CO ₂ -sc (sem incorporação e com incorporação de agente antimicrobiano).	105

LISTA DE SIGLAS

ABIEF	Associação Brasileira da Indústria de Embalagens Plásticas Flexíveis
ABRE	Associação Brasileira de Embalagens
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de Variância
ASTM	American Society for Testing and Materials
DRX	Difração de Raio X
DSC	Differential Scanning Calorimetry
EVAL [®]	Etileno vinil acetato saponificado
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	Food and Drug Administration
FEMA	Flavor and Extract Manufacturers' Association
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISO	International Standardization Organization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives
MDIC	Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MMT	Montmorilonita
OEC	Óleo Essencial de Canela
PE	Polietileno
PEAD	Polietileno de Alta Densidade
PEBD	Polietileno de Baixa Densidade
PET	Polietileno Tereftalato
PVC	Polivinilclorido
UR	Umidade Relativa
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Área	$[m^2]$
d_{001}	Espaçamento basal	$[nm]$
E	Elongação na ruptura	$[\%]$
e	Espessura	$[mm]$
$F_{máx}$	Força máxima	$[N]$
L	Largura	$[mm]$
P	Pressão	$[bar]$
P_c	Pressão crítica	$[bar]$
PO_2	Permeabilidade ao oxigênio	$[cm^3 \cdot m^{-2} \cdot d^{-1} \cdot Pa^{-1}]$
$P'O_2$	Coefficiente de permeabilidade ao oxigênio	$[cm^3 \cdot m^{-1} \cdot d^{-1} \cdot Pa^{-1}]$
PVA	Permeabilidade ao vapor de água	$[g \cdot mm \cdot m^{-2} \cdot d^{-1} \cdot KPa^{-1}]$
p_s	Pressão de saturação do vapor	$[KPa]$
$R_{máx}$	Resistência máxima à tração	$[MPa]$
T	Temperatura	$[^{\circ}C]$
T_c	Temperatura crítica	$[^{\circ}C]$
t	Tempo	$[s; h; d]$
T_d	Taxa de despressurização	$[bar \cdot min^{-1}]$
T_e	Tempo de exposição	$[h]$
T_g	Temperatura de transição vítrea	$[^{\circ}C]$
TPO_2	Taxa de permeabilidade ao oxigênio	$[cm^3 \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}]$
$TPVA$	Taxa de permeabilidade ao vapor de água	$[g \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}]$
UR	Umidade relativa	$[\%]$
Δp	Diferença de pressão parcial	$[KPa]$
2θ	Dois teta, parâmetro angular utilizado em DRX	$[^{\circ}]$
w	Ganho de massa	$[g]$

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1	Histórico da indústria de embalagens.....	24
2.2	Mercado de embalagens.....	26
2.3	Principais propriedades de uma embalagem de alimentos.....	27
2.4	Embalagens plásticas.....	28
2.5	Embalagens biodegradáveis.....	29
2.6	Embalagens a base de amido.....	31
	2.6.1 Estrutura do amido.....	32
	2.6.2 Gelatinização e retrogradação do amido.....	34
	2.6.3 Características e propriedades da fécula de mandioca.....	36
	2.6.4 Amido termoplástico.....	37
	2.6.5 Plastificação do amido.....	38
2.7	Nanocompósitos.....	40
	2.7.1 Nanocompósitos polímero/argila.....	43
2.8	Embalagens ativas.....	46
	2.8.1 Inibição do crescimento microbiano em alimentos.....	48
	2.8.2 Embalagens antimicrobianas.....	49
	2.8.3 Óleos essenciais de canela cássia e de cravo talo.....	52
2.9	Impregnação de agente antimicrobiano com fluido supercrítico.....	54
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
3.1	Materiais.....	59
3.2	Elaboração dos filmes biodegradáveis.....	60
	3.2.1 Preparação de filmes biodegradáveis compostos de fécula de mandioca, glicerol e açúcares.....	61
	3.2.2 Preparação de filmes biodegradáveis compostos de fécula de mandioca, glicerol e nanopartículas de argila.....	62
	3.2.3 Preparação de filmes biodegradáveis compostos de fécula de mandioca, glicerol, nanopartículas de argila e óleo essencial de	

	<i>canela</i>	63
3.3	Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes biodegradáveis.....	64
	3.3.1 <i>Preparo do inóculo</i>	64
	3.3.2 <i>Determinação da concentração inibitória mínima dos óleos essenciais</i>	64
	3.3.3 <i>Determinação da atividade antimicrobiana dos filmes biodegradáveis ativos</i>	64
3.4	Impregnação de cinamaldeído puro e de óleo essencial de canela em filmes biodegradáveis usando CO ₂ supercrítico como solvente.....	65
3.5	Caracterização das amostras.....	68
	3.5.1 <i>Aspecto visual</i>	68
	3.5.2 <i>Espessura</i>	68
	3.5.3 <i>Propriedades mecânicas</i>	68
	3.5.4 <i>Permeabilidade ao vapor de água (PVA)</i>	69
	3.5.5 <i>Coeficiente de permeabilidade ao oxigênio (P'O₂)</i>	70
	3.5.6 <i>Calorimetria diferencial de varredura (DSC)</i>	72
	3.5.7 <i>Difração de raio X (DRX)</i>	73
	3.5.8 <i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	73
	3.5.9 <i>Libertação de cinamaldeído e óleo essencial de canela</i>	74
3.6	Análise dos resultados.....	74
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	75
4.1	Caracterização dos filmes biodegradáveis compostos de fécula de mandioca, glicerol e açúcares.....	76
	4.1.1 <i>Propriedades mecânicas</i>	79
	4.1.2 <i>Propriedades de barreira</i>	81
4.2	Caracterização dos filmes biodegradáveis compostos de fécula de mandioca, glicerol e nanopartículas de argila.....	82
	4.2.1 <i>Propriedades mecânicas</i>	83
	4.2.2 <i>Permeabilidade ao vapor de água (PVA)</i>	86
	4.2.3 <i>Coeficiente de permeabilidade ao oxigênio (P'O₂)</i>	88
	4.2.4 <i>Calorimetria diferencial de varredura (DSC)</i>	89

4.2.5	Difração de raio X (DRX).....	91
4.3	Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de cravo e de canela contra os fungos <i>Penicillium commune</i> e <i>Eurotium amstelodami</i>	94
4.4	Caracterização dos filmes biodegradáveis compostos de fécula de mandioca, glicerol, nanopartículas de argila e óleo essencial de canela	97
4.4.1	Propriedades mecânicas.....	98
4.4.2	Propriedades de barreira.....	99
4.4.3	Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes biodegradáveis adicionados de óleo essencial de canela.....	100
4.5	Caracterização dos filmes biodegradáveis compostos de fécula de mandioca, glicerol e nanopartículas de argila, impregnados com agentes antimicrobianos usando tecnologia de fluido supercrítico.....	102
4.5.1	Aspecto visual.....	103
4.5.2	Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	105
4.5.3	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	106
4.6	Quantificação de agente antimicrobiano impregnado em filmes biodegradáveis por casting e por tecnologia de fluido supercrítico.....	108
4.6.1	Curvas de calibração do cinamaldeído e do óleo essencial de canela.....	109
4.6.2	Libertação de cinamaldeído e de óleo essencial de canela incorporados aos filmes biodegradáveis por casting e por tecnologia supercrítica.....	110
5	CONCLUSÕES GERAIS.....	112
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	115
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117

1 INTRODUÇÃO

Com o intuito de substituir ou, pelo menos, reduzir o uso de polímeros derivados de petróleo, pesquisadores têm sido cada vez mais incentivados a desenvolver biomateriais que estão totalmente de acordo com o emergente conceito de desenvolvimento sustentável. O caráter biodegradável e renovável dos polímeros a base de amido já é conhecido há tempos, porém, sua aplicabilidade industrial ainda é pouco explorada. Além disso, na disputa contra os polímeros sintéticos derivados de petróleo, os biomateriais têm se mostrado futuros bons competidores, uma vez que as fontes de petróleo não são renováveis.

As embalagens produzidas com polímeros sintéticos convencionais são consideradas inertes ao ataque imediato de micro-organismos, apresentando longo tempo de vida útil. Consequentemente, provocam sérios problemas ambientais, visto que, após o seu descarte, demoram cerca de 100 anos para a decomposição total (ROSA; FRANCO; CALIL, 2001).

Como alternativa a este problema surgem as embalagens biodegradáveis, que se degradam rapidamente quando entram em contato com diversos tipos de micro-organismos. Assim, constituem alternativas viáveis para materiais de embalagem, apresentando a vantagem de não contribuir para a poluição do meio ambiente (ARVANITOYANNIS; BILIADERIS, 1999).

Na elaboração de filmes biodegradáveis, o amido é a matéria-prima mais utilizada, seja na sua forma nativa, modificada quimicamente ou como misturas entre amidos de diferentes fontes (GUILBERT; GONTARD; GOSSIS, 1996; KROCHTA; MULDER-JOHNSTON, 1997; PARRA et al., 2004; VEIGA-SANTOS, 2004; VEIGA-SANTOS; SCAMPARINI, 2004; VEIGA-SANTOS et al., 2005a; VEIGA-SANTOS et al., 2005b; DA RÓZ et al., 2006; FAMÁ et al., 2006; GARCÍA; PINOTTI; ZARITZKY., 2006; MALI et al., 2006; RODRÍGUEZ et al., 2006; ALVES et al., 2007; BERTUZZI et al., 2007; FAMÁ; GOYANES; GERSCHENSON, 2007; TALJA et al., 2007; TALJA et al., 2008; THUNWALL et al., 2008; XIONG et al., 2008; MÜLLER; LAURINDO; YAMASHITA, 2009; VÁSCONEZ et al., 2009; ZULLO; IANNACE, 2009; ARAUJO-FARRO et al., 2010; DAI et al., 2010; DIAS et al., 2010; GHANBARZADEH; ALMASI; ENTEZAMI, 2010; KECHICHIAN et al., 2010; PUSHPADASS; BHANDARI; HANNA, 2010; YOKSAN; CHIRACHANCHAI, 2010; ABDORREZA; CHENG; KARIM, 2011;

GALICIA-GARCÍA et al., 2011; GARCÍA et al., 2011; GHANBARZADEH; ALMASI; ENTEZAMI, 2011; LÓPEZ et al., 2011; TANG; ALAVI, 2011; TORRES et al., 2011; ZHONG; SONG; LI, 2011). O uso desta matéria-prima é devido à sua abundância no reino vegetal e à sua elevada degradabilidade. A diversificada aplicação deste material em uma variedade de produtos industrializados é possível por conta das suas diferentes características morfológicas e funcionais, que estão relacionadas à proporção e à estrutura da amilose e da amilopectina no grânulo de amido.

Dentre os diversos tipos de amidos encontrados, a fécula de mandioca tem-se mostrado uma importante fonte capaz de fornecer filmes flexíveis com boas características estruturais (HENRIQUE, 2002; PARRA et al., 2004; VEIGA-SANTOS, 2004; VEIGA-SANTOS et al., 2005a; VEIGA-SANTOS et al., 2005b; FAMÁ et al., 2006; MALI et al., 2006; ALVES et al., 2007; FAMÁ; GOYANES; GERSCHENSON, 2007; CHIVRAC; POLLET; AVÉROUS, 2009; MÜLLER; LAURINDO; YAMASHITA, 2009; VÁSCONEZ et al., 2009; KECHICHIAN et al., 2010; MÜLLER; LAURINDO; YAMASHITA, 2011). Além da fécula de mandioca ser atóxica e possuir baixo custo, o Brasil foi o segundo maior produtor mundial de mandioca em 2008, atrás apenas da Nigéria (FAOSTAT, 2008).

As propriedades mecânicas e de barreira dos filmes biodegradáveis constituem parâmetros importantes na avaliação de sua capacidade para uso como embalagens de alimentos. Os carboidratos possibilitam a obtenção de filmes com boas propriedades mecânicas, no entanto, não fornecem adequada barreira ao vapor de água devido ao seu caráter hidrofílico (ANKER et al., 2002).

Assim, com a finalidade de melhorar a permeabilidade elevada dos filmes biodegradáveis, a produção de bionanocompósitos provou ser uma opção promissora. Na literatura, encontram-se resultados interessantes em relação ao uso de diferentes tipos de argilas para incorporação como nanocargas em filmes biodegradáveis a base de amido. Os nanocompósitos argila/amido estudados demonstraram uma melhoria nas propriedades mecânicas, térmicas e de barreira (MCGLASHAN; HALLEY, 2003; AVELLA et al., 2005; CHIOU et al., 2007; KAMPEERAPPUN et al., 2007; CYRAS et al., 2008; TANG et al., 2008).

Outra alternativa interessante e que tem sido bastante estudada por vários pesquisadores para melhorar as propriedades de barreira dos filmes biodegradáveis é a incorporação de lipídios. Além de diminuir a permeabilidade ao vapor de água dos filmes, os lipídios podem prevenir a migração de água entre os componentes do

alimento. Dessa forma, o uso de óleo essencial de canela, atuando como um componente hidrofóbico, vem de encontro ao desejo de elaborar filmes que sejam, além de biodegradáveis, também ativos. Quando se adiciona um componente hidrofóbico à suspensão formadora do filme, produzem-se materiais compostos, nos quais o componente lipídico atua como barreira ao vapor de água e o polissacarídeo fornece a barreira ao oxigênio e dá as características mecânicas necessárias.

As embalagens ativas surgiram na tentativa de satisfazer consumidores mais exigentes (ROONEY, 1995) uma vez que fornecem diversos benefícios com relação à qualidade e segurança dos alimentos (JONG et al., 2005). Além de proteger, também interagem com o produto (ROONEY, 1995; VERMEIREN et al., 1999), trazendo benefícios extras em relação às embalagens convencionais.

Entre os diversos tipos de embalagens ativas conhecidas, as antimicrobianas, que agem inibindo ou retardando o crescimento microbiano no produto embalado (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002), são de grande importância para as indústrias, principalmente as do ramo alimentício.

Embora muitos materiais com atividade antimicrobiana já tenham sido elaborados, poucos estudos abordam a utilização de substâncias naturais e comestíveis. Diversos estudos mostram a eficácia do seu uso, uma vez que a ação antimicrobiana é comprovada quanto à inibição do crescimento de micro-organismos como *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* (LEUSCHNER; ZAMPARINI, 2002), *Listeria monocytogenes* (SINGH et al., 2003), *Penicillium commune*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus flavus* e *Endomyces fibuliger* (NIELSEN; RIOS, 2000) e *Pseudomonas putida* (OUSSALAH et al., 2006b).

A diminuição do uso de ingredientes químicos é uma tendência atual devido ao aumento da consciência dos consumidores quanto aos possíveis riscos a que estão sujeitos (NIELSEN; RIOS, 2000; SINGH et al., 2003; BURT, 2004; DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004; FERNÁNDEZ-LOPEZ et al., 2005; VALERO; GINER, 2006). A vantagem do uso de substâncias naturais como matéria-prima de embalagens, ao invés de agregá-los à formulação do produto alimentício, deve-se ao fato de que a sua adição, em níveis nos quais se perceba efeito antimicrobiano, pode alterar o sabor e características dos alimentos (HSIEH; MAU; HUANG, 2001; BURT, 2004).

Dentre as poucas patentes relacionadas à utilização de agentes naturais antimicrobianos, a maioria não está diretamente relacionada à aplicação em

embalagens e raros são os trabalhos envolvendo embalagens biodegradáveis (KECHICHIAN et al., 2007).

Considerando alguns compostos naturais e comestíveis com atividade antimicrobiana comprovada, destacam-se produtos derivados de canela (NIELSEN; RIOS, 2000; VALERO; SALMERÓN, 2003; KIM; PARK; PARK, 2004; MASATCIOGLU; AVSAR, 2005; OUSSALAH et al., 2006a; OUSSALAH et al., 2006b; KECHICHIAN et al., 2010), cravo (NIELSEN; RIOS, 2000; VALERO; SALMERÓN, 2003; SABAH; JUNEJA; FUNG, 2004; MASATCIOGLU; AVSAR, 2005; YANO; SATOMI; OIKAMA, 2006; NOVACOSK; TORRES, 2006; OUSSALAH et al., 2006a; OUSSALAH et al., 2006b; KECHICHIAN et al., 2010), alho (NIELSEN; RIOS, 2000; SABAH; JUNEJA; FUNG, 2004; YANO; SATOMI; OIKAMA, 2006), café (DAGLIA, et al., 1998; KECHICHIAN et al., 2010), mel (TAORMINA; NIEMIRA; BEUCHAT, 2001; MUNDO; PADILLA-ZAKOUR; WOROBO, 2004; KECHICHIAN et al., 2010), própolis (SFORCIN, et al., 2000; SALOMÃO et al., 2004; KECHICHIAN et al., 2010), laranja (CACCIONI et al., 1998; KECHICHIAN et al., 2010) e pimenta (PRASAD; SEENAYYA, 2000; MASATCIOGLU; AVSAR, 2005; KECHICHIAN et al., 2010), por serem produzidos e exportados pelo Brasil (FAOSTAT, 2008), indicando além do potencial para aplicação em embalagens biodegradáveis antimicrobianas, também a disponibilidade de matéria-prima e possibilidade de agregação de valor a produtos nacionais.

Com sua eficácia comprovada, os agentes antimicrobianos, futuramente, poderão também ser utilizados em outros tipos de filmes, biodegradáveis ou não, indicando um grande potencial de aplicação. Desta forma, a aplicação de aditivos naturais e comestíveis em embalagens ativas biodegradáveis atende ao consumidor de alimentos mais exigente em busca de produtos inovadores, seguros e ecologicamente corretos.

Em muitos casos, os métodos convencionais de incorporação de agentes ativos em filmes biodegradáveis apresentam uma série de inconvenientes, como é o caso da necessidade do uso de emulsificantes para facilitar a dispersão de um óleo em uma solução filmogênica de base aquosa, causando mudanças desfavoráveis na estrutura do filme e um aspecto heterogêneo indesejado. Dessa forma, usar um fluido comprimido altamente volátil, como o gás carbônico, ajuda na dissolução do agente a ser incorporado e favorece sua dispersão de forma homogênea dentro da matriz polimérica. Essa técnica é conhecida como impregnação com solvente

supercrítico e já tem diversas vantagens comprovadas no âmbito do desenvolvimento de materiais poliméricos impregnados com substâncias ativas (SIHVONEN et al., 1999; KIKIC; VECCHIONE, 2003; DAVIES et al., 2008; COSTA et al., 2010). Além de permitir uma dispersão homogênea do agente sem alterar as propriedades físicas, químicas e mecânicas da matriz polimérica, a técnica pode ser facilmente controlada através de modificações simples nas condições operacionais do sistema. Essas características mostram que a técnica tende a ser promissora para o desenvolvimento de materiais poliméricos impregnados com substâncias ativas e abre portas para uma nova área de estudo e pesquisa, com aplicação ainda pouco explorada.

OBJETIVOS

Objetivo geral da pesquisa

Em face do grande potencial demonstrado pela fécula de mandioca como matéria-prima capaz de formar uma nova classe de materiais de embalagens, este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de embalagens biodegradáveis ativas a base de fécula de mandioca, reforçadas com nanocargas e incorporadas com aditivo natural com potencial atividade antimicrobiana.

Objetivos específicos

- Desenvolver filmes a base de fécula de mandioca e diferentes agentes plastificantes (sacarose, açúcar invertido e glicerol).
- Realizar a caracterização mecânica e de barreira de cada formulação de filme biodegradável desenvolvido.
- Estudar a incorporação de argila esmectita atuando como nanocarga nos filmes a base de fécula de mandioca e glicerol.

- Determinar os efeitos da concentração de argila esmectita e da concentração de glicerol sobre as propriedades de barreira e mecânicas, temperatura de transição vítrea e de estrutura por difração de raio-X.
- Avaliar o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de cravo e canela sobre micro-organismos correntes em produtos de panificação.
- Verificar o efeito da presença de agente antimicrobiano sobre as propriedades de barreira e mecânicas dos filmes biodegradáveis.
- Incorporar cinamaldeído e óleo essencial de canela aos filmes biodegradáveis, usando CO₂ em estado supercrítico como solvente.
- Testar a atividade antimicrobiana dos filmes biodegradáveis incorporados com agente antimicrobiano, através de testes de difusão em halo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico da indústria de embalagens

A embalagem existe para atender aos anseios da sociedade humana e, desde os primórdios da civilização, vem evoluindo para atender as necessidades que se tornaram cada vez mais complexas. Para cumprir seu objetivo fundamental que é conter, proteger e transportar seu conteúdo permitindo que ele chegue a seu destino em perfeito estado de conservação, a embalagem foi se transformando e incorporando novos materiais e tecnologias de produção. Segundo a Associação Brasileira de Embalagem (ABRE), as grandes conquistas e avanços tecnológicos foram incorporados pela indústria de embalagem que soube se apropriar destes progressos para produzir uma variedade enorme de itens que passaram a embalar todo tipo de produto (ABRE, 2009). Hoje são produzidas, no mundo, milhares de embalagens diferentes por indústrias que transformam os metais, a celulose, os plásticos, o vidro, a madeira e as fibras têxteis em embalagens que movimentam anualmente cerca de um trilhão de dólares. Além de suas funções básicas, a embalagem desempenha as funções mercadológicas, desde a Revolução Industrial, quando a produção em grande escala obrigou os fabricantes a "embelezar" seus produtos para torná-los mais vendáveis. Assim, a embalagem tornou-se uma poderosa ferramenta de marketing que agrega valor e significado ao produto, tornando-o mais atraente e desejável para o consumidor (MDIC, 2005).

As primeiras embalagens surgiram há mais de 10.000 anos e serviam como simples recipientes para beber ou estocar. Esses primeiros recipientes, como cascas de coco ou conchas do mar, usados em estado natural, sem qualquer beneficiamento, passaram com o tempo a ser obtidos a partir da habilidade manual do homem. Tigelas de madeira, cestas de fibras naturais, bolsas de peles de animais e potes de barro, entre outros ancestrais dos modernos invólucros e vasilhames, fizeram parte de uma segunda geração de formas e técnicas de embalagem (MDIC, 2005).

A primeira matéria-prima usada em maior escala para a produção de embalagens foi o vidro. Por volta do primeiro século depois de Cristo, os artesãos sírios descobriram que o vidro fundido poderia ser soprado para produzir utensílios

de diversos formatos, tamanhos e espessuras. Essa técnica permitia a produção em massa de recipientes de vários formatos e tamanhos. Embora o uso de metais como cobre, ferro e estanho tenha surgido na mesma época que a cerâmica de barro, foi somente nos tempos modernos que eles começaram a ter um papel importante para a produção de embalagens (MDIC, 2005).

No início do Século XIX, a Marinha Inglesa utilizava as latas de estanho, e os enlatados de alimentos começaram a aparecer nas lojas inglesas por volta de 1830. As latas de estanho e aço difundiram-se durante a 2ª Guerra Mundial. O crescimento da demanda elevou o preço da folha de flandres, impondo aos produtores de latas a busca de uma matéria-prima substituta, o alumínio. Em 1959, a Adolph Coors Company começou a vender cerveja em latas de alumínio. Após a 2ª Guerra Mundial, a vida urbana ficou ávida por novos elementos (MDIC, 2005).

Em resposta, surgiram inúmeras inovações na produção de embalagens. Estas deveriam permitir que os produtos alimentares fossem transportados dos locais de produção para os centros consumidores, mantendo-se estáveis por longos períodos de estocagem. As embalagens de papel e papelão atenderam a esses requisitos. Elas podiam conter quantidades previamente pesadas de vários tipos de produtos, eram fáceis de estocar, transportar e empilhar, além de higiênicas (MDIC, 2005).

É também do imediato pós-guerra o aparecimento de um novo material para embalagens, o plástico. As resinas plásticas, como o polietileno e o poliéster, ampliaram o uso dos invólucros transparentes, iniciado na década de 20 com o celofane, permitindo a oferta de embalagens numa infinidade de formatos e tamanhos (MDIC, 2005).

Além da busca constante de materiais, a indústria de embalagens passou a combinar matérias-primas. As embalagens compostas reuniam características e propriedades encontradas em cada matéria-prima. É o caso das caixas de cartão que, ao receberem uma camada de resina plástica, tornam-se impermeáveis e podem ser utilizadas para embalar líquidos (sucos e leite) (MDIC, 2005).

No Brasil, até 1945, poucos produtos eram comercializados pré-acondicionados. Na indústria de alimentos, os principais eram o café torrado e moído, o açúcar refinado, o extrato de tomate, o leite em garrafa, o óleo de semente de algodão e o vinagre. Quase todos os produtos de primeira necessidade eram vendidos a granel, pesados no balcão e embrulhados em papel tipo manilha ou

embalados em sacos de papel. Além de alimentos, alguns outros produtos eram vendidos já embalados, como o cigarro, a cerveja, a cera para assoalho, a creolina, os inseticidas líquidos e os produtos de toucador, perfumaria e dentifrícios. Depois da 2ª Guerra Mundial, o processo de industrialização viabilizou as importações, impulsionando a demanda por embalagens, tanto ao consumidor quanto ao setor de transportes (MDIC, 2005).

Vários setores brasileiros reagiram a essas novas necessidades. Os sacos de papel multifoliados surgiram para atender a demanda no acondicionamento de cimento e produtos químicos. Instalaram-se, em todo o país, fábricas de sacos de papel para suprir os supermercados e o varejo de produtos de primeira necessidade. Com a implantação da Companhia Siderúrgica Nacional, no início dos anos 40, foi possível fornecer às indústrias de produtos químicos, de bebidas e de alimentos, as embalagens metálicas de folha de flandres (MDIC, 2005).

A partir dos anos 60, cresce a produção de embalagens plásticas. Dos anos 70 até os dias atuais, a indústria brasileira de embalagens vem acompanhando as tendências mundiais produzindo embalagens com características especiais como as destinadas ao uso em fornos de micro-ondas, as tampas removíveis manualmente, e também aquelas com proteção contra luz e calor e evidência de violação. Foram incorporadas também novas matérias-primas como o alumínio às latas e o PET (polietileno tereftalato) para frascos flexíveis (MDIC, 2005).

Atualmente, novas matérias-primas são constantemente desenvolvidas e incorporadas aos materiais de embalagens já existentes, sempre com o intuito de oferecer ao consumidor um produto de elevada qualidade.

2.2 Mercado de embalagens

A indústria de embalagens é hoje um dos setores mais importantes do mundo, embora somente agora comece a ser reconhecida e diagnosticada como um setor estratégico para a sociedade, representando um mercado de US\$ 500 bilhões, composto aproximadamente por 100.000 empresas e com uma geração de 5 milhões de empregos. De maneira geral, a indústria de embalagens representa de 1 % a 2 % do Produto Interno Bruto (PIB) (MDIC, 2005).

O consumo de embalagens no mundo é muito heterogêneo, estando concentrado nos países desenvolvidos, basicamente na Europa (US\$ 135 bilhões), EUA (US\$ 120 bilhões) e Japão (US\$ 40 bilhões). O consumo *per capita* anual também é um indicador de desenvolvimento, onde se nota um grande contraste do consumo do Brasil (US\$ 62) com o do EUA (US\$ 400), da Europa (US\$ 385) e do Japão (US\$ 450). De acordo com a World Packaging Organization, o segmento de papel e de papelão lidera o mercado mundial (33 %), seguido do segmento de plásticos (26 %), metálicos (25 %), vidros (6 %) e outros (10 %) (MDIC, 2005).

Os mercados da Europa, EUA e Japão atingiram sua maturidade em quase todos os segmentos de embalagem. Já nos países em desenvolvimento, como o Brasil, sinaliza-se um grande potencial de crescimento para esse mercado (MDIC, 2005).

2.3 Principais propriedades de uma embalagem de alimentos

Embalagens são usadas como proteção mecânica e como tecnologia de preservação de um alimento, retardando a sua deterioração, aumentando sua vida de prateleira e mantendo a qualidade e segurança do produto embalado (SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010).

Para uma proteção adequada, dois aspectos devem ser respeitados. Primeiramente, a embalagem deve proteger o alimento de condições ambientais adversas (luz, gases, umidade e temperatura), dificultando seu contato com o ambiente externo. A permeabilidade a esses fatores citados é de grande importância em função do tempo de vida útil do alimento, pois a deterioração de alimentos embalados depende grandemente das transferências que podem ocorrer entre o meio interno, dentro do material de embalagem, e o meio externo, no qual ele é exposto aos danos na estocagem e distribuição (MDIC, 2005).

A capacidade de uma embalagem de resistir à absorção ou evaporação de gases e vapores, resistir à permeação de lipídios e à passagem de luz é definida como barreira (SARANTÓPOULOS et al., 2001).

A barreira à passagem de vapor de água assegura a estabilidade de vários alimentos. O aumento de umidade pode causar efeitos indesejáveis em alguns produtos: alimentos em pó empedram ou se aglomeram, biscoitos e snacks perdem

a crocância e hortaliças e vegetais minimamente processados têm a sua estrutura alterada devido à perda de peso. Além disso, alguns alimentos podem sofrer perdas nutricionais e ficarem mais suscetíveis ao crescimento de micro-organismos e a alterações de cor e sabor. Em relação à barreira ao oxigênio, alta permeabilidade é desejável para embalagens de carnes vermelhas, evitando a perda da cor avermelhada característica do produto, e indesejável para alimentos ricos em lipídios, devido à formação de radicais livres e desenvolvimento de ranço.

Além disso, o material deve ter adequado desempenho mecânico durante o processo de embalagem do produto e resistir a choques e quedas durante o manuseio e transporte do produto já embalado. Sabendo que as propriedades mecânicas de uma embalagem dependem de diversos fatores (estrutura química e molecular do polímero, composição do material, aditivação, temperatura de transição vítrea, entre outros), os fabricantes devem estar sempre focados no seu uso final, levando em consideração as propriedades mais relevantes para cada tipo de produto.

2.4 Embalagens plásticas

Os plásticos são materiais modernos e, com o crescimento acelerado da indústria petroquímica, passaram a representar grande parte da indústria de embalagens. A primeira garrafa de polietileno (PE) moldada apareceu no Japão em 1945, seguida de garrafas de polivinilclorido (PVC) para embalar óleo comestível. Em 1972, garrafas compostas por multi-camadas com alta barreira contra oxigênio foram desenvolvidas pela Toyo Seikan para armazenar maionese e ketchup, usando EVAL[®] (copolímero etileno vinil acetato saponificado) (KISHIMOTO, 1990).

A indústria de plásticos foi um dos setores que apresentou as maiores taxas de crescimento no mundo nos últimos 25 anos, refletindo principalmente a expansão do mercado consumidor e o dinamismo do processo de substituição de produtos e materiais tradicionais por bens baseados em petroquímica. Apresenta um papel importante na economia moderna, estando presente em diversos setores, principalmente alimentício, automobilístico, de cosméticos, farmacêutico, de higiene e limpeza, de construção civil, entre outros, que vem ampliando, a cada ano, a utilização da matéria-prima em seus produtos (MDIC, 2005).

De acordo com a ABRE, a indústria de plásticos em 2008 foi responsável por 37,64 % do mercado brasileiro de embalagens, representando uma produção com valor aproximado de R\$ 13,8 bilhões.

O mercado de embalagens flexíveis no Brasil é estimado em uma produção de cerca de US\$ 1,7 bilhão, o equivalente a 9 % da produção americana. Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Embalagens Plásticas Flexíveis (ABIEF), existem cerca de 2000 empresas nesse setor, sendo que estas são, em sua maioria, pequenas e médias empresas.

Os filmes monocamadas dominam o cenário de embalagens flexíveis para alimentos. Estes são utilizados para embalar 40 % em peso da produção das principais categorias de alimentos embalados por flexíveis. Os filmes laminados embalam 25 %, filmes coextrusados 5 % e outros materiais 30 % (MDIC, 2005).

O mercado dos filmes multicamadas (laminados ou coextrusados) é orientado a agregar valor a produtos que requerem maior proteção por barreira ou propriedades mecânicas contra condições ambientais e contra a tensão proveniente do transporte e distribuição. Os requerimentos para proteção dos alimentos no Brasil são mais críticos em função do seu clima tropical com temperaturas altas, elevada umidade relativa e sua extensão continental que implica em períodos longos de transporte e estrutura pobre das estradas brasileiras que aplicam alta tensão mecânica durante o transporte. Já os filmes laminados são mais utilizados para se obter boa barreira ao vapor de água e para melhorar o desempenho mecânico da embalagem (MDIC, 2005).

2.5 Embalagens biodegradáveis

Embalagens biodegradáveis ou filmes biodegradáveis, também conhecidas como biofilmes, são materiais degradados por micro-organismos (KROCHTA; MULDER-JOHNSTON, 1997) e matérias-primas como proteínas (KIM; USTUNOL, 2001; SOBRAL et al., 2001; VANIN et al., 2005, WOLF; SOBRAL; TELIS, 2009), lipídios (GALLO et al., 2000; YANG; PAULSON, 2000) e polissacarídeos (AVÉROUS et al., 2000; FISHMAN et al., 2000; KIM; HRKACH; LANGER, 2000; AVÉROUS; BOQUILLON, 2004; MALI et al., 2004; PARRA et al., 2004; SILVEIRA, 2005; TAPIA-BLÁCIDO; SOBRAL; MENEGALLI, 2005; VEIGA-SANTOS et al., 2005a; VEIGA-

SANTOS et al., 2005b; ATTARIAN et al., 2006; FAMÁ et al., 2006; HAYASHI et al., 2006; MALI et al., 2006; PARRA et al., 2006; RODRÍGUEZ et al., 2006; ALVES et al., 2007; BERTUZZI et al., 2007; FAMÁ; GOYANES; GERSCHENSON, 2007; TALJA et al., 2008; THUNWALL et al., 2008; XIONG et al., 2008; MÜLLER; LAURINDO; YAMASHITA, 2009; VÁSCONEZ et al., 2009; ZULLO; IANNACE, 2009; ARAUJO-FARRO et al., 2010; DAI et al., 2010; DIAS et al., 2010; GHANBARZADEH; ALMASI; ENTEZAMI, 2010; KECHICHIAN et al., 2010; PUSHPADASS; BHANDARI; HANNA, 2010; YOKSAN; CHIRACHANCHAI, 2010; ABDORREZA; CHENG; KARIM, 2011; GALICIA-GARCÍA et al., 2011; GARCÍA et al., 2011; GHANBARZADEH; ALMASI; ENTEZAMI, 2011; LÓPEZ et al., 2011; TANG; ALAVI, 2011; TORRES et al., 2011; ZHONG; SONG; LI, 2011) podem ser utilizadas na sua elaboração.

De acordo com Henrique, Cereda e Sarmiento (2008), biofilme é um filme fino preparado a partir de materiais biológicos, que age como barreira a elementos externos e, conseqüentemente, protege o produto embalado de danos físicos e biológicos, aumentando a sua vida útil.

Os filmes comestíveis devem apresentar algumas características para atuarem como embalagens de alimentos: boas qualidades sensoriais, boas propriedades de barreira, propriedades mecânicas eficientes, estabilidade microbiológica, físico-química e bioquímica, serem livres de componentes tóxicos ou prejudiciais à saúde, terem tecnologia simples, serem de baixo custo e não poluírem (DEBEAUFORT; GALLO; VOILLEY, 1998).

O desenvolvimento de recipientes biodegradáveis tem sido impulsionado pela necessidade de se reduzir os resíduos de embalagens produzidos pelo consumo de alimentos e de produtos que, em geral, causam impactos ao meio ambiente (ROY et al., 2000; VEIGA-SANTOS; SCAMPARINI, 2004; GARCÍA et al., 2004; JEREZ et al., 2005; VEIGA-SANTOS et al., 2008).

Os polímeros convencionais são amplamente utilizados pelas empresas produtoras de alimentos, porém possuem reciclagem de alto custo e consomem uma considerável quantidade de energia para o seu processo. Aliado a este fato, a reciclagem é limitada, uma vez que materiais plásticos não podem ser reciclados inúmeras vezes (PARRA et al., 2004; AVELLA et al., 2005).

2.6 Embalagens a base de amido

Entre os filmes biodegradáveis de polissacarídeos, destacam-se os obtidos de amido (PARRA et al., 2004; VEIGA-SANTOS et al., 2005a; VEIGA-SANTOS et al., 2005b; ATTARIAN et al., 2006; FAMÁ et al., 2006; GARCIA; PINOTTI; ZARITZKY, 2006; HAYASHI et al., 2006; MALI et al., 2006; ALVES et al., 2007; BERTUZZI et al., 2007; FAMÁ; GOYANES; GERSCHENSON, 2007; TALJA et al., 2008; THUNWALL et al., 2008; XIONG et al., 2008; MÜLLER; LAURINDO; YAMASHITA, 2009; VÁSCONEZ et al., 2009; ZULLO; IANNACE, 2009; ARAUJO-FARRO et al., 2010; DAI et al., 2010; DIAS et al., 2010; GHANBARZADEH; ALMASI; ENTEZAMI, 2010; KECHICHIAN et al., 2010; PUSHPADASS; BHANDARI; HANNA, 2010; YOKSAN; CHIRACHANCHAI, 2010; ABDORREZA; CHENG; KARIM, 2011; GALICIA-GARCÍA et al., 2011; GARCÍA et al., 2011; GHANBARZADEH; ALMASI; ENTEZAMI, 2011; LÓPEZ et al., 2011; TANG; ALAVI, 2011; TORRES et al., 2011; ZHONG; SONG; LI, 2011), por serem uma alternativa mais viável economicamente às resinas tradicionais (CHANDRA; RUSTGI, 1998) e por advirem de fontes renováveis, largamente disponíveis (FAMÁ et al., 2006) e de baixo custo (AVÉROUS et al., 2000).

Devido ao aumento no preço dos amidos obtidos de fontes tradicionais (por exemplo, amido de milho), a fécula de mandioca tem sido recentemente considerada como uma alternativa econômica para a indústria de alimentos (FAMÁ et al., 2006). No Brasil, a utilização de fécula de mandioca para a produção de material biodegradável vem ganhando destaque (HENRIQUE; CEREDA, 1999; VICENTINI; CEREDA; CÂMARA, 1999; OLIVEIRA; CEREDA, 1999; HENRIQUE, 2002; PARRA et al., 2004; FAMÁ et al., 2006; ATTARIAN et al., 2006; HAYASHI et al., 2006; MALI et al., 2006; ALVES et al., 2007; FAMÁ; GOYANES; GERSCHENSON, 2007; MÜLLER; LAURINDO; YAMASHITA, 2009; VÁSCONEZ et al., 2009; KECHICHIAN et al., 2010). Sua utilização justifica-se pelo fato do Brasil ser considerado o segundo maior produtor mundial de mandioca, ficando atrás apenas da Nigéria. A produção brasileira de mandioca em 2009 foi de 26,03 milhões de toneladas e a safra estimada de 2010 foi de 26,08 milhões de toneladas, representando um aumento de 0,2 % (IBGE, 2010).

2.6.1 Estrutura do amido

O amido organiza-se em uma estrutura macroscópica onde camadas de amilose e amilopectina são depositadas radialmente em torno de um ponto central, denominado hilo. A deposição continuada faz crescer a estrutura e dá origem ao grânulo semicristalino. Pode ser considerado um carboidrato de estrutura complexa, formado de monossacarídeos (glicose) ligados entre si e representado pela fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n + xH_2O$. O grânulo de amido é constituído principalmente de longas cadeias de glicose interligadas e enroladas sobre si mesmas. Essas cadeias apresentam diferentes graus de hidratação e estão comprimidas em estruturas caracterizadas como grânulos (FRANCO et al., 2002).

A proporção entre amilose e amilopectina é variável com a fonte botânica, o que irá conferir características específicas à pasta de amido. O amido deve muito de sua funcionalidade a estas duas macromoléculas, assim como à organização física das mesmas dentro da estrutura granular. A disposição de amilose e amilopectina dentro do grânulo de amido ainda não é completamente compreendida. O empacotamento desses dois polímeros no grânulo de amido nativo não é ao acaso e sim, bem organizado (PERONI, 2003). As áreas cristalinas do amido mantêm a estrutura dos grânulos, controlam o seu comportamento na água e os tornam relativamente resistentes ao ataque enzimático e químico (BILIADERIS, 1991).

A amilose (Figura 1) é um polímero linear com unidades de D-glicose unidas por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$, com grau de polimerização de 200 a 3000, dependendo da fonte do amido (SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007). Durante a distensão de sua estrutura helicoidal não ramificada, a amilose apresenta a propriedade de absorver até 25 vezes seu peso em água (FRANCO et al., 2002).

Figura 1 – Representação estrutural da amilose (Fonte: TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

A amilopectina (Figura 2) é um polímero altamente ramificado, com unidades de D-glicose unidas por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ e as ramificações em $\alpha(1\rightarrow6)$ (SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007).

Figura 2 – Representação estrutural da amilopectina (Fonte: TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

A molécula de amilopectina (Figura 3) consiste de uma cadeia principal, que carrega o grupo redutor da molécula, e numerosas cadeias ramificadas denominadas A e B, com grupos não-redutores. As cadeias A são conectadas às cadeias B e C por ligações $\alpha(1\rightarrow6)$, mas não carregam qualquer ramificação. As cadeias B são aquelas conectadas às outras cadeias por ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ e possuem uma ou mais cadeias A ou B ligadas a ela através de ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ (PERONI, 2003).

Figura 3 – Representação esquemática dos três tipos de cadeias presentes na estrutura ramificada da amilopectina. Cadeia A em vermelho, cadeia B em azul, ambas sem grupos redutores, e cadeia C em preto, com grupo redutor.

Os grânulos de amido são formados por camadas que podem ser visualizadas em microscopia óptica. Geralmente, camadas claras e escuras são identificadas. Quando tratados termicamente em meio aquoso, essas camadas se

distanciam devido à absorção de água. Cerca de dois terços do grânulo de amido não está arranjado de maneira cristalina, ficando evidente que nessas regiões amorfas as moléculas estão parcialmente hidratadas, ou seja, os grânulos estão um pouco inchados (intumescidos). A separação radial das camadas após tratamento térmico ou ácido mostra que as camadas escuras são degradadas primeiramente, pois são amorfas, não-birrefringentes (FRANCO et al., 2002).

2.6.2 Gelatinização e retrogradação do amido

Com a combinação amido, água e calor, uma transição irreversível denominada gelatinização é alcançada, que pode ser caracterizada por uma endoterma obtida através de calorimetria diferencial de varredura (DSC, do inglês Differential Scanning Calorimetry), pela perda da birrefringência observada usando-se microscopia de luz polarizada (perda da cruz de malta) e pelo desaparecimento da cristalinidade evidenciada pela difração de raio X (DRX). O inchamento dos grânulos e a concomitante solubilização da amilose e da amilopectina induzem a uma gradual perda da integridade granular com a geração de uma pasta viscosa e destruição da maioria das ligações de hidrogênio (FRANCO et al., 2002).

O fenômeno de gelatinização do amido é extremamente importante para vários sistemas alimentícios. Grânulos de amido nativos são insolúveis em água abaixo de sua temperatura de gelatinização. Eles incham um pouco em água fria (de 10 % a 20 %), devido à difusão e absorção de água dentro das regiões amorfas, entretanto, este inchamento é reversível pela secagem (BILIADERIS, 1991). De acordo com Morrison (1995), nas zonas amorfas, os componentes que expandem são a amilose e um pouco da amilopectina. Essa expansão é limitada por ser severamente restringida pelas camadas essencialmente contínuas de amilopectina cristalina uma vez que essas camadas cristalinas não são perturbadas.

Baseados nos métodos de caracterização da gelatinização, vários modelos foram propostos, porém, ainda se desconhece uma explicação universalmente aceita a respeito desse processo (DONALD, 2004).

De acordo com Parker e Ring (2001), os grânulos de amido estão organizados em regiões cristalinas e amorfas, sendo que a transição entre essas regiões é gradual. Estudos mostram que a amilopectina é a responsável pela

cristalinidade do amido, não existindo evidências de que a amilose participe dessas regiões. Em amidos provenientes de raízes e tubérculos, a região cristalina é constituída das frações lineares da amilopectina, enquanto que os pontos de ramificação e a amilose são os principais componentes das regiões amorfas.

Observações microscópicas revelam que a desorganização pelo tratamento térmico de grânulos de amido envolve diversos estágios durante o aquecimento e que cada grânulo apresenta sua cinética própria. Em cada grânulo, é a região central que se desorganiza primeiro, sendo, portanto, a mais sensível ao aquecimento. A fácil difusão de água na região central menos organizada facilita o inchamento dos grânulos, o que revela que as modificações químicas devem predominar nessas regiões mais internas dos grânulos, que são mais amorfas do que as camadas mais externas (FRANCO et al., 2002).

Em decorrência da baixa ordem de cristalinidade, a região amorfa hidrata-se inicialmente e é mais lábil ao tratamento a quente do que a região cristalina. A desestabilização e expansão da região amorfa durante o aquecimento de uma suspensão de amido facilitam a posterior desestabilização da região cristalina por tirar moléculas das mesmas, conforme a temperatura se eleva. Sob baixas temperaturas de aquecimento, próximas à temperatura de início, a gelatinização ocorre primeiramente nas regiões amorfas do grânulo. Sob aquecimento contínuo à mesma temperatura, eventualmente, todas as regiões amorfas são desestabilizadas e as regiões cristalinas começam a gelatinizar. A extensão deste processo, entretanto, é dependente da temperatura. Com a elevação da temperatura de aquecimento, a extensão de regiões cristalinas que são gelatinizadas também aumenta. Quando a temperatura é suficientemente elevada, ambas as regiões, amorfas e cristalinas, são gelatinizadas. Assim, as regiões amorfas podem ser interpretadas como promotoras de gelatinização das regiões cristalinas do grânulo (FRANCO et al., 2002).

Durante o processo, o amido é convertido de uma forma semicristalina para uma forma amorfa. Depois de atingida a temperatura de gelatinização, toda dupla hélice da amilopectina é dissociada, embora a expansão da estrutura granular possa ser conservada até que temperaturas mais altas e cisalhamento sejam aplicados (PERONI, 2003).

A retrogradação é o processo que ocorre quando as moléculas de amido gelatinizadas começam a se reassociar favorecendo uma estrutura mais ordenada.

Sob condições favoráveis, esta estrutura ordenada pode se desenvolver em forma cristalina (DONALD, 2004). Esse comportamento é de grande interesse para cientistas e tecnólogos na área de alimentos, pois afeta profundamente a qualidade, aceitabilidade e meia-vida de muitos produtos a base de amido (PERONI, 2003).

Durante a retrogradação, as moléculas de amilose formam associações de duplas hélices de 40 a 70 unidades de glicose, sendo que a amilopectina forma duplas hélices menores, devido às restrições impostas pela estrutura ramificada das moléculas e o comprimento das ramificações. Essa reassociação ocorre de forma molecular e estrutural mais fraca que a encontrada na molécula nativa, portanto, menos energia é requerida para fundir os cristais reestruturados (SASAKI; YASUI; MATSUKI, 2000).

A amilose é considerada a responsável pelo processo de retrogradação. Existe uma relação entre o comprimento da cadeia de moléculas de amilose e a facilidade em retrogradar; moléculas muito grandes ou muito curvas têm dificuldade em se reassociarem, diminuindo a velocidade de retrogradação (PERONI, 2003).

Yamin et al. (1999) concordam que uma maior quantidade de amilose tem sido tradicionalmente associada à maior tendência à retrogradação, porém, os autores acreditam que amilopectina e materiais intermediários presentes nos amidos também desempenham papel importante na retrogradação durante o armazenamento sob refrigeração.

2.6.3 Características e propriedades da fécula de mandioca

O amido de mandioca é considerado uma matéria-prima importante na indústria de alimentos e é considerada a mais comercial dentre as culturas amiláceas tropicais. No Brasil, a extração do amido é feita em mais de 70 agroindústrias bem estabelecidas, com alguns amidos modificados básicos (FRANCO et al., 2002). De acordo com Peroni (2003), este amido mostrou o comportamento típico relatado na literatura, com temperatura e variação de entalpia de gelatinização iguais a 67,4 °C e 13,7 J·g⁻¹, respectivamente, e baixa tendência à retrogradação (4,89 %). A faixa de temperatura de gelatinização do amido é uma característica do genótipo da planta na qual o amido é sintetizado e é afetada pelas

condições do meio, especialmente a temperatura durante o desenvolvimento do grânulo (FRANCO et al., 2002).

Diferentemente de outras fontes de amido, a fécula da mandioca é facilmente extraída, resultando em um produto de cor branca sem necessidade de se usar agentes de clareamento, uma vez que os tubérculos contêm baixa quantidade de proteínas (< 0,20 %), lipídios (< 0,15 %), cinzas (< 0,21 %) e fósforo (< 0,007 %). Os grânulos são, em sua maioria, arredondados, com a superfície plana em um dos lados e uma cavidade no outro lado, exibem uma grande variação em seu tamanho ((5 a 40) μm) de acordo com a variedade e a estação do ano em que a colheita é realizada e possuem um conteúdo de amilose variando de (20 a 27) %, sendo que 40 % desse conteúdo corresponde à amilose solúvel (MOORTHY, 2004).

2.6.4 Amido termoplástico

O amido, sob pressão e temperatura, e na presença de um agente plastificante, pode ser gelatinizado, e sob efeito de cisalhamento, pode se transformar em um fundido, possibilitando seu uso em equipamentos de injeção, extrusão e sopro, tradicionalmente empregados para o processamento de plásticos convencionais (VILPOUX; AVÉROUS, 2004).

O método de fabricação de filmes a base de biopolímeros pode ser de dois tipos: úmido ou seco. O processo úmido requer a dispersão da macromolécula produzindo uma solução formadora de filme e tem sido extensivamente estudado e aplicado para produzir filmes comestíveis, biodegradáveis e coberturas (KESTER; FENNEMA, 1986). O processo de produção dos filmes a partir de solução formadora de filme envolve uma primeira etapa de solubilização da macromolécula (na água, no etanol, no ácido acético, entre outros), em cujo solvente podem ser incorporados diversos aditivos; na segunda etapa, essa solução é espalhada sobre um suporte e, usualmente, submetida à secagem (CUQ et al., 1995). O processo seco, por sua vez, baseia-se nas propriedades termoplásticas de alguns biopolímeros em condições de baixo conteúdo de umidade e tem sido aplicado com sucesso por usar tecnologia comum de processo de fusão, como a extrusão (FRITZ et al., 1994).

Os solventes utilizados na elaboração de filmes biodegradáveis normalmente são: a água, o etanol ou a combinação de ambos (KESTER; FENNEMA, 1986). A

macromolécula, ao dissolver-se, forma uma dispersão coloidal, isto é, um sistema formado por moléculas dispersas com dimensões muito maiores que as moléculas do solvente. Portanto, a solubilização da macromolécula está relacionada à sua capacidade de interagir com o solvente utilizado, sendo este um aspecto determinante na formação de filmes, visto que a total solubilidade é necessária para o processo de sua formação (BERTAN, 2008).

Os biopolímeros a base de amido são transparentes e fáceis de serem processados, fornecem moderadas a boas barreiras contra oxigênio e dióxido de carbono, são biodegradáveis e compatíveis com a maioria dos materiais, permitindo que misturas sejam elaboradas com facilidade. Suas principais desvantagens são a alta permeabilidade ao vapor de água, sua alta solubilidade em água e baixa resistência mecânica quando comparados com plásticos convencionais.

Os grânulos de amido exibem propriedades hidrofílicas e forte associação intermolecular através de ligações de hidrogênio devido aos grupos hidroxilas presentes na superfície do grânulo (MALI et al., 2006), porém, são pouco flexíveis, quebradiços e apresentam pobre termoprocessabilidade. Sendo assim, necessitam de modificações para serem aplicados como bioplásticos (WEBER, 2000; AVÉROUS; BOQUILLON, 2004). Dessa forma, a sua mistura com outros materiais é indispensável para melhorar suas propriedades mecânicas e de barreira. A questão da rigidez pode ser resolvida através da adição de plastificantes (SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007).

2.6.5 Plastificação do amido

Segundo a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), plastificantes são substâncias incorporadas a plásticos ou elastômeros com a finalidade de aumentar sua flexibilidade, processabilidade ou capacidade de alongamento. Um plastificante pode reduzir a viscosidade do fundido, abaixar sua temperatura de transição vítrea e diminuir seu módulo de elasticidade (FORINI, 2008). São substâncias que, quando adicionadas a outro material, provocam mudanças nas suas propriedades físicas, químicas e mecânicas (MCHUGH; KROCHTA, 1994). Além disso, em sua maioria, apresentam caráter hidrofílico e, por serem normalmente constituídos por moléculas pequenas, são facilmente acoplados

entre as cadeias poliméricas em virtude de sua habilidade de reduzir a formação de pontes de hidrogênio entre as cadeias, causando um aumento do volume livre ou da mobilidade molecular do polímero (BODMEIER; PAERATAKUL, 1997).

Seu mecanismo de ação envolve a diminuição, pelas moléculas do plastificante, das forças de Van der Waals que atuam entre as cadeias poliméricas reduzindo a atração intermolecular e, por consequência, aumentando a flexibilidade da cadeia polimérica, provocando interferências nas condições de processamento e propriedades do produto final (FORINI, 2008). Ele deve ser uniformemente distribuído e posicionado entre as moléculas de amido, assegurando certo grau de interação através de pontes de hidrogênio, de modo a evitar a separação de fases e a recristalização tanto do plastificante quanto do amido. Esse agente deve criar um espaço livre entre os amidos devido ao seu tamanho e deve armazenar água para auxiliar em seu trabalho (MATTA JUNIOR, 2009).

Os plastificantes mais comumente usados em filmes biodegradáveis são glicerol (PARRA et al., 2004; FAMÁ et al., 2006, MALI et al., 2006; ALVES et al., 2007; FAMÁ; GOYANES; GERSCHENSON, 2007), polietilenoglicol (PARRA et al., 2004) e outros polióis como sorbitol, manitol, sacarose (VEIGA-SANTOS et al., 2005a; VEIGA-SANTOS et al., 2005b; ATTARIAN et al., 2006; HAYASHI et al., 2006), glicose e frutose. Sua adição resulta em materiais com maior porcentagem de alongação, melhor flexibilidade e extensibilidade.

A sacarose, que é um material comestível, biodegradável e de baixo custo, tem demonstrado uma maior eficiência plastificante quando comparada ao sorbitol e ao glicerol. Entretanto, evidência da cristalização de filmes contendo sacarose foi relatada (VEIGA-SANTOS et al., 2008).

O glicerol é um composto orgânico pertencente à função álcool, presente em todos os óleos de origem vegetal e animal em sua forma combinada, ou seja, ligado a ácidos graxos, tais como, ácido esteárico, palmítico e láurico, para formar a molécula de triacilglicerol. Seu uso justifica-se tanto pelo seu poder plastificante quanto pela enorme quantidade na qual está sendo produzido, por se tratar de um subproduto da produção do biodiesel, o que contribui para seu baixo custo. Por ser o glicerol uma molécula hidrofílica relativamente pequena, pode ser introduzida entre as cadeias poliméricas adjacentes, resultando em decréscimo da atração intermolecular e, portanto, em aumento da mobilidade molecular. Este efeito melhora

a flexibilidade e a extensibilidade dos filmes (ALVES et al., 2007), promove a alongação e diminui a resistência à tração (RODRÍGUEZ et al., 2006).

Jangehud e Chinnan (1999) estudaram a influência de diferentes tipos de plastificantes (glicerol, sorbitol, polietilenoglicol e polipropilenoglicol) em três concentrações ((0,67; 1,17; 1,67) $\text{g}_{\text{plastificante}}/\text{g}_{\text{proteína}}$) sobre as propriedades mecânicas e de barreira de filmes biodegradáveis a base de proteína e concluíram que o glicerol foi o melhor plastificante para polímeros solúveis em água.

Os plastificantes são, geralmente, adicionados na proporção de (10 a 60) $\text{g}/100 \text{ g}_{\text{matéria seca}}$, dependendo do grau de rigidez esperado para o material. No entanto, dependendo da concentração em que são empregados, podem causar um efeito chamado antiplastificante, isto é, ao invés de aumentarem a flexibilidade e a hidrofiliidade, podem causar um efeito contrário. Geralmente, isto ocorre quando são empregadas pequenas concentrações de plastificante (abaixo de 20 $\text{g}/100 \text{ g}_{\text{amido}}$), de modo que o plastificante interage com a matriz polimérica, mas não em quantidade suficiente para aumentar a mobilidade molecular (SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007).

Devido à diminuição da atração intermolecular e do caráter hidrofílico dos plastificantes, sua presença aumenta a transmissão de vapor de água através dos filmes e, como consequência, os valores de permeabilidade ao vapor de água (PVA) são sempre altos quando comparados com filmes sem plastificantes (RODRÍGUEZ et al., 2006; BERTUZZI et al., 2007; TALJA et al., 2008). Além disso, a adição do plastificante diminui a temperatura de transição vítrea (T_g) dos filmes biodegradáveis devido ao enfraquecimento das interações macromoleculares, o que também é responsável pelo aumento observado na permeabilidade dos filmes biodegradáveis (TALJA et al., 2008).

Assim, com a finalidade de melhorar a permeabilidade elevada causada pelo efeito do plastificante e também melhorar as propriedades mecânicas dos filmes biodegradáveis, a produção de biocompósitos provou ser uma opção promissora.

2.7 Nanocompósitos

Compósitos são materiais compostos de dois ou mais componentes, em que pelo menos um desses tenha permanecido no estado sólido durante o

processamento (SEAVEY et al., 2001). Um compósito oferece propriedades que não são obtidas a partir dos seus componentes individuais.

O nanocompósito é um material híbrido que constitui um novo tipo de material bifásico, onde uma das fases possui dimensões em escala nanométrica (0,1 nm a 100 nm). Tal como acontece nos compósitos tradicionais, um dos componentes serve de matriz, na qual as partículas do segundo material se encontram dispersas. Os componentes de um nanocompósito podem ser de natureza inorgânica/inorgânica, inorgânica/orgânica ou ainda orgânica/orgânica (GRASSMAN; MÜLLER; LÖBMAN, 2002).

A possibilidade de se combinar propriedades de compostos orgânicos e inorgânicos em um único material é um desafio antigo. O estudo de nanocompósitos orgânico/inorgânicos expandiu este campo de investigação, principalmente os baseados em polímeros devido às possibilidades de novas aplicações em razão da melhoria das propriedades (VAIA, 2002).

As alterações das propriedades dos nanocompósitos de matriz polimérica estão relacionadas com o grau de dispersão das nanopartículas e com a interação química específica entre as cargas e o polímero. Por causa das dimensões nanométricas, essas interações podem influenciar a dinâmica molecular do polímero resultando em alterações significativas nas suas propriedades físicas, como o comportamento térmico e/ou mecânico (GILMAN et al., 2000).

Nos nanocompósitos, devido ao grau de dispersão das partículas das cargas, efeitos sinérgicos quanto às propriedades mecânicas, térmicas e de barreira a gases são obtidos. Diversos setores da indústria podem ser beneficiados por estes novos materiais, principalmente os setores automotivos, o de embalagens alimentícias e o de produtos de alto desempenho da construção civil e aeroespacial (KRISHNAMOORTI; YUREKLI, 2000).

Para a formação de nanocompósitos poliméricos, existem três tipos de nanopartículas: partículas com três dimensões nanométricas, como as nanopartículas de sílica esféricas; partículas com duas dimensões nanométricas, como as argilas lamelares, intensamente estudadas como nanocargas reforçadoras já que proporcionam propriedades excepcionais aos materiais; e o terceiro caso, com apenas uma dimensão nanométrica, como os nanotubos de carbono (ALEXANDRE; DUBOIS, 2000).

De acordo com Souza-Santos (1989), o termo argila significa um material natural de textura terrosa e de baixa granulometria, que desenvolve plasticidade quando misturado com uma quantidade limitada de água. Por plasticidade, entende-se a propriedade de o material úmido ficar deformado (sem romper) pela aplicação de uma tensão, sendo que a deformação permanece quando a tensão aplicada é retirada. Análises químicas de argila mostram que são constituídas essencialmente por silício, alumínio e água, e, frequentemente, por quantidades apreciáveis de ferro e de metais alcalinos e alcalino-terrosos.

Sob o ponto de vista físico-químico, as argilas podem ser consideradas como sistemas dispersos de minerais, nos quais predominam partículas de diâmetro abaixo de 2 μm (GRIN, 1963¹ apud FORINI, 2008).

As argilas mais utilizadas para a formação de nanocompósitos são as argilas esmectitas (como montmorilonita e saponita), a vermiculita, entre outras, tendo sua estrutura lamelar com lados de ordem micrométrica e a espessura de ordem nanométrica. A estrutura lamelar é um dos fatores responsável pelas propriedades diferenciadas de seus nanocompósitos, como maior resistência ao calor, maiores propriedades de barreira, aumento da biodegradabilidade dos polímeros biodegradáveis e melhoria das propriedades mecânicas (FORINI, 2008).

Os argilominerais são materiais que conferem às argilas suas principais características e propriedades e recebem este nome por serem predominantes nas argilas, o que visa diferenciá-los de outros minerais que podem estar presentes nas argilas, mas que não possuem suas características e nem são predominantes (VIEIRA-COELHO; SOUZA-SANTOS; SOUZA-SANTOS, 2007). Geralmente são cristalinos; quimicamente, são silicatos de alumínio hidratados, constituídos por folhas, planos ou camadas contínuas de tetraedros SiO_4 , ordenados em forma hexagonal, condensados com folhas ou camadas octaédricas, contendo em certos tipos outros elementos, como magnésio, ferro, cálcio, sódio, potássio, lítio e outros (SOUZA-SANTOS, 1989).

O *Comité International pour l'Étude des Argiles* recomenda que os argilominerais sejam divididos em duas classes gerais: silicatos cristalinos com estrutura fibrosa e silicatos cristalinos com estrutura em camadas (ou lamelar ou em

¹ GRIN, R. E. Propriedades das argilas: comportamento térmico. *Cerâmica*, v. 35, 1963.

folhas), classe na qual se encontram o grupo das esmectitas. Os silicatos de estrutura lamelar podem ser divididos em dois grupos: camadas 1:1 ou difórmicos (grupos caulina e serpentita) e camadas 2:1 ou trifórmicos (grupos esmectita, vermiculita e hidromicas). A nomenclatura 1:1 e 2:1 se prende ao número de camadas de tetraedros de SiO_4 e de octaedros de hidróxidos, respectivamente, que entram na constituição da cela unitária da estrutura cristalina do argilomineral (SOUZA-SANTOS, 1989).

A fórmula teórica do grupo da esmectita é $\text{Al}_4\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{OH})_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (n : água interlamelar), mas os argilominerais sempre diferem dessa composição devido às substituições isomórficas no reticulado cristalino e nos cátions trocáveis. O grau de substituição isomórfica das argilas esmectíticas é o que confere a este grupo a possibilidade de expandir a distância entre suas lamelas adjacentes (espaçamento basal) pela intercalação entre elas de cátions orgânicos ou inorgânicos, moléculas neutras, polares ou apolares (BEDIOUI, 1995² apud FORINI, 2008). Como as camadas interlamelares são fracamente ligadas, em presença de água ou em ambientes úmidos, os cátions trocáveis das esmectitas se hidratam, fazendo com que a água entre, e o espaçamento basal aumente de 10 Å para aproximadamente 15 Å (SOUZA-SANTOS, 1989).

2.7.1 Nanocompósitos polímero/argila

Atualmente, a aplicação de destaque das argilas está na área de nanocompósitos poliméricos. Entre os nanomateriais utilizados na preparação de nanocompósitos, 70 % do volume utilizado é de argilas. A popularização e a eficácia comprovada das esmectitas na preparação de nanocompósitos poliméricos se devem ao fato delas serem de origem natural e terem baixo custo, à elevada razão entre as dimensões das partículas (comprimento versus espessura), à boa capacidade de delaminação (separação das camadas de argila na matriz polimérica), à resistência das partículas aos solventes, às temperaturas empregadas

² BEDIOUI, F. Zeolite-encapsulated and clay-intercalated metal porphyrin, phthalocyanine and Schiff-base complexes as models for biomimetic oxidation catalysts: an overview. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 144, p. 39-68, 1995.

em polimerização e às temperaturas e atrito do processo de extrusão (PAIVA; MORALES; DIAZ, 2008).

Dependendo da natureza dos componentes usados em sua obtenção (camadas de silicato, cátions orgânicos e matriz polimérica), três tipos de estruturas de compósitos poliméricos com argilo-minerais podem ser obtidos: fase separada, nanocamadas intercaladas pelas cadeias poliméricas e nanocamadas esfoliadas pelas cadeias poliméricas, ilustradas na Figura 4.

Figura 4 – Representação das diferentes estruturas de compósitos polímero/argila.

A obtenção de fases separadas ou imiscíveis (microcompósito) ocorre quando a estrutura do silicato permanece sem alterações. O polímero apenas envolve as estruturas sem conseguir penetrar dentro das lamelas do silicato. Essas estruturas não são consideradas nanométricas, pois a não intercalação do polímero nas camadas dos silicatos dá origem a estruturas de dimensões micrométricas. A estrutura intercalada ocorre quando o polímero consegue entrar entre as camadas lamelares dos silicatos, mas a morfologia das argilas não se altera. Esses materiais são os mais comuns dos nanocompósitos, por sua obtenção ser considerada menos complicada. Já a estrutura esfoliada ocorre quando as camadas lamelares dos silicatos estão completa e uniformemente dispersas e o polímero está intercalado de maneira desordenada entre as camadas. Essa é a forma desejada de um nanocompósito, pois com a esfoliação das camadas, a separação das lamelas

aumenta muito a área de interação entre o polímero e o silicato, melhorando assim as suas propriedades (SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010).

Na literatura, encontram-se resultados interessantes em relação ao uso de diferentes tipos de argilas para incorporação como nanocargas em filmes biodegradáveis a base de amido. Os nanocompósitos argila/amido estudados demonstraram uma melhoria nas propriedades mecânicas, térmicas e de barreira (PARK et al., 2002; MCGLASHAN; HALLEY 2003; PARK et al, 2003; WILHELM et al., 2003; AVELLA et al. 2005; CHIOU et al. 2007; KAMPEERAPPUN et al. 2007; RAQUEZ et al., 2007; CYRAS et al. 2008; CHIVRAC et al., 2008; TANG et al. 2008; TANG; ALAVI; HERALD, 2008; CHIVRAC; POLLET; AVÉROUS, 2009).

Tang et al. (2008) relataram um aumento de 92 % na força máxima de ruptura e uma diminuição de até 70 % na permeabilidade ao vapor de água de filmes a base de amido/argila em relação aos filmes biodegradáveis a base de amido puro (milho, trigo, batata). Um aumento de 500 % no módulo de Young também foi observado em compósitos de amido/argila montmorilonita (MMT) (CYRAS et al., 2008). Outros tipos de argila, como hectorita (WILHELM et al., 2003) e caulim (CARVALHO; CURVELO; AGNELLI, 2001) apresentaram resultados similares.

Assim como os plastificantes interagem com o amido, supõe-se que eles também desempenhem um importante papel junto às nanopartículas de argila, afetando, dessa forma, a formação da nanoestrutura e as propriedades mecânicas e de barreira de filmes biodegradáveis nanocompósitos a base de amido e argila. Tang, Alavi e Herald (2008) estudaram a influência do conteúdo de glicerol na formação da nanoestrutura e nas propriedades de filmes nanocompósitos amido de milho/argila. Os nanocompósitos contendo amido, plastificante, argila (6 g/100 g_{solução}) e água (19 g/100 g), foram preparados em uma extrusora de dupla rosca de escala laboratorial. Análise de difração de raios X (DRX) mostrou intercalação e esfoliação das cadeias de amido dentro das galerias das camadas silicadas da argila MMT. Para filmes com (15 e 20) % de glicerol em relação ao conteúdo de amido, a análise indicou estrutura intercalada. Já os nanocompósitos com 5 % de glicerol e sem glicerol mostraram-se esfoliados, com as camadas lamelares aleatoriamente distribuídas na matriz polimérica. Assim, nota-se que, quando o conteúdo de glicerol adicionado aos filmes biodegradáveis diminui de (20 para 5) %, o grau de esfoliação aumenta. Com relação às propriedades de barreira, térmicas e mecânicas, os filmes com 5 % de glicerol apresentaram o menor valor de

PVA ($9,84 \text{ g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$), maiores valores de T_g ($53,78 \text{ }^\circ\text{C}$) e de força máxima de ruptura (35 MPa) e menor alongação na ruptura ($2,15 \%$).

Com a diminuição do conteúdo de plastificante, ocorre um aumento do grau de esfoliação das nanopartículas de argila, o que contribui para melhorar as propriedades de barreira das películas. Baixo conteúdo de plastificante facilita interações entre as cadeias de amido e as camadas de silicato de argila, permitindo que o plastificante e o amido difundam juntos dentro das camadas de silicato (o plastificante forma pontes de hidrogênio com o amido, substituindo as fortes interações entre os grupos hidroxila das moléculas de amido) (TANG; ALAVI; HERALD, 2008). Quando um alto conteúdo de plastificante é incorporado na formulação dos filmes biodegradáveis, o processo de esfoliação é inibido porque um aumento das interações plastificante-amido compete com as interações plastificante-amido-argila (CHIOU et al., 2007).

2.8 Embalagens ativas

Embalagens ativas são definidas como materiais que interagem com o alimento ou modificam a atmosfera interna à qual o produto está exposto (LABUZA; BREENE, 1989; QUINTAVALLA; VICINI, 2002; OZDEMIR; FLOROS, 2004). Esses sistemas têm como objetivo aumentar a vida de prateleira dos alimentos, mantendo sua qualidade e segurança por mais tempo (JONG et al., 2005). No entanto, essas embalagens nunca devem ser usadas em substituição às matérias-primas de boa qualidade e às boas práticas de fabricação de alimentos (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

O desenvolvimento de embalagens ativas, que devem, além de proteger, também interagir com o produto embalado (ROONEY, 1995; VERMEIREN et al., 1999) vem ganhando destaque. O sistema ativo pode ser parte integral ou ser um componente separado, posicionado no interior da embalagem (HONG; PARK, 2000).

As embalagens ativas estão incluídas no grupo de produtos resultantes das pesquisas a respeito de novas tecnologias para preservação de alimentos. São chamadas de ativas por não apresentarem um comportamento passivo em relação à conservação do alimento como ocorre com as embalagens tradicionais, que apenas

protegem o produto contra influências externas indesejáveis (LABUZA; BREENE, 1989; DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

Grandes perdas em alimentos são causadas por deterioração microbiana, e várias ações podem ser realizadas para diminuir o contato entre os micro-organismos e os alimentos, entre elas, o uso de embalagens adequadas ao produto (BURT, 2004; DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004; DURANGO; SOARES; ANDRADE, 2006).

As embalagens ativas podem agir de forma a reter ou absorver moléculas (por exemplo, oxigênio e aldeídos) ou liberar substâncias tais como etanol, componentes voláteis antimicrobianos e dióxido de carbono. As primeiras embalagens ativas desenvolvidas foram as que previam a inclusão de um sachê, contendo o ingrediente ativo, junto ao produto alimentício. Em termos operacionais, esta solução mostrou-se muito positiva e simples de ser incorporada, uma vez que não havia necessidade de mudanças em equipamentos ou processos de embalagem de produtos. Porém, o risco de ingestão acidental do sachê, muitas vezes adicionado de produto tóxico, foi considerado uma desvantagem neste tipo de técnica (LÓPEZ-RUBIO et al., 2004).

Entre os vários tipos de embalagens ativas destacam-se: a) as “flavor”-interativas que intencionam evitar ou garantir a perda de “flavor” do produto embalado (HOTCHKISS, 1997; SOARES; HOTCHKISS, 1998; LÓPEZ-RUBIO et al., 2004); b) as sequestrantes de gases, que previnem reações de oxidação, desaceleração de maturação de frutas e vegetais e evitam a deterioração da embalagem por acúmulo de CO₂ (MALOBA et al., 1996; VERMEIREN et al., 1999; SHIN; CHEIGH; LEE, 2002; ALTIERI et al., 2004; LÓPEZ-RUBIO et al., 2004; CONTE et al., 2009; MEXIS et al., 2010); c) as reguladoras de umidade, que controlam a mesma no interior da embalagem, preservando a atividade de água inicial do produto, reduzindo o risco de contaminação microbiológica (VERMEIREN et al., 1999; LÓPEZ-RUBIO et al., 2004); d) as anti-embaçantes (“anti-fogs”), que têm a finalidade de impedir ou diminuir a formação de vapor no interior da embalagem, dificultando a visualização do produto (VERMEIREN et al., 1999); e) as absorvedoras de luz ultravioleta (UV), que vêm sendo desenvolvidas para evitar a degradação da cor, “flavor” e aspectos nutricionais de alguns produtos (VERMEIREN et al., 1999); f) as indicadoras de variação da temperatura, que permitem a visualização de alterações indesejáveis de temperatura ou da avaliação tempo-

temperatura à que a embalagem foi exposta sem necessidade da sua abertura e/ou acompanhamento do armazenamento e estocagem do produto (SEIICHI, 1984; FANNI; RAMET, 1996; TORRES; OLIVEIRA, 1999; DAISUKE; HIROMICHI; YOSHIE, 2003; VEIGA-SANTOS, 2004; JONG et al., 2005); g) as indicadoras de pH, que reportam a correlação entre o produto embalado e seu pH durante a estocagem (HONG; PARK, 2000); e h) as embalagens antimicrobianas, que agem reduzindo, inibindo ou retardando o crescimento de micro-organismos que podem estar presentes no produto embalado ou no próprio material da embalagem (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; LÓPEZ-RUBIO et al., 2004; DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004; JONG et al., 2005; CONTE et al., 2007; RODRÍGUEZ; BATLLE, NERÍN, 2007; DEL NOBILE et al., 2009; KECHICHIAN et al., 2007; KECHICHIAN et al., 2010).

2.8.1 Inibição do crescimento microbiano em alimentos

Um alimento deteriorado pode ser definido como um produto que é considerado inaceitável para seu consumo. As maiores razões para um alimento ser considerado deteriorado são: mudanças sensoriais capazes de alterar as características esperadas para o alimento; mudanças químicas como a oxidação de gorduras, escurecimento enzimático, entre outras; e danos físicos (MILLER; KROCHTA, 1997).

O controle do crescimento microbiano pode ser atingido por métodos de preservação que aplicam calor (pasteurização, esterilização, resfriamento), que diminuem ou controlam a água disponível (congelamento, secagem, liofilização, concentração), por métodos físicos (filtração e centrifugação), por irradiação, por modificação na composição dos alimentos (atividade de água, pH, umidade) e também pelo uso de ingredientes naturais ou químicos que possuam ação antimicrobiana (FARKAS, 1997).

Os ingredientes antimicrobianos são compostos que, quando estão em contato com o alimento, inibem ou retardam o crescimento microbiano (ação bacteriostática), ou destroem os micro-organismos presentes (ação bactericida) (DAVIDSON, 1997) e podem ser utilizados como parte das matérias-primas do alimento, ser aplicados na superfície dos mesmos ou fazer parte das embalagens

dos produtos (FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

Diversos ingredientes têm sido utilizados para controle microbiológico de alimentos com destaque para os ingredientes antimicrobianos químicos sintéticos. Estes ingredientes possuem em geral limites máximos de uso devido aos possíveis riscos provocados pelo seu consumo, estabelecidos de acordo com o produto no qual o ingrediente será aplicado (JAY, 1992).

2.8.2 Embalagens antimicrobianas

A preservação de alimentos é um desafio constante contra os micro-organismos deterioradores que se desenvolvem e os degradam. Assim, cada vez mais, a substituição das técnicas de preservação tradicionais (tratamentos térmicos intensos, acidificação, secagem e preservação química) por novas, tem sido adotada pelas indústrias de alimentos, devido ao aumento da demanda por alimentos mais saborosos, nutritivos, naturais e de fácil manuseio. Dentre as tecnologias mais estudadas, estão os sistemas de embalagens ativas (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

Embalagens antimicrobianas são consideradas promissoras uma vez que o ingrediente antimicrobiano não faz parte da formulação do alimento, o que pode comprometer as características sensoriais do mesmo dependendo do nível de uso necessário para que se atinja o efeito desejado. Além disso, as substâncias antimicrobianas, quando fazem parte do produto embalado, podem ser neutralizadas ou difundidas rapidamente no produto e terem o seu efeito reduzido (HSIEH; MAU; HUANG, 2001; OUATTARA; SABATO; LACROIX, 2001; DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

Dois tipos de embalagens antimicrobianas podem ser encontrados atualmente: aquelas que contêm agentes antimicrobianos que migram para a superfície do material embalado e assim podem entrar em contato com o produto, e aquelas que são efetivas contra o crescimento microbiano sem a necessidade de migração do agente ativo ao alimento (BRODY; STRUPINSKY; KLINE, 2001).

Diversos filmes antimicrobianos estão sendo introduzidos no mercado, principalmente no Japão. Por exemplo, o agente anti-fúngico Imazalil (também conhecido como Enilconazole, fórmula molecular: $C_{14}H_{14}Cl_2N_2O$) tem demonstrado

ser efetivo quando incorporado a filmes de polietileno de baixa densidade para embalar frutas e vegetais. Esse mesmo composto também é efetivo na prevenção do crescimento de fungos na superfície de queijos. Entretanto, vários fatores, inclusive os que têm relação com a saúde e integridade humana devem ser considerados durante o desenvolvimento de um filme antimicrobiano. Deve-se considerar a toxicidade química dos compostos incorporados às embalagens. O Imazalil é um composto não aprovado como componente de embalagens de queijos nos EUA, apesar de sua comprovada ação antimicrobiana. Outro exemplo é o uso do anti-fúngico Benomil (fórmula molecular: $C_{14}H_{18}N_4O_3$), que provavelmente nunca terá seu uso aprovado como componente de embalagem de alimentos devido à sua alta toxicidade química (BRODY; STRUPINSKY; KLINE, 2001).

Entre as patentes relacionadas com embalagens antimicrobianas, a maioria aborda sistemas de embalagens e/ou mecanismos para liberação de agentes antimicrobianos (HANSEN et al., 1989; WILHELMUS; CHRISTIAAN; WILH, 2003; MILKOWSKI et al., 2004, KECHICHIAN et al., 2007); agentes químicos inorgânicos (HARA; MURATA, 1988; MIYAKE; YAMAMOTO; KURIHARA, 1990; YOKOTA, 1990; KANO, 1999); bacteriocinas (WILHOIT, 1996; APEL et al., 2002; KURAUCHI; FURUTA; SATO, 2003); e quitosanas (NAGAMURA et al., 1996).

A maioria dos antimicrobianos utilizados em alimentos apresenta ação bacteriostática e não bactericida. Desta forma, a vida útil dos produtos é prolongada, mas não de forma indefinida, uma vez que os micro-organismos ainda presentes continuam promovendo modificações no alimento (DAVIDSON, 1997).

O mecanismo de ação dos ingredientes antimicrobianos ainda não é bem definido. Acredita-se que um dos mecanismos de ação dos compostos seja por modificações na parede ou membrana celular, tornando-a mais permeável e, desta forma, há perda de material celular, causando a morte da célula. Atuam também em atividades principais da célula como o metabolismo de enzimas e na síntese de compostos e são capazes de coagular o citoplasma, inibindo o crescimento microbiano (FRAZIER; WESTHOFF, 1993; DAVIDSON, 1997; BURT, 2004).

O mercado exige produtos que, além de seguros microbiologicamente, apresentem características de sabor e aroma próximas do produto fresco e tenham sido processados o mínimo possível. Além destas características, o produto deve apresentar longa vida útil e atender às novas necessidades de consumo

(OUATTARA; SABATO; LACROIX, 2001; APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; MOREIRA et al., 2005; VALERO; GINER, 2006).

Apesar da eficiência dos ingredientes antimicrobianos químicos sintéticos, os fabricantes de alimentos têm enfrentado o desafio de reduzir o uso destes ingredientes para atender a demanda de consumidores preocupados com saúde e segurança alimentar. A ingestão de alimentos, adicionados de produtos químicos sintéticos, que apresentem riscos potenciais à saúde do consumidor, tem gerado discussões e exigências do mercado por produtos menos processados industrialmente e produzidos com adição de ingredientes naturais (NIELSEN; RIOS, 2000; SUPPAKUL et al., 2003; OZDEMIR; FLORES, 2004; MOREIRA et al., 2005).

Recentemente, muitos esforços estão concentrados na incorporação de compostos naturais e comestíveis (ervas, condimentos e óleos essenciais) como agentes antimicrobianos de filmes para embalagens flexíveis. É importante mencionar que o agente antimicrobiano escolhido deve ser capaz de suportar as temperaturas inerentes ao processo de formação dos polímeros e de se agregar entre os espaços das cadeias poliméricas (SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010).

Os ingredientes naturais, em diversos estudos, são avaliados quanto ao seu efeito antimicrobiano, na forma de óleos essenciais ou resinas (NIELSEN; RIOS, 2000; HSIEH; MAU; HUANG, 2001; OUATTARA; SABATO; LACROIX, 2001; NGUEFACK et al., 2004; SUHR; NIELSEN, 2004; MOREIRA et al., 2005; OUSSALAH et al., 2006a; OUSSALAH et al., 2006b; SEYDIM; SARIKUS, 2006; VALERO; GINER, 2006) ou na forma de pó (PRASAD; SEENAYYA, 2000; TSEGAYE; EPHRAIM; ASHENAFI, 2004; KECHICHIAN et al., 2010). Esses produtos possuem em sua composição componentes tais como eugenol, trans-cinamaldeído, carvacrol e timol, que são responsáveis pela inibição microbiana.

Embora existam poucas patentes que abordam materiais/agentes antimicrobianos envolvendo produtos naturais e comestíveis, a utilização de alguns produtos já foi citada na literatura: extrato de café (PARK; KI, 1995; DAGLIA et al., 1998; KECHICHIAN et al., 2007), alho (BENKEBLIA, 2004), cebolinha verde (YIN; TSAO, 1999), acelga (PONCE et al., 2003), canela (SPERTI; SWAY, 1984; KIM; PARK; PARK, 2004; KECHICHIAN et al., 2007), pimenta vermelha (PRASAD; SEENAYYA, 2000; KECHICHIAN et al., 2007), mostarda (WINTHER; NIELSEN, 2006), gengibre (LEUSCHNER; ZAMPARINI, 2002), laranja (CACCIONI et al., 1998; KECHICHIAN et al., 2007), coco (ESQUENAZI et al., 2002), cravo (ARORA; KAUR,

1999; KECHICHIAN et al., 2007), própolis (SFORCIN et al., 2000; KECHICHIAN et al., 2007), mel (TAORMINA; NIEMIRA; BEUCHAT, 2001; MUNDO; PADILLA-ZAKOUR; WOROBO, 2004; KECHICHIAN et al., 2007), limoneno (NAKATSU et al., 1995; CHASTAIN; SANDERS; SANDERS, 1996) e ácido cítrico (SEABROOK; CRAVER, 1999). Entre tais possíveis agentes antimicrobianos, produtos como canela, cravo e laranja foram exportados pelo Brasil em 2008 (FAOSTAT, 2008), indicando disponibilidade de matéria-prima e provável interesse nacional em incentivar sua utilização.

Entre os fatores que afetam a eficácia da ação dos antimicrobianos, a concentração da substância considerada antimicrobiana, a espécie e a quantidade de micro-organismos presentes no alimento, a temperatura e as propriedades químicas e físicas do substrato são as mais importantes. Um determinado ingrediente pode apresentar um significativo efeito antimicrobiano a uma dada concentração e apresentar efeito nulo caso esteja diluído. No caso específico dos antimicrobianos naturais como as especiarias e seus derivados, a variação inerente ao lote estudado, assim como as condições de cultivo, armazenamento e processamento dos mesmos podem influenciar o efeito antimicrobiano apresentado (FRAZIER; WESTHOFF, 1993; FERNÁNDEZ-LOPEZ et al., 2005).

2.8.3 Óleos essenciais de canela cássia e de cravo talo

Óleos essenciais são líquidos concentrados lipossolúveis, muito complexos quimicamente e que contêm componentes aromáticos voláteis. São obtidos de plantas (raízes, folhas, casca, galhos e hastes) através do processo de destilação a vapor (BARCELOUX, 2009). Vapor de água superaquecido por uma caldeira é injetado em um recipiente onde estão as plantas aromáticas a serem destiladas. O vapor quebra os tecidos da planta liberando o óleo essencial em forma vaporizada. O óleo essencial vaporizado e o vapor de água passam por um duto e são enviados para tanques de resfriamento. Os vapores retornam à forma líquida, são separados da água e capturados como óleo essencial puro da planta. A água remanescente é conhecida como hidrolato ou água floral. Uma variação deste processo, muito utilizada nos dias de hoje, é a extração através da destilação com CO₂, na qual esse gás é utilizado como solvente.

A canela provém da família Lauraceae, que compreende aproximadamente 250 espécies facilmente encontradas na China, Índia e Austrália. Canela cássia (*Cinnamomum cassia*) é também conhecida como canela chinesa, largamente cultivada no Sudeste da Ásia desde tempos remotos, ultimamente introduzida na Indonésia, América do Sul e Hawaii (BARCELOUX, 2009). O craveiro é uma árvore cultivada em Madagascar, Sri Lanka, Indonésia e sul da China. O botão de sua flor, seco, é utilizado como especiaria desde a antiguidade, empregado na culinária e na fabricação de medicamentos.

O conhecido poder de ambos os produtos na prevenção de doenças devido às propriedades das substâncias extraídas de suas plantas tem atraído a atenção de pesquisadores nos últimos anos. A canela tem sido usada para tratar dispepsia, gastrite, distúrbios da circulação sanguínea e doenças inflamatórias. Significativa atividade anti-alérgica, anti-ulcerogênica, anti-pirética, anestésica e analgésica tem sido verificada por alguns pesquisadores. Além de sua aplicação na área médica, a canela está entre as mais antigas especiarias conhecidas, devido ao seu forte poder aromático (WANG; WANG; YANG, 2009), sendo usada em alimentos como condimentos de doces, molhos e produtos de panificação. Também é amplamente usada em indústrias de alimentos e farmacêuticas devido à sua comprovada propriedade antimicrobiana.

O óleo extraído do cravo (*Eugenia caryophyllata*) apresenta diversas atividades biológicas, tais como propriedades antibacterianas, antifúngicas, inseticidas e antioxidantes e é tradicionalmente usado como agente aromatizante e antimicrobiano em alimentos. O óleo de cravo também apresenta efeitos terapêuticos, como analgésico, anti-espasmódico, anti-séptico e antialérgico. Além disso, seus efeitos medicinais compreendem o tratamento de náuseas, flatulência, indigestão e diarreia (WENQIANG et al., 2007).

O maior constituinte do óleo da casca da canela e o responsável por sua ação antimicrobiana é o cinamaldeído ((80 a 85) %) (Figura 5a) (BARCELOUX, 2009), composto com uso aprovado como aditivo de alimentos pelo FDA (Food and Drug Administration), FEMA (Flavor and Extract Manufacturers' Association) e JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives) (COCCHIARA et al., 2005).

A elevada concentração de eugenol ((70 a 80) %) (Figura 5b) contida no óleo essencial de cravo é a responsável pela sua forte atividade biológica e antimicrobiana. Esse composto fenólico pode desnaturar proteínas e reagir com os

fosfolípidios da membrana celular dos micro-organismos, alterando assim a sua permeabilidade (WENQIANG et al., 2007).

Figura 5 – Representação estrutural a) cinamaldeído e b) eugenol.

2.9 Impregnação de agente antimicrobiano com fluido supercrítico

O estado supercrítico é alcançado quando a temperatura e a pressão de uma substância estão acima dos seus valores críticos (Figura 6), e assim, não existe uma distinção entre a fase gasosa e a líquida. O fluido não pode ser liquefeito com o aumento da pressão e gás não é formado com o aumento da temperatura. Nesse estado, as propriedades físico-químicas do fluido supercrítico, tais como densidade, difusividade, constante dielétrica e viscosidade, podem ser facilmente controladas variando a pressão ou a temperatura sem atravessar os limites de fase (SIHVONEN et al., 1999). Propriedades relacionadas com a capacidade de solubilização, como a densidade, aproximam-se daquelas típicas de um líquido, enquanto que propriedades relacionadas com o transporte de matéria, como a difusividade e a viscosidade, alcançam valores típicos de um gás. É importante ressaltar que nenhuma substância é um fluido supercrítico, e sim, pode ser levada ao estado supercrítico pelo uso de calor e pressão até superar o seu ponto crítico.

A pesquisa com fluidos em estado supercrítico iniciou-se após o estabelecimento de processos a alta pressão e se mantém em estudo até os dias de hoje, sempre na tentativa de conhecer as vantagens do método e também no intuito de desenvolver metodologias para as mais diversas áreas de aplicação.

Até o final da década de 70, a extração com fluido supercrítico foi muito usada para isolar produtos naturais, mas sempre concentrada em apenas alguns produtos. A partir da década de 90, o desenvolvimento de processos e equipamentos fortificou-se e as indústrias ficaram mais interessadas em técnicas supercríticas (SIHVONEN et al., 1999).

Figura 6 – Diagrama Pressão (P) / Temperatura (T) e os equilíbrios entre os estados sólido, líquido e gasoso; definição de região supercrítica para o CO_2 .

Sabe-se que os processos convencionais (destilação, extração com solvente, adsorção, cristalização fracionada, separação por membranas, impregnação de compostos) são frequentemente menos custosos do que o emprego de tecnologia de fluido supercrítico e requerem menos esforços científicos no desenvolvimento de metodologias, entretanto, muitas vezes, a elevada qualidade do produto gerado compensa o maior custo dispensado e agrega mais valor ao produto final. Além disso, há casos em que os processos convencionais são inadequados e o uso de fluido supercrítico oferece uma solução viável.

Comparativamente aos métodos convencionais utilizados pela indústria, os processos com fluido supercrítico se desenvolvem em condições mais amenas de temperatura e com ausência de oxigênio, representando uma vantagem no manuseio de compostos sensíveis ao calor ou que se oxidam facilmente.

Apesar de existir um grande número de compostos que podem ser usados como fluido supercrítico, o dióxido de carbono (CO_2) é o mais frequentemente usado por ser um bom solvente, não ser tóxico e nem inflamável, ter baixo custo, ser facilmente retirado do produto processado e possuir temperatura e pressão críticas relativamente baixas (31,1 °C e 72 bar) (SIHVONEN et al., 1999). O gás carbônico supercrítico ($\text{CO}_2\text{-sc}$) combina a difusividade de um gás com a densidade de um

líquido, propriedades que podem ser facilmente ajustadas com mudanças na pressão (DAVIES et al., 2008).

Atualmente, os fluidos supercríticos são usados para polimerização (LÓPEZ-LUNA et al., 2010), inchamento (STAMENIC et al., 2010), impregnação (COSTA et al., 2010), purificação (MONTAÑES et al., 2010) e formação de partículas de polímeros (UL-HAQ et al., 2010). Outra aplicação interessante e que tem sido estudada é a esterilização de polímeros biodegradáveis (DILLOW et al., 1999). A esterilização ocorre sem mudanças químicas ao polímero, possivelmente como resultado da formação de ácido carbônico que reduz o pH intracelular (DAVIES et al., 2008).

Nos últimos anos, CO₂-sc tem sido largamente usado como solvente, anti-solvente e plastificante para síntese, modificação e purificação de polímeros sintéticos e naturais. A propriedade solvente do CO₂-sc, ou seja, a solubilidade dos polímeros em CO₂-sc e a solubilidade do CO₂-sc nos polímeros são temas fundamentais nesse campo de estudo. A maioria dos polímeros tem demonstrado baixa solubilidade no CO₂-sc (DAVIES et al., 2008), o que tem incentivado os pesquisadores a desenvolver novos polímeros altamente solúveis em CO₂-sc (SARBU; STYRANEC; BECKMAN, 2000; TAN et al., 2005). Por outro lado, a alta solubilidade do CO₂ nos polímeros pode representar uma grande vantagem e levar a quedas significativas da temperatura de transição vítrea do polímero (DAVIES et al., 2008), o que facilita a impregnação de aditivos, medicamentos, corantes, entre outros (TEJA; ECKERT, 2000). O efeito plastificante também é um importante benefício do processo: o gás age como um tipo de lubrificante, fazendo com que as cadeias moleculares deslizem facilmente umas sobre as outras, tornando o polímero menos rígido (KIKIC; VECCHIONE, 2003) e mais processável (HEREK et al., 2006).

A técnica de impregnação baseia-se no uso de um solvente supercrítico, como o CO₂ ou o CO₂ + co-solventes, que atua como um veículo de transporte para o agente a ser impregnado e que também plastifica a matriz polimérica, aumentando o volume livre e facilitando a difusão do agente em questão. A etapa de despressurização resulta na retenção da substância através de dois mecanismos: impregnação dentro do polímero e dispersão/deposição na superfície (COSTA et al., 2010).

A impregnação de uma substância em um polímero pode ser alcançada quando a substância ativa é solúvel no fluido supercrítico e o mesmo é permeável no

polímero. Se o agente a ser incorporado tem alta afinidade com a matriz polimérica ou uma específica interação com o polímero, a substância pode ser molecularmente dispersa dentro da matriz. Agentes com baixa afinidade pelo polímero geralmente são precipitados e depositados sobre a matriz durante a despressurização do sistema. Neste caso, a substância se cristalizará na superfície da matriz e não ficará molecularmente dispersa (DAVIES et al., 2008).

O grau de solubilidade e difusividade nos polímeros é influenciado tanto pela estrutura molecular (interação entre CO₂ e as cadeias moleculares) quanto pela morfologia do polímero (cristalino ou amorfo) (DAVIES et al., 2008). Geralmente, a solubilidade do CO₂ aumenta com maior conteúdo de grupos polares no polímero (TOMASKO et al., 2003). De acordo com estudo realizado por Oliveira et al. (2006), o CO₂ é mais solúvel em polímeros amorfos do que em cristalinos, pois os amorfos possuem um maior volume livre, o que permite que o CO₂ se difunda mais facilmente dentro de sua cadeia.

Todas as aplicações industriais com CO₂-sc requerem um entendimento preciso da transferência de massa de CO₂ e de aditivos na matriz polimérica para otimizar o processo. A elevação simultânea da pressão e da temperatura do sistema causa um aumento da difusividade mássica do CO₂, favorecendo a entrada da substância a ser impregnada dentro da matriz polimérica, que fica com mais mobilidade em sua cadeia e com maior volume livre disponível (TOMASKO et al., 2003).

Pequenos conteúdos de co-solventes podem melhorar o processo global, aumentando a polaridade do solvente (promovendo, assim, o aumento da solubilidade do agente a ser incorporado) ou melhorando o inchamento do polímero e sua plastificação. A quantidade de substância incorporada e/ou dispersa pode ser controlada variando as condições de temperatura e pressão do processo, bem como escolhendo um co-solvente apropriado. Outra grande vantagem do processo é a superação de algumas dificuldades pelo uso dos co-solventes: as substâncias incorporadas podem ser hidrofílicas ou hidrofóbicas, e até mesmo possuir baixa solubilidade no CO₂-sc (COSTA et al., 2010) pois o uso de um co-solvente adequado resolverá o problema em questão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a concretização dos objetivos propostos, o estudo foi dividido em etapas.

As quatro primeiras etapas foram desenvolvidas no Laboratório de Engenharia de Alimentos do Departamento de Engenharia Química da Universidade de São Paulo.

A primeira etapa compreendeu a elaboração de filmes biodegradáveis, por *casting*, a base de fécula de mandioca e aditivos plastificantes: glicerol e açúcares (sacarose e açúcar invertido). Como formulação controle, filmes contendo apenas fécula de mandioca e açúcares foram elaborados. Os filmes foram caracterizados quanto às suas propriedades mecânicas e de barreira.

Durante a segunda etapa, filmes a base de fécula de mandioca foram elaborados, por *casting*, usando etanol e água como solventes e glicerol como plastificante. Os açúcares usados na primeira etapa foram eliminados da formulação por se tratar de componentes que causam um envelhecimento precoce dos filmes flexíveis devido à sua cristalização. Como cargas de reforço, iniciou-se o uso de nanopartículas de argila. Os filmes elaborados foram caracterizados quanto às suas propriedades mecânicas, de barreira, térmicas e de estrutura.

A terceira etapa do trabalho consistiu na avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo e de canela, pelo método *pour plate*, contra dois micro-organismos: *Penicilium commune* e *Eurotium amstelodami*.

Na quarta etapa, óleo essencial de canela foi incorporado à solução filmogênica composta por fécula de mandioca, glicerol, emulsificante e nanopartículas de argila, e os filmes obtidos foram caracterizados quanto às suas propriedades mecânicas e de barreira. Sua ação antimicrobiana foi avaliada contra os micro-organismos citados, através do método de difusão em halo.

A última etapa do trabalho consistiu na impregnação de cinamaldeído e óleo essencial de canela em amostras de filmes biodegradáveis produzidos por *casting* com fécula de mandioca, glicerol e nanopartículas de argila, usando CO₂ supercrítico como solvente do composto antimicrobiano. A impregnação dos agentes antimicrobianos e a caracterização das amostras obtidas (permeabilidade ao vapor de água, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, quantificação de agente antimicrobiano incorporado nos filmes através de

espectroscopia) foram realizadas no Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra / Portugal, sob supervisão do Professor Doutor Hermínio José Cipriano Sousa.

3.1 Materiais

As matérias-primas utilizadas para a elaboração das formulações de filmes biodegradáveis foram fécula de mandioca (amilose: 19,7 g/100 g, amilopectina: 80,3 g/100 g, Cargill Agrícola S.A.), açúcar líquido invertido (sólidos totais: 75,8 g/100 g, inversão: 66 %, Copersucar S.A.), açúcar refinado granulado (sacarose: 99,8 g/100 g, umidade máxima: 0,04 g/100 g, Guarani S.A.), glicerol P.A. (pureza: 99,5 %, umidade máxima: 0,5 g/100 g, Synth), etanol P.A. (pureza: 99,5 %, umidade máxima: 0,2 g/100 g, Synth) e argila esmectita sódica montimorilonita (nome comercial: Argel T, usada sem purificação, Bentonit União). Os aditivos antimicrobianos estudados foram óleo essencial de canela cássia (*Cinnamomum cassia*, cinamaldeído: 82,5 %, densidade: 1,056 g/mL, Ferquima), óleo essencial de cravo talo (*Eugenia caryophyllata*, eugenol: 75 %, densidade: 1,036 g/mL, Ferquima) e cinamaldeído P.A. (pureza: 99,8 %, densidade: 1,047 g/mL, Synth). Éster de sacarose de ácidos graxos (esteárico e palmítico) foi usado como emulsificante de grau alimentício, específico para emulsão óleo/água, para incorporação dos óleos essenciais na solução filmogênica (nome comercial: SP70, umidade máxima: 4 g/100 g, Sisterna). Esses ingredientes foram incorporados à formulação durante o processo de elaboração dos filmes biodegradáveis e água destilada foi utilizada na sua elaboração. *Penicilium commune* e *Eurotium amstelodami* foram obtidos (Fundação André Tosello) na forma liofilizada e foram os micro-organismos usados na avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes incorporados com aditivos antimicrobianos. O meio de cultura usado nos testes microbiológicos foi composto pelo caldo (nome comercial: Czapek Dox, sacarose: 60 g/100 g (fonte de carbono), nitrato de sódio: 6 g/100 (fonte de nitrogênio), ágar: 30 g/100 g, Difco) e por ágar bacteriológico como agente gelificante (nitrogênio máximo: 2 g/100 g, umidade máxima: 18 g/100 g, Synth). O agente dispersante monooleato sorbitano etoxilado (nome comercial: Tween 80, Synth) foi usado no preparo dos inóculos de micro-organismos. Gases oxigênio analítico e mistura padrão (98 % nitrogênio e 2 %

hidrogênio) (White Martins, Brasil) foram usados nas análises de permeabilidade ao oxigênio. Dióxido de carbono analítico (White Martins, Portugal) foi usado nos tratamentos dos filmes a alta pressão.

3.2 Elaboração dos filmes biodegradáveis

Os filmes foram elaborados pelo processo de “*casting*”, no qual todos os ingredientes foram misturados (exceto etanol) e, após completa homogeneização, aquecidos em forno micro-ondas até a gelatinização do amido, que ocorre a aproximadamente 70 °C. Durante este aquecimento, a solução foi agitada manualmente por intervalos de tempo variáveis entre (15 e 30) s, para melhor homogeneização dos ingredientes e melhor distribuição do calor gerado. Após o seu resfriamento até temperatura ambiente, etanol foi adicionado e, então, uma quantidade desta solução filmogênica foi colocada sobre suportes e mantida em repouso por 24 h. De acordo com Hodge e Osman (1985), quando uma pasta de amido fica em repouso, sem agitação antes ou depois do resfriamento, a tendência é que se estabeleçam ligações intermoleculares, formando um gel. As regiões de tais ligações nos géis aumentam em número durante o período de repouso, tornando a rede mais firme e compacta em diferentes graus, segundo o número, tamanho e distribuição das regiões micelares.

Como suportes para a secagem das soluções filmogênicas, usou-se placas de polipropileno com 14,0 cm de diâmetro para os filmes elaborados na primeira e segunda etapas do projeto, e placas retangulares (7,5 cm x 13,0 cm) de politetrafluoretileno (polímero comercialmente conhecido como teflon), confeccionadas especificamente para serem usadas com as formulações contendo óleo essencial de canela, uma vez que o óleo se mostrou agressivo contra as placas de polipropileno.

Após o descanso, as placas com solução filmogênica foram submetidas à secagem em estufa a (35 ± 2) °C por (18-24) h. A quantidade de solução filmogênica colocada sobre cada placa foi calculada de acordo com a formulação usada, uma vez que se pretendia, ao final da secagem, que cada placa contivesse a mesma quantidade de sólidos totais, visando obter, assim, filmes com espessura constante de (100 ± 10) µm.

Antes de realizar as análises de caracterização, os filmes foram acondicionados em dessecador por no mínimo 2 dias, à temperatura ambiente e com umidade relativa controlada com solução de cloreto de sódio (75 % UR). Devido ao caráter hidrofílico dos filmes a base de amido, ambiente com alta umidade foi escolhido para acondicioná-los, a fim de avaliar seu comportamento em condições típicas de países com clima tropical (VEIGA-SANTOS et al., 2008).

3.2.1 Preparação de filmes biodegradáveis compostos de fécula de mandioca, glicerol e açúcares

Durante a primeira etapa de trabalho, como formulação para os filmes, utilizou-se, para 100 g de solução filmogênica, 5,0 g de fécula de mandioca, 0,7 g de sacarose, 1,4 g de açúcar líquido invertido, glicerol com conteúdo variando entre 0 g (formulação controle) e 2,0 g, e água destilada até completar 100 g de solução. As quantidades de cada componente foram definidas em testes preliminares. Todas as formulações foram caracterizadas em triplicata.

Para a elaboração dos filmes, três métodos de incorporação do glicerol foram testados:

- Método 1 (proposto por VEIGA-SANTOS (2004)): a solução filmogênica foi preparada através da simples mistura de todos os ingredientes (água, fécula de mandioca, sacarose, açúcar líquido invertido e glicerol) à temperatura ambiente.

- Método 2 (proposto por AVÉROUS et al. (2000)): a fécula de mandioca foi misturada ao glicerol até obtenção de uma solução homogênea e essa mistura foi colocada em estufa a 170 °C por 45 min e, ocasionalmente, agitada, permitindo vaporização da água e difusão do glicerol através dos grânulos de amido. Após o aquecimento, a solução foi mantida em repouso à temperatura ambiente até seu resfriamento e então os outros ingredientes (água, sacarose e açúcar líquido invertido) foram misturados.

- Método 3 (modificação do método proposto por AVÉROUS et al. (2000)): todos os ingredientes, exceto a água, foram misturados até obtenção de uma

solução homogênea. Essa mistura foi colocada em estufa a 170 °C por 45 min e, ocasionalmente, agitada, permitindo vaporização da água e difusão dos ingredientes (glicerol, sacarose e açúcar invertido) através dos grânulos de amido. Após o aquecimento, a solução foi mantida em repouso à temperatura ambiente até o seu resfriamento, quando foi adicionada a água.

Dentre as formulações testadas, os filmes biodegradáveis que apresentaram melhor aparência visual e superfície mais homogênea foram caracterizados quanto às suas propriedades mecânicas e de barreira, em triplicata.

3.2.2 Preparação de filmes biodegradáveis compostos de fécula de mandioca, glicerol e nanopartículas de argila

A segunda etapa de trabalho consistiu na avaliação de formulações contendo fécula de mandioca, glicerol e nanopartículas de argila dissolvidos em água e etanol. Avaliou-se a influência do glicerol e das nanopartículas de argila de acordo com o planejamento fatorial $2^1 \times 3^1$, sendo +1 seu valor máximo, -1 seu valor mínimo e zero o ponto central em relação ao conteúdo de argila. Os conteúdos de argila e glicerol incorporados à solução filmogênica estão mostrados na Tabela 1. Filmes biodegradáveis sem adição de argila foram elaborados e considerados como controle. Todas as quantidades estabelecidas nesse planejamento foram criteriosamente selecionadas após testes preliminares.

Tabela 1 – Conteúdos de glicerol e argila utilizados na elaboração dos filmes durante a segunda etapa do trabalho experimental.

(G/F):(A/F) ¹ [%]	Valores codificados		Valores originais [g/100 g]	
	Glicerol	Argila	Glicerol	Argila
15:0	-1	-1	0,75	0,0
15:1	-1	0	0,75	0,05
15:2	-1	+1	0,75	0,10
25:0	+1	-1	1,25	0,0
25:1	+1	0	1,25	0,05
25:2	+1	+1	1,25	0,10

¹ (G/F):(A/F) = (Glicerol/Fécula):(Argila/Fécula)

Para o preparo da solução filmogênica, primeiramente, 0,05 g ou 0,10 g de nanopartículas de argila foram agitadas em água destilada durante 1 h a fim de

garantir um estado de dispersão das partículas tal que facilitasse o processo de esfoliação das mesmas. Após um período de 24 h em descanso, essa mistura foi adicionada à suspensão de 5,0 g de fécula de mandioca, (0,75 g ou 1,25 g) de glicerol e água destilada até completar 100 g de solução filmogênica. Após a gelatinização, devido ao grande inchamento das nanopartículas de argila, a solução filmogênica tornou-se extremamente espessa, dificultando o espalhamento da mesma sobre os suportes para posterior secagem. Dessa forma, a adição de etanol (14,5 g) após o processo de gelatinização foi necessária a fim de diluir a solução e deixá-la com uma viscosidade mais adequada ao processo de espalhamento sobre as placas.

As formulações elaboradas foram caracterizadas quanto às suas propriedades mecânicas, de barreira, térmicas e de estrutura, em triplicata.

3.2.3 Preparação de filmes biodegradáveis compostos de fécula de mandioca, glicerol, nanopartículas de argila e óleo essencial de canela

Nesta etapa do trabalho, para o preparo da solução filmogênica, inicialmente misturou-se o óleo essencial de canela, o emulsificante éster de sacarose de ácidos graxos e o glicerol. Esses ingredientes foram colocados em agitador magnético sob fraco aquecimento (40 °C) por 10 min, em seguida, foram misturados aos demais ingredientes (fécula de mandioca, nanopartículas de argila (já dispersas em água destilada e agitadas por 1 h, no dia anterior) e água destilada) e levados ao aquecimento em forno micro-ondas até a obtenção de uma solução filmogênica gelatinizada.

Os conteúdos de glicerol, óleo essencial de canela e emulsificante, por 100 g de solução filmogênica, estão apresentados na Tabela 2. Aos conteúdos mostrados na tabela, adicionou-se 5,0 g de fécula de mandioca, 0,10 g de nanopartículas de argila e água destilada até completar 100 g de solução filmogênica. Após a gelatinização, adicionou-se 14,5 g de etanol para diluir a solução filmogênica e facilitar seu espalhamento sobre as placas.

As formulações elaboradas foram caracterizadas quanto às suas propriedades mecânicas e de barreira, em triplicata.

Tabela 2 – Conteúdos de glicerol, óleo essencial de canela e emulsificante utilizados na elaboração dos filmes durante a quarta etapa de trabalho experimental.

Formulação	Glicerol [g/100 g]	Óleo essencial de canela [g/100 g]	Emulsificante* [g/100 g]
OE 1	0,75	0,40	0,010
OE 2	1,13	0,60	0,015
OE 3	1,50	0,80	0,020

* éster de sacarose de ácidos graxos

3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes biodegradáveis

3.3.1 Preparo do inóculo

Os micro-organismos foram inoculados em meio de cultura e incubados a (25 ± 2) °C por 5 dias. Após o crescimento das colônias, as mesmas foram raspadas com auxílio de uma alça e transferidas para um frasco contendo 10 mL de água destilada com 0,1 % de Tween 80. A suspensão foi agitada por 1 min.

3.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima dos óleos essenciais

Pelo método *pour plate*, preparou-se placas de Petri adicionando 1,0 mL das suspensões de *Penicillium commune* e *Eurotium amstelodami* ao meio de cultura.

Cortes circulares de papel filtro (25 mm de diâmetro) foram embebidos em soluções alcoólicas com diferentes concentrações de cada óleo essencial (cravo e canela): (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 32,0) g_{óleo}/100 g_{solução}. Os discos foram colocados assepticamente sobre a superfície do meio de cultura solidificado com o inóculo. As placas foram incubadas a (25 ± 2) °C por 5 dias. A eficiência dos agentes antimicrobianos foi avaliada pela formação de halo ao redor do papel filtro (PEREIRA et al., 2005). Como controle, foi utilizado papel filtro sem agente antimicrobiano.

3.3.3 Determinação da atividade antimicrobiana dos filmes biodegradáveis ativos

Cortes circulares de filmes biodegradáveis incorporados com agentes antimicrobianos (25 mm de diâmetro) foram colocados assepticamente sobre a superfície do meio de cultura solidificado com o inóculo. As placas foram incubadas

a (25 ± 2) °C por 5 dias. A eficiência dos filmes biodegradáveis foi avaliada pela formação de halo ao redor dos filmes (PEREIRA et al., 2005). Os testes foram realizados 7 dias após a elaboração dos filmes.

3.4 Impregnação de cinamaldeído puro e de óleo essencial de canela em filmes biodegradáveis usando CO₂ supercrítico como solvente

Filmes biodegradáveis elaborados de acordo com a segunda etapa deste trabalho, contendo, em cada 100 g de solução filmogênica, 5,0 g de fécula de mandioca, 1,5 g de glicerol e 0,10 g de nanopartículas de argila, foram usados como matriz para impregnação de agente antimicrobiano, através do uso de tecnologia de fluido supercrítico. Ressalta-se que, como o CO₂ carrega com ele grande parte do glicerol usado como plastificante durante a despressurização do sistema, tomou-se o cuidado de usar um conteúdo maior do que o habitual na elaboração dos filmes submetidos à alta pressão.

O equipamento usado na impregnação supercrítica está descrito pela Patente EP 1 611 877 A1 (CIPRIANO DE SOUSA et al., 2006). Esta unidade (Figura 7) é composta por reservatório de CO₂ líquido comprimido (1), bomba para compressão (2), válvulas para entrada de CO₂ (3), banho de água com controle de temperatura (4), célula de impregnação (aproximadamente 10 cm³ de volume interno) com janela de safira (5), agitador magnético como ferramenta auxiliar para homogeneizar a mistura a alta pressão (CO₂ + agente antimicrobiano) (6), termômetro para controle da temperatura da água (7), manômetro para controle da pressão (8) e válvula para despressurização do sistema (9).

Amostras quadradas (1,2 cm x 1,2 cm), devidamente pesadas e previamente acondicionadas a 75 % de UR, foram introduzidas na célula de impregnação sobre suportes de aço inoxidável (Figura 8) e na posição vertical de modo a reduzir a probabilidade de deposição da substância na sua superfície durante a despressurização do sistema. A célula foi mantida sob alta pressão, imersa em água com temperatura controlada até sua estabilização.

Figura 7 – a) Diagrama esquemático do equipamento de impregnação supercrítica e b) Fotografia do equipamento de impregnação supercrítica utilizado neste trabalho (Patente EP 1 611 877 A1 (CIPRIANO DE SOUSA et al., 2006)).

Figura 8 – a) Célula de alta pressão do equipamento de impregnação supercrítica e b) Suportes de aço inoxidável onde as amostras de filmes biodegradáveis foram colocadas.

O processo iniciava-se através da introdução de CO_2 comprimido dentro da célula de impregnação previamente carregada com as amostras de filmes biodegradáveis. No caso de impregnação de agente antimicrobiano, 0,20 g de cinalmaldeído ou de óleo essencial de canela foram colocados no fundo da célula de impregnação, de forma que, ao entrar em contato com o fluido supercrítico, ele passava para a região de distribuição de fluido e, após, permanecia em equilíbrio estático com o filme polimérico. A quantidade de agente antimicrobiano introduzida na célula foi previamente estipulada através de testes preliminares, levando em conta o volume da célula de impregnação e a solubilidade do agente antimicrobiano no CO_2 nas condições operacionais impostas. Agitador magnético foi usado para dissolução e homogeneização da substância no fluido supercrítico. Dessa forma, a

pressão foi mantida constante durante todo o tempo de exposição do material ao CO₂-sc e, em seguida, procedia-se a despressurização do sistema na taxa determinada. Vale ressaltar que como a despressurização era controlada manualmente, as taxas sofreram variações ao longo do processo; assim, calculou-se sempre uma taxa de despressurização média do ensaio. Tratamentos a alta pressão sem impregnação de agente antimicrobiano também foram realizados e considerados testes controle. As amostras impregnadas foram congeladas para evitar evaporação da substância impregnada antes dos testes de caracterização.

Inicialmente, a matriz polimérica foi submetida somente ao CO₂ supercrítico, sem utilizar o agente antimicrobiano no sistema. Numa segunda fase, o cinamaldeído foi colocado na célula de impregnação e, sob alta pressão, foi dissolvido no CO₂ e impregnado à matriz, seguindo o planejamento proposto. Numa terceira fase, o óleo essencial de canela foi impregnado ao filme biodegradável na condição de melhor impregnação obtida com cinamaldeído. Todos os ensaios foram realizados a 35 °C.

Testes preliminares foram realizados para observar o comportamento da matriz polimérica quando submetida à alta pressão e a pressão máxima de trabalho de 250 bar foi definida. Avaliou-se a influência do tempo de equilíbrio estático do fluido com os filmes (tempo de exposição do filme ao agente antimicrobiano) e da taxa de despressurização do sistema de acordo com o planejamento fatorial $2^1 \times 2^1$, sendo +1 seu valor máximo e -1 seu valor mínimo. O tempo de exposição (T_e) e a taxa de despressurização (T_d) foram, respectivamente, (3 e 15) h e (1 e 10) bar·min⁻¹, de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 – Tempo de exposição (T_e) [h] e taxa de despressurização (T_d) [bar·min⁻¹] usados nos tratamentos dos filmes biodegradáveis a alta pressão.

$(T_e/T_d)^1$	Valores codificados		Valores originais	
	Tempo	Taxa de despressurização	Tempo [h]	Taxa de despressurização [bar·min ⁻¹]
(3/1)	-1	-1	3	1
(3/10)	-1	+1	3	10
(15/1)	+1	-1	15	1
(15/10)	+1	+1	15	10

¹ $(T_e/T_d) = (\text{Tempo de exposição}/\text{Taxa de despressurização})$

Após os ensaios de impregnação, as amostras com cinamaldeído ou óleo essencial de canela e também as amostras sem substância incorporada que foram

submetidas ao processo com CO₂ supercrítico foram caracterizadas (permeabilidade ao vapor de água e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier). Testes de libertação de cinamaldeído e de óleo essencial de canela em água foram realizados e o conteúdo libertado foi quantificado através de análise espectroscópica realizada em comprimentos de onda entre (200 e 600) nm, usando as curvas de calibração previamente determinadas.

3.5 Caracterização das amostras

3.5.1 Aspecto visual

Está relacionado à aparência do filme e pode ser avaliada por observações visuais e táteis. O filme deve apresentar uma superfície contínua e homogênea, ou seja, não deve apresentar fissuras e bolhas após o processo de secagem, nem partículas insolúveis ou poros abertos.

3.5.2 Espessura

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

3.5.3 Propriedades mecânicas

Resistência máxima à tração ($R_{máx}$) [MPa] e porcentagem de alongação na ruptura (E) [%] foram avaliadas por teste de tração realizado no texturômetro TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Reino Unido), com o probe A/TGT, de acordo com o método ASTM D882-10 (2010), modificado conforme a necessidade. Amostras retangulares (130 mm x 25 mm) pré-condicionadas (75 % UR) por no mínimo 48 h, cortadas com guilhotina de dois cortes (2G-15, REGMED, Brasil), foram colocadas

entre as garras do probe, com separação inicial de 50 mm e submetidas à tração a uma velocidade de $0,8 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. A resistência máxima à tração foi calculada dividindo a força máxima obtida pela área original da amostra (de acordo com a sua espessura mínima). A porcentagem de alongação na ruptura foi calculada dividindo o alongamento do corpo de prova na ruptura pelo seu comprimento inicial, que corresponde à distância entre as garras. A força máxima e o alongamento do corpo de prova na ruptura foram obtidos das curvas força-deformação, com a ajuda do software EXPONENT, versão 4.0.13.0.

Estas análises foram realizadas, em triplicata, no Laboratório de Engenharia de Alimentos do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (USP).

3.5.4 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

As amostras foram caracterizadas pelo método gravimétrico, com base na metodologia ASTM E96/E96M-10 (2010).

Cada amostra de filme foi cortada em forma de disco e fixada sobre uma cápsula de permeação feita de alumínio (PVA/4, REGMED, Brasil), com área igual a 44 cm^2 e selada com parafina. A selagem é realizada para garantir que toda transferência e absorção de umidade ocorra unicamente através da área exposta do filme. Dentro dessa cápsula, colocou-se sílica gel ativada em estufa a $200 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h (Figura 9). É importante que haja uma distância de aproximadamente 6 mm entre a camada de sílica gel e o filme. A mesma é um dessecante, com alta afinidade ao vapor de água, o que permite quantificar o ganho de massa, ou seja, a quantidade de vapor de água que permeia pelo material a ser testado.

Figura 9 – Representação esquemática da cápsula de alumínio vedada com parafina.

A umidade relativa fora da cápsula foi estipulada como 75 % (solução saturada de cloreto de sódio) e dentro da cápsula, 0 % (sílica gel ativada). Como a umidade relativa dentro da cápsula é sempre menor que fora, o transporte de vapor de água é determinado através do ganho de massa da sílica gel. Como o filme é hidrofílico, cápsulas foram preparadas com amostras do filme, porém sem sílica e consideradas como controle, de modo que a variação de massa do filme possa ser medida e corrigida em relação ao ganho de massa da sílica.

O ganho de peso de cada cápsula foi determinado ao longo do tempo e a taxa de permeabilidade ao vapor de água foi calculada de acordo com a Equação (1).

$$TPVA = \frac{w}{t \times A} \quad (1)$$

sendo: $TPVA$ a taxa de permeabilidade ao vapor de água [$\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$]; w o ganho de massa [g] no tempo t [h] e A a área do filme [m^2].

A PVA [$\text{g} \cdot \text{mm} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$] é calculada levando em consideração a espessura dos filmes (e) [mm], a pressão de saturação do vapor na temperatura do ensaio (p_s) [kPa] e as umidades relativas dentro (UR_1) e fora (UR_2) das cápsulas, de acordo com a Equação (2):

$$PVA = TPVA \times \frac{e}{p_s} \times (UR_1 - UR_2) \quad (2)$$

As cápsulas foram pesadas durante 2 dias, totalizando 10 medidas.

Estas análises foram realizadas, em triplicata, no Laboratório de Engenharia de Alimentos do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (USP).

3.5.5 Coeficiente de permeabilidade ao oxigênio ($P'O_2$)

Essa análise foi realizada segundo metodologia ASTM F1927-07 (2007), no equipamento OXTRAN 2/21 (MOCON), o qual serve para medir a quantidade de oxigênio que passa através de uma unidade de área paralela à superfície de um

material de embalagem durante certo período de tempo. Esse equipamento consiste de duas células de teste (A e B), onde as amostras a serem testadas são colocadas (Figura 10).

Figura 10 – Representação esquemática das células A e B do equipamento OXTRAN para determinar a taxa de permeabilidade ao oxigênio.

Durante o processo, o gás oxigênio é liberado entre as duas células, numa vazão de $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, enquanto que o gás de arraste, composto por uma mistura de 98 % de nitrogênio e 2 % de hidrogênio, com vazão de $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, passa pelo lado de fora das células. Conforme o oxigênio permeia o filme, ele se mistura ao gás de arraste e passa por um sensor coulométrico, que mede a corrente elétrica formada através de reações catódicas e anódicas e que é proporcional à quantidade de oxigênio.

Cada leitura é realizada em 30 min e, a cada 4 leituras, faz-se uma do zero, que serve para medir a quantidade de oxigênio existente no gás de arraste antes dele entrar em contato com o oxigênio permeado, para que essa quantidade possa ser descontada posteriormente. Assim, o procedimento segue a seguinte sequência de leituras: zero, célula A, célula B, célula A, célula B, zero, e assim por diante.

O equipamento é conectado a um microcomputador, cujo software fornece todos os resultados. A cada leitura realizada, um valor de taxa de permeabilidade ao oxigênio (TPO_2) [$\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$] é fornecido. O experimento termina quando nota-se que os valores de TPO_2 estão estabilizados, isto é, quando a curva $TPO_2 \times \text{tempo}$ se mostra constante. Assim, a taxa de permeabilidade ao oxigênio é obtida, sendo essa o maior valor dado durante toda a análise. Usa-se o maior valor de taxa de permeabilidade ao oxigênio e não a média dos valores, nem o último valor fornecido, porque, o objetivo é saber qual foi a maior quantidade de oxigênio que passou pelo

material de embalagem. A permeabilidade ao oxigênio (PO_2) [$\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$] é calculada pela Equação (3):

$$PO_2 = \frac{TPO_2}{\Delta p} \quad (3)$$

sendo: Δp a diferença de pressão parcial de oxigênio entre os dois lados do filme [kPa], que corresponde à pressão atmosférica (101,3 kPa) quando as amostras estão sujeitas a gás oxigênio puro (100%) de um lado e gás de arraste contendo 98 % de nitrogênio e 2 % de hidrogênio do outro lado.

O coeficiente de permeabilidade ao oxigênio ($P'O_2$) [$\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$], que é o valor utilizado como resultado da análise, é calculado multiplicando a permeabilidade ao oxigênio (PO_2) pela espessura (e) [mm] da amostra.

As análises são realizadas em modo contínuo, ou seja, só é interrompida quando o operador do equipamento desejar. Como o equipamento não tem compensador barométrico, a pressão colocada como padrão foi de 695 mmHg. A temperatura da câmara é controlada para ficar em 23 °C. A umidade do ambiente é controlada em 75 % com água padrão HPLC.

Estas análises foram realizadas, em triplicata, no Laboratório de Engenharia de Alimentos do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (USP).

3.5.6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A temperatura de transição vítrea (T_g) dos filmes biodegradáveis foi determinada no equipamento DSC TA 2010, controlado pelo módulo TA 4000 (TA Instruments, New Castle, USA), operado com nitrogênio a $150 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Amostras na ordem de 1 mg foram pesadas em balança de precisão SA 210 (Scientech, SA210, USA), condicionadas em cadinhos de alumínio hermeticamente fechados (20 μL) e submetidas a um programa de temperatura em atmosfera inerte ($100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ de N_2). A referência usada foi um cadinho de alumínio vazio. Calibrações da temperatura e entalpia foram realizadas com Índio (99,999 %, TA Instruments) e água (bidestilada e Milli-Q). Todas as corridas foram realizadas em taxa de 10

$^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, em atmosfera inerte ($100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de N_2). Na primeira corrida, após resfriar a amostra até $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, a uma taxa de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, a mesma foi submetida a um aquecimento até $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, a taxa de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. A segunda corrida foi de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, com a mesma taxa de resfriamento e aquecimento. Com ajuda do software Thermal Advantage (TA Instruments), a temperatura de transição vítrea (T_g) foi calculada como o ponto de inflexão da linha base, causada pela descontinuidade do calor específico da amostra. Os cadinhos de alumínio foram pesados antes e depois de cada teste para garantir que não ocorreu perda de massa durante o aquecimento.

Estas análises foram realizadas, em triplicata, no Laboratório de Engenharia de Processos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob supervisão da Prof^a. Miriam Dupas Hubinger.

3.5.7 Difração de raio X (DRX)

Os ensaios foram conduzidos em um difratômetro de raio-X (Philips X-Pert, modelo MPD, Holanda), equipado com uma fonte de cobre (radiação $\text{K}\alpha$), operado a 40 kV e 40 mA. Cada análise ocorreu por passos de $0,02^{\circ}$ (2θ , normalmente entre os ângulos $2\theta = 1^{\circ}$ e 90° , com tempo de acumulação de 1 s por passo).

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Matérias-Primas Particuladas e Sólidos Não-Metálicos do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (USP), sob supervisão do Prof. Antonio Carlos Vieira Coelho.

3.5.8 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os ensaios foram realizados em um espectrofotômetro (Perkin Elmer, Paragon 1000 PC, Inglaterra) e os resultados analisados com ajuda do software Spectrum for Windows 1.0. Os espectros foram obtidos na faixa de $(600\text{ a }4000)\text{ cm}^{-1}$, com 32 corridas e 32 cm^{-1} de resolução, no Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (UC), Portugal, sob supervisão do Prof. Hermínio J. C. Sousa.

3.5.9 Liberação de cinamaldeído e óleo essencial de canela

As amostras impregnadas foram imersas em 150 mL de água milli-Q, em um frasco fechado, e, em intervalos de tempo pré-definidos, 3 mL do meio de liberação foram retirados do frasco e a leitura da absorbância realizada a 289 nm (para filmes impregnados com cinamaldeído) e 291 nm (para filmes impregnados com óleo essencial de canela) utilizando espectrofotômetro UV-vis (Jasco, modelo V-530, Japão). A quantificação de agente antimicrobiano presente na solução foi então calculada usando as equações obtidas com as curvas de calibração previamente construídas para cada uma das substâncias impregnadas. A construção das curvas de calibração deu-se a partir da leitura da absorbância de soluções do agente antimicrobiano em diferentes concentrações.

As análises foram realizadas no Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (UC), Portugal, sob supervisão do Prof. Hermínio J. C. Sousa.

3.6 Análise dos resultados

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As propriedades mais relevantes para a avaliação de embalagens para alimentos são suas propriedades mecânicas e de barreira. Sendo assim, a seleção das melhores formulações deste estudo foi baseada nos resultados dessas propriedades. Como se pretende avaliar, posteriormente, o uso do filme biodegradável como embalagem para pães, escolheu-se a permeabilidade ao vapor de água como parâmetro principal de seleção.

Vale lembrar que o principal requisito na escolha de uma formulação de embalagem é saber qual será seu uso final. Se o filme for utilizado em coberturas superficiais para manusear o produto, as propriedades principais são as mecânicas e a aparência. Porém, se o objetivo for embalar produtos crocantes, é necessário um filme com a mais baixa permeabilidade ao vapor de água possível para evitar que o produto murche. Para alimentos suscetíveis à oxidação lipídica, a transparência deve ser evitada. Alta permeabilidade ao oxigênio é desejada para filmes utilizados no acondicionamento de carnes vermelhas frescas, pois o oxigênio é responsável pela formação da oximioglobina, pigmento que dá a cor característica do produto. Por outro lado, para alimentos ricos em lipídios, deseja-se uma embalagem com baixa permeabilidade ao oxigênio, pois o mesmo leva à formação de radicais livres e ao desenvolvimento de ranço. Deste modo, conclui-se que todas as formulações elaboradas podem ser aproveitadas em usos diversos. Mesmo com a seleção de algumas formulações consideradas ideais, sabe-se que nenhuma formulação deve ser descartada, pois a mesma pode ser aproveitada para outros usos que não os deste trabalho.

A maioria das formulações testadas produziu filmes biodegradáveis translúcidos, homogêneos e flexíveis, o que pode ser verificado na Figura 11, que apresenta fotos de uma fatia de pão embalado em filme biodegradável contendo açúcares e glicerol como agente plastificante e também de um filme biodegradável contendo argila MMT e glicerol.

Figura 11 – a) Fatia de pão embalado em filme biodegradável contendo açúcares e glicerol e b) Filme biodegradável contendo argila e glicerol (foto de Eduardo César Soares Faria de Oliveira).

4.1 Caracterização dos filmes biodegradáveis compostos de fécula de mandioca, glicerol e açúcares

Através de análise visual e tátil dos filmes biodegradáveis contendo glicerol e açúcares como plastificantes, percebeu-se que as maiores quantidades de glicerol (acima de 1,5 g/100 g de solução) produziram filmes biodegradáveis com baixa resistência mecânica, pois os mesmos rasgavam com facilidade ao tentar soltá-los dos suportes, provavelmente devido ao efeito plastificante do glicerol, resultando em decréscimo da resistência do filme à tração. Efeito similar foi observado em filmes biodegradáveis a base de amido de mandioca (3 g/100 g de solução) e glicerol (1,2 g/100 g de solução) produzidos por Shimazu, Mali e Grossmann (2007). Outro fator que contribuiu para baixa resistência mecânica do filme é o uso de sacarose e açúcar invertido na sua formulação, uma vez que esses ingredientes também desempenham um papel plastificante. Veiga-Santos et al. (2005a) mostraram que a adição de sacarose em filmes biodegradáveis a base de fécula de mandioca pode aumentar em até 2900 % a elongação na ruptura do filme. Devido ao maior número de grupos -OH na molécula, a sacarose é mais hidrofílica e tem um poder plastificante maior (TEIXEIRA et al., 2007).

Além da baixa resistência mecânica, os filmes biodegradáveis elaborados com quantidades de glicerol superiores a 1,5 g/100 g de solução, mostraram-se pegajosos. Rodríguez et al. (2006) concluíram que uma quantidade de glicerol superior a 0,4 g/100 g de solução filmogênica a base de amido de batata (2 g/100 g)

provoca separação de fases no filme, levando a uma exclusão do plastificante da matriz do filme, o que gera uma adesividade extra e um aspecto pegajoso desagradável. O mesmo fenômeno foi observado por Talja et al. (2008), com filmes biodegradáveis a base de amido de batata (5 g/100 g) com incorporação de glicerol em conteúdo superior a 2 g/100 g de solução filmogênica.

Pela análise dos resultados, notou-se que os filmes biodegradáveis com as melhores propriedades mecânicas e de barreira foram os que utilizaram conteúdos de glicerol menores que 0,75 g/100 g de solução filmogênica.

Com relação ao método de incorporação de glicerol, logo nos primeiros testes o método 3 foi eliminado porque o aquecimento da mistura a 170 °C causou a caramelização dos açúcares (sacarose e açúcar líquido invertido), fornecendo filmes biodegradáveis com cor mais escura e aspecto indesejado devido à formação de grumos que afetaram a homogeneidade da amostra.

Assim, somente os métodos 1 e 2 foram avaliados, sendo que os filmes biodegradáveis fabricados pelo método 2 sempre se mostraram com aspecto menos homogêneo (com formação de alguns pequenos grumos), principalmente quando baixas quantidades de glicerol foram usadas. Uma provável explicação para esse fato é que, com baixa quantidade de glicerol, é difícil obter uma mistura homogênea, uma vez que a quantidade de fécula de mandioca é muito maior, tendo como consequência a não completa difusão do glicerol através do amido, enquanto que no método 1, onde todos os ingredientes foram misturados ao mesmo tempo, provavelmente ocorreu uma maior distribuição do glicerol devido à sua dissolução na água usada como solvente da solução filmogênica.

Análise de variância (ANOVA) *two-way* foi aplicada nos resultados de propriedades mecânicas dos filmes biodegradáveis produzidos pelos métodos 1 e 2, com conteúdos de glicerol iguais a 0,50 g/100 g e 0,75 g/100 g de solução filmogênica, no intervalo de confiança de 95 %. Nesta análise, ambos os fatores (quantidade de glicerol e seu método de incorporação) foram de igual interesse, assim como a possibilidade de interação entre eles. Como pode ser observado nas Tabelas 4 e 5, os resultados de propriedades mecânicas não foram influenciados pelo método de incorporação de glicerol empregado.

Tabela 4 – Resistência máxima à tração ($R_{m\acute{a}x}$) [MPa] dos filmes biodegradáveis elaborados para escolha do método de incorporação de glicerol.

Glicerol [g/100 g]	$R_{m\acute{a}x}$ [MPa] *		DMS
	Método de incorporação de glicerol		
	1	2	
0,50	2,93 ± 0,44 ^{a,A}	2,92 ± 0,21 ^{a,A}	0,37
0,75	2,17 ± 0,21 ^{a,B}	2,43 ± 0,33 ^{a,B}	0,32
DMS	0,39	0,30	

* Letras iguais na mesma coluna (maiúsculas) ou na mesma linha (minúsculas) indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

Tabela 5 – Elongação na ruptura (E) [%] dos filmes biodegradáveis elaborados para escolha do método de incorporação de glicerol.

Glicerol [g/100 g]	E [%]*		DMS
	Método de incorporação de glicerol		
	1	2	
0,50	103,08 ± 17,66 ^{a,A}	101,59 ± 16,84 ^{a,A}	20,16
0,75	92,40 ± 16,32 ^{a,A}	87,67 ± 15,00 ^{a,A}	19,14
DMS	20,92	18,63	

* Letras iguais na mesma coluna (maiúsculas) ou na mesma linha (minúsculas) indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

Dessa forma, o método de incorporação do glicerol escolhido foi o método 1 por se tratar de um método mais simples de ser realizado e por fornecer filmes biodegradáveis com melhor aparência. O uso do método 2 tornou-se mais trabalhoso na elaboração de filmes biodegradáveis com baixas quantidades de glicerol, uma vez que foi difícil obter uma homogeneização completa do glicerol no amido.

Com a escolha do método de incorporação de glicerol e dos conteúdos de glicerol a serem testados, (0,17; 0,34; 0,50 e 0,75) g/100 g de solução filmogênica, filmes biodegradáveis a base de fécula de mandioca, glicerol e açúcares foram elaborados e caracterizados quanto às suas propriedades mecânicas e de barreira. Filmes biodegradáveis, considerados como controle, isto é, sem glicerol incorporado em sua formulação, também foram caracterizados. ANOVA *one-way* foi aplicada aos resultados para verificar a influência da quantidade de glicerol adicionada às formulações sobre estas propriedades.

4.1.1 Propriedades mecânicas

Na Tabela 6 estão mostrados os valores médios e respectivos desvios-padrão da resistência máxima à tração e da elongação na ruptura, obtidas dos testes de tração descritos no item 3.5.3.

Tabela 6 – Resistência máxima à tração ($R_{m\acute{a}x}$) [MPa] e elongação na ruptura (E) [%] dos filmes biodegradáveis elaborados pelo método 1, de acordo com o conteúdo de glicerol.

Conteúdo de glicerol [g/ 100 g de solução]	$R_{m\acute{a}x}$ [MPa] ¹	E [%] ¹
0,00	6,06 ± 1,04 ^a	158,78 ± 26,35 ^a
0,17	2,41 ± 0,46 ^b	213,43 ± 34,52 ^b
0,34	1,85 ± 0,34 ^c	191,24 ± 35,46 ^c
0,50	2,72 ± 0,48 ^b	168,64 ± 30,96 ^a
0,75	2,24 ± 0,36 ^c	89,85 ± 15,15 ^d

¹ Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

Observa-se que a formulação sem glicerol foi a que apresentou maior valor de $R_{m\acute{a}x}$, o que já era esperado, pois a presença de plastificantes na formulação tende a diminuir a resistência mecânica de filmes biodegradáveis. As moléculas de plastificantes interferem na matriz de formação dos filmes, diminuindo a atração intermolecular e aumentando a mobilidade polimérica, o que acarreta um decréscimo na $R_{m\acute{a}x}$ com o aumento da quantidade de plastificante (RODRÍGUEZ et al., 2006).

De acordo com Gontard, Guilbert e Cuq (1993), este comportamento é atribuído a uma menor disponibilidade de grupos -OH para interagir com as cadeias do polímero, o que modifica sensivelmente as propriedades mecânicas dos mesmos.

Entre as formulações com glicerol, a que apresentou maior valor de $R_{m\acute{a}x}$ foi a formulação com conteúdo de glicerol igual a 0,50 g/100 g. ANOVA aplicada aos resultados mostrou que essa formulação não apresentou $R_{m\acute{a}x}$ significativamente diferente em relação à formulação com 0,17 g/100 g. Dessa forma, analisando apenas a $R_{m\acute{a}x}$ como parâmetro para escolha da melhor quantidade de plastificante, conclui-se que é adequado usar glicerol em conteúdo igual a 0,17 g/100 g, pois filmes biodegradáveis elaborados com esta proporção apresentaram valores superiores de resistência mecânica. Ressalta-se que a melhor alternativa é

selecionar formulações com baixo conteúdo de plastificante, uma vez que seu excesso prejudica as propriedades de barreira dos filmes biodegradáveis.

Mali et al. (2006) encontraram o valor de $(26,00 \pm 5,00)$ MPa para a $R_{m\acute{a}x}$ de filmes biodegradáveis elaborados com fécula de mandioca pura (3 g/100 g) e sem glicerol e $(10,00 \pm 3,00)$ MPa para os filmes biodegradáveis com conteúdo de glicerol igual a 0,6 g/100 g. Rodríguez et al. (2006) encontraram o valor de $(50,00 \pm 5,00)$ MPa para a $R_{m\acute{a}x}$ de filmes biodegradáveis elaborados com fécula de mandioca pura (2 g/100 g) e sem glicerol e $(20,30 \pm 4,90)$ MPa para os filmes biodegradáveis com conteúdo de glicerol igual a 0,4 g/100 g. Observa-se que a $R_{m\acute{a}x}$ obtida neste trabalho foi bastante inferior aos dados da literatura, o que indica que a formulação usada ainda precisa de ajustes, ou seja, é necessário diminuir a quantidade de plastificantes usada na formulação ou usar outros agentes a fim de melhorar as propriedades mecânicas dos filmes biodegradáveis.

Outro quesito que deve ser levado em consideração durante as comparações entre valores publicados na literatura e os obtidos neste trabalho é a atividade de água fornecida pela solução saturada usada nos recipientes onde os filmes biodegradáveis foram acondicionados antes dos testes. Shimazu, Mali e Grossmann (2007), avaliando a influência da atividade de água nas propriedades mecânicas de filmes biodegradáveis a base de fécula de mandioca, mostraram que quanto menor a atividade de água da solução saturada presente no dessecador, maior será a $R_{m\acute{a}x}$ apresentada pelo material.

Neste trabalho, empregou-se solução de cloreto de sódio, a qual fornece atividade de água de 0,75. Assim, com alta atividade de água, os valores de $R_{m\acute{a}x}$ tendem a ser menores que os apresentados em muitos trabalhos da literatura que utilizaram soluções saturadas de outros sais, como cloreto de lítio, cloreto de magnésio, brometo de sódio, carbonato de potássio e iodeto de potássio (MALI et al., 2006; FLORES et al., 2007; TALJA et al., 2007; SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007; FAMÁ; GOYANES; GERSCHENSON, 2007; MÜLLER; YAMASHITA; LAURINDO, 2008; PAES; YAKIMETS; MITCHELL, 2008; LÓPEZ; GARCÍA; ZARITZKY, 2008).

Em relação aos valores de alongação na ruptura mostrados na Tabela 6, observa-se um decréscimo com o aumento do conteúdo de glicerol, fato que não era esperado, pois um aumento na E é esperado com o acréscimo do glicerol. Isso se deve, provavelmente, ao efeito antiplastificante do glicerol, já relatado por outros

autores (SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007). De acordo com Lourdin et al. (1997), o efeito antiplastificante é um indicativo de que interações mais fortes entre o plastificante e o biopolímero estejam ocorrendo, por exemplo, ligações de hidrogênio, que induzem a um decréscimo da mobilidade molecular, o que faz com que o filme torne-se mais rígido.

Avaliando os resultados de E obtidos para cada conteúdo de glicerol testado, nota-se que 0,17 g/100 g foi novamente o conteúdo mais adequado de adição, uma vez que foi a quantidade que forneceu o maior valor.

4.1.2 Propriedades de barreira

Na Tabela 7 estão apresentados os valores médios e os respectivos desvios-padrão das propriedades de barreira avaliadas (permeabilidade ao vapor de água e coeficiente de permeabilidade ao oxigênio) dos filmes elaborados pelo método 1 e de acordo com a proporção glicerol-fécula de mandioca.

Tabela 7 – Permeabilidade ao vapor de água (PVA) [$\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{KPa}^{-1}$] e coeficiente de permeabilidade ao oxigênio ($P'O_2$) [$\text{cm}^3\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$] de filmes biodegradáveis elaborados pelo método 1 e de acordo com a proporção glicerol-fécula de mandioca e, em comparação aos dados de celofane e de polietileno de alta densidade.

Conteúdo de glicerol [g/ 100 g de solução]	PVA [$\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{KPa}^{-1}$] ¹	$P'O_2\times 10^{-9}$ [$\text{cm}^3\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$] ¹
0,00	$3,36 \pm 0,51^a$	$4,28 \pm 0,05^a$
0,17	$4,00 \pm 0,34^{a,b}$	$8,80 \pm 0,04^b$
0,34	$4,79 \pm 0,66^b$	$11,22 \pm 0,31^c$
0,50	$4,92 \pm 0,75^b$	$21,19 \pm 0,41^d$
0,75	$7,08 \pm 0,33^c$	$42,38 \pm 0,98^e$
Celofane	$7,27^2$	16^2
Polietileno de alta densidade	$0,02^3$	427^4

¹ Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

² Taylor, C. C. 1986. Cellophane. In: *The Wiley Encyclopedia of Packaging Technology*, M. Bakker, ed., New York: John Wiley&Sons, p. 159-163.

³ Adaptado de Smith, S. A. 1986. Modelling of gas and vapour transport through hydrophilic films. In: *The Wiley Encyclopedia of Packaging Technology*, M. Bakker, ed., New York: John Wiley & Sons, p. 514-523.

⁴ Adaptado de Salame, M. 1986. Barrier polymers. In: *The Wiley Encyclopedia of Packaging Technology*, M. Bakker, ed., New York: John Wiley & Sons, p. 48-54.

A permeabilidade ao vapor de água pode ser útil para entender possíveis mecanismos de transferência de massa e interações soluto/polímero nos filmes biodegradáveis. De acordo com a termodinâmica dos processos irreversíveis, a diferença de potencial químico da água é a força motriz da transferência de água através de um filme. Quando o processo ocorre a temperatura e pressão constantes, a diferença de potencial químico da água é proporcional à diferença de concentração de vapor de água entre as duas faces do filme (BERTUZZI et al., 2007).

Observa-se que, com um aumento da quantidade de glicerol até 0,75 g/100 g, a *PVA* aumentou, atingindo um valor 107 % superior em relação ao filme controle (sem adição de glicerol). ANOVA aplicada aos resultados de permeabilidade ao vapor de água indica que a melhor quantidade de glicerol a ser adicionada à formulação é 0,17 g/100 g, pois esta proporção forneceu filmes biodegradáveis com *PVA* estatisticamente igual ao valor obtido para os filmes biodegradáveis sem glicerol, que é um valor baixo quando comparado com os relatados na literatura científica. Confrontando os resultados deste trabalho com valores de *PVA* de polímeros sintéticos, nota-se que os filmes biodegradáveis a base de fécula de mandioca possuem menor *PVA* do que o celofane e muito superior ao do polietileno de alta densidade.

Com relação ao $P'O_2$, ANOVA mostrou que todos os resultados foram significativamente diferentes, indicando que o aumento do conteúdo de glicerol adicionado aumentou significativamente os valores do coeficiente de permeabilidade ao oxigênio. Comparando os filmes produzidos neste trabalho com alguns polímeros sintéticos, nota-se que os filmes biodegradáveis a base de fécula de mandioca possuem valores de $P'O_2$ similares ao celofane e valores inferiores ao observado para o polietileno de alta densidade.

4.2 Caracterização dos filmes biodegradáveis compostos de fécula de mandioca, glicerol e nanopartículas de argila

O trabalho experimental foi iniciado com a elaboração de filmes biodegradáveis contendo 5,0 g de fécula de mandioca, 95,0 g de água e diferentes conteúdos de glicerol ((0,50; 0,75; 1,25 e 1,50) g_{glicerol}/100 g_{solução}). Em testes

preliminares, observou-se que conteúdos de glicerol iguais a 0,75 g e 1,25 g apresentaram melhores resultados para a avaliação da adição da argila. Com relação ao conteúdo de nanopartículas de argila, a incorporação de ((0,15 e 0,20) $\text{g}_{\text{argila}}/100 \text{ g}_{\text{solução}}$) foi inicialmente testada, no entanto, notou-se que as soluções filmogênicas apresentaram viscosidade extremamente alta devido ao inchamento da argila. Em função disso, conteúdos menores foram definidos para os testes: (0,05 e 0,10) $\text{g}_{\text{argila}}/100 \text{ g}_{\text{solução}}$ e filmes biodegradáveis sem incorporação de nanopartículas de argila foram elaborados e considerados como controle. Etanol (14,5 g/100 $\text{g}_{\text{solução}}$) foi adicionado após o processo de gelatinização para diluir a solução com o objetivo de diminuir a sua viscosidade e facilitar o seu espalhamento sobre os suportes.

Todas as formulações elaboradas de acordo com o planejamento fatorial apresentado na Tabela 1, item 3.2.2, foram caracterizadas quanto às suas propriedades mecânicas, de barreira, térmicas e de estrutura. Como ambos os fatores (conteúdo de glicerol e conteúdo de argila) são de igual interesse, ANOVA *two-way* foi aplicada aos resultados para verificar a influência dos fatores separadamente, assim como a possibilidade de interação entre eles.

4.2.1 Propriedades mecânicas

Os resultados de resistência máxima à tração e alongação na ruptura dos filmes biodegradáveis elaborados de acordo com o planejamento experimental definido, estão mostrados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 – Resistência máxima à tração ($R_{\text{máx}}$) [MPa] dos filmes biodegradáveis elaborados de acordo com o planejamento fatorial $2^1 \times 3^1$.

Glicerol [g/100g]	R_{max} [MPa]			DMS
	Argila [g/100g]			
	0,0	0,05	0,10	
0,75	4,51 ± 0,69 ^{a,A}	4,30 ± 0,68 ^{ab,A}	3,96 ± 0,60 ^{b,A}	0,37
1,25	3,49 ± 0,55 ^{a,B}	2,16 ± 0,35 ^{b,B}	2,07 ± 0,33 ^{b,B}	0,21
DMS	0,29	0,27	0,20	

* Letras iguais na mesma coluna (maiúsculas) ou na mesma linha (minúsculas) indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

Pelos dados mostrados na Tabela 8, nota-se uma redução significativa ($P < 0,05$) nos valores de $R_{\text{máx}}$ dos filmes biodegradáveis com o aumento da quantidade de argila presente, provavelmente devido a um excesso de nanocarga

não esfoliada, enfraquecendo as ligações nas cadeias poliméricas.

Tang, Alavi e Herald (2008) mostraram valor de $R_{m\acute{a}x}$ dez vezes maior para os filmes elaborados com amido de milho, glicerol e argila MMT, em relação aos filmes obtidos neste trabalho. Vale ressaltar que esses autores produziram os filmes por extrusão, que é um processo que submete a argila a uma força de cisalhamento, contribuindo, assim, para a esfoliação das estruturas e, conseqüentemente, para a obtenção de elevados valores de $R_{m\acute{a}x}$. De acordo com Zhang et al. (2007), a esfoliação das camadas de nanoargila depende da força de cisalhamento à qual a argila é submetida. Outro fator, citado pelos mesmos autores, responsável pelo grau de esfoliação da argila é a quantidade de plastificante usada. Quando o conteúdo de glicerol decresceu, um aumento no grau de esfoliação foi observado.

Outra influência verificada foi com relação à adição do glicerol: a uma dada quantidade de argila, observa-se uma diminuição significativa ($P < 0,05$) nos valores de $R_{m\acute{a}x}$, com o aumento da quantidade de glicerol. Como já foi citado, o aumento da quantidade de plastificante acarreta um decréscimo na $R_{m\acute{a}x}$, uma vez que as moléculas do plastificante interferem na matriz de formação dos filmes biodegradáveis.

Análise de regressão múltipla foi aplicada aos resultados de $R_{m\acute{a}x}$ e um modelo preditivo foi obtido com bom ajuste ($r^2 = 0,74$) representado pela Equação (4), na qual G representa o conteúdo de glicerol [g/100 g] e A o conteúdo de nanopartículas de argila [g/100 g].

$$R_{m\acute{a}x} = (5,62 - 1,83 * G + 21 * A - 28 * G * A) \pm 0,59 \quad (4)$$

$$(0,75 < G < 1,25) \text{ e } (0 < A < 0,10)$$

A partir do ajuste obtido foi possível construir a superfície de resposta (Figura 12) para a resistência máxima à tração em função das variáveis estudadas, na qual se pode verificar que os maiores valores de $R_{m\acute{a}x}$ foram obtidos quando se utilizou os níveis inferiores de conteúdos de glicerol e de nanopartículas de argila.

Figura 12 – Superfície de resposta para a resistência máxima à tração ($R_{máx}$) [MPa] em função dos conteúdos de glicerol (G) e de nanopartículas de argila (A).

Na Tabela 9, nota-se que há uma divergência grande no comportamento dos valores de E com a variação dos conteúdos de glicerol e argila. Para o mais baixo conteúdo de glicerol estudado, o valor de E aumentou e, em seguida, diminuiu com o aumento do conteúdo de argila. Porém, para o conteúdo de glicerol mais alto, houve um aumento nos valores dessa propriedade. Fixando a quantidade de argila em cada nível ((0,0; 0,05 e 0,10) g) e variando o glicerol de 0,75 g para 1,25 g, percebe-se que entre as duas formulações sem argila o efeito foi o contrário do esperado, pois ocorreu uma diminuição da E , quando o esperado é ocorrer um acréscimo devido ao aumento do conteúdo de plastificante. Um acréscimo significativo foi observado quando se comparou as formulações com 0,10 g/ 100 g de argila.

Tabela 9 – Elongação na ruptura (E) [%] dos filmes biodegradáveis elaborados de acordo com o planejamento fatorial $2^1 \times 3^1$.

Glicerol [g/100g]	<i>E</i> [%]			DMS
	Argila [g/100g]			
	0,0	0,05	0,10	
0,75	113,60 ± 19,09 ^{a,A}	165,23 ± 26,21 ^{b,A}	123,61 ± 19,57 ^{a,A}	14,31
1,25	88,80 ± 14,14 ^{a,B}	167,12 ± 27,70 ^{b,A}	200,24 ± 33,50 ^{c,B}	14,08
DMS	8.58	15.12	13.47	

* Letras iguais na mesma coluna (maiúsculas) ou na mesma linha (minúsculas) indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

Aplicando análise de regressão múltipla, observou-se que houve falta de ajuste ($r^2 = 0,63$) para a obtenção do modelo preditivo e, portanto, não foi possível construir uma superfície de resposta válida para a elongação na ruptura em função das variáveis estudadas.

4.2.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Os resultados de permeabilidade ao vapor de água dos filmes biodegradáveis elaborados de acordo com o planejamento experimental definido estão mostrados na Tabela 10.

Tabela 10 – Permeabilidade ao vapor de água (PVA) [$\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$] dos filmes biodegradáveis elaborados de acordo com o planejamento fatorial $2^1 \times 3^1$.

Glicerol [g/100g]	PVA [g·mm·m ⁻² ·dia ⁻¹ ·kPa ⁻¹]			DMS
	Argila [g/100g]			
	0,0	0,05	0,10	
0,75	5,18 ± 0,42 ^{a,A}	4,43 ± 0,65 ^{ab,A}	3,81 ± 0,58 ^{b,A}	1,09
1,25	7,81 ± 0,58 ^{a,B}	6,14 ± 0,78 ^{a,B}	5,38 ± 0,80 ^{b,B}	0,97
DMS	0,81	0,89	1,04	

* Letras iguais na mesma coluna (maiúsculas) ou na mesma linha (minúsculas) indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

Análise estatística dos resultados mostra que a adição de argila na composição dos filmes é responsável por uma diminuição significativa ($P < 0,05$) nos valores de PVA, tanto com o uso de menor conteúdo de glicerol (0,75 g) quanto com o uso de maior conteúdo (1,25 g). Os resultados também deixam clara a influência do glicerol: um aumento no seu conteúdo causou elevação significativa nos valores de PVA, o que pode ser explicado pela diminuição da atração intermolecular e pelo caráter hidrofílico dos plastificantes.

Comparando estes resultados com valores apresentados na literatura, nota-se que os filmes biodegradáveis produzidos neste trabalho apresentam excelentes resultados de PVA. Tang, Alavi e Herald (2008), elaboraram filmes a base de amido de milho, glicerol e argila MMT com valores de PVA entre (9,80 e 28,80) $\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$, variando a concentração de glicerol de (5 a 20) g/100 g e usando argila (6 g/100 g).

Apesar de não mostrarem valores absolutos de PVA, Chiou et al. (2007)

apresentaram resultados comprovando a tendência obtida neste estudo: a *PVA* foi reduzida com a introdução de argila na formulação dos filmes a base de amido e também com a redução do conteúdo de glicerol. Análises de DRX (difração de raio X) mostraram que o uso de glicerol em conteúdo igual a 5 g/100 g forneceu filmes com estrutura esfoliada, enquanto que o uso de (10 e 15) g/100 g forneceu filmes com estrutura intercalada, ou seja, a diminuição do conteúdo de glicerol favoreceu a esfoliação da argila.

A mesma tendência de redução de *PVA* foi relatada por Müller, Laurindo e Yamashita (2011) em seus filmes a base de fécula de mandioca, glicerol e argila MMT, produzidos por extrusão termoplástica.

Confrontando os resultados deste trabalho com valores de *PVA* de polímeros sintéticos (mostrados na Tabela 7), nota-se que os filmes biodegradáveis a base de fécula de mandioca possuem menor *PVA* do que o celofane e maior do que o polietileno de alta densidade.

Análise de regressão múltipla foi aplicada aos resultados e o modelo preditivo para a permeabilidade ao vapor de água em função das variáveis estudadas foi obtido com bom ajuste ($r^2 = 0,77$), representado pela Equação (5), na qual *G* representa o conteúdo de glicerol [g/100 g] e *A* o conteúdo de nanopartículas de argila [g/100 g].

$$PVA = (2,65 + 3,77 * G - 19,5) * A \pm 0,70 \quad (5)$$

$$(0,75 < G < 1,25) \text{ e } (0 < A < 0,10)$$

Na Figura 13 é mostrada a superfície de resposta para a permeabilidade ao vapor de água em função das variáveis estudadas, na qual se pode verificar que os menores valores de *PVA* foram obtidos quando se utilizou o nível inferior de conteúdo de glicerol e o superior de nanopartículas de argila.

Figura 13 – Superfície de resposta para a permeabilidade ao vapor de água (PVA) [$\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$] em função dos conteúdos de glicerol (G) e de nanopartículas de argila (A).

4.2.3 Coeficiente de permeabilidade ao oxigênio ($P'O_2$)

Os resultados do coeficiente de permeabilidade ao oxigênio ($P'O_2$) dos filmes biodegradáveis elaborados de acordo com o planejamento experimental definido, estão mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 – Coeficientes de permeabilidade ao oxigênio [$\text{cm}^3\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$] dos filmes biodegradáveis elaborados de acordo com o planejamento fatorial $2^1 \times 3^1$.

Glicerol [g/100g]	$P'O_2$ [cm ³ .m ⁻¹ .dia ⁻¹ .Pa ⁻¹]			DMS
	Argila [g/100g]			
	0,0	0,05	0,10	
0,75	30,79 ± 0,41 ^{a,A}	22,88 ± 1,63 ^{b,A}	22,51 ± 0,79 ^{b,A}	4,47
1,25	111,64 ± 4,86 ^{a,B}	101,37 ± 6,63 ^{ab,B}	89,95 ± 7,53 ^{b,B}	15,74
DMS	14.83	15.96	17.92	

* Letras iguais na mesma coluna (maiúsculas) ou na mesma linha (minúsculas) indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

Como já era esperado, ocorreu uma tendência de decréscimo dos valores do coeficiente de permeabilidade ao oxigênio com o uso de nanopartículas de argila e um acréscimo desses valores com o aumento do conteúdo de glicerol. Comparando os filmes produzidos neste trabalho com alguns polímeros sintéticos (dados

mostrados na Tabela 7), nota-se que os filmes biodegradáveis a base de fécula de mandioca possuem valores de $P'O_2$ similares ao celofane e valores inferiores ao observado para o polietileno de alta densidade.

Aplicando análise de regressão múltipla, observou-se que o modelo apresentou falta de ajuste e, portanto, não foi possível construir uma superfície de resposta válida para o coeficiente de permeabilidade ao oxigênio em função das variáveis estudadas.

4.2.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Nas Tabelas 12 e 13 são mostrados os valores das temperaturas de transições vítreas obtidos dos termogramas dos filmes biodegradáveis a base de fécula de mandioca, glicerol e nanopartículas de argila.

Tabela 12 – Resultados da T_{g-1} [°C] dos filmes biodegradáveis elaborados de acordo com o planejamento fatorial $2^1 \times 3^1$.

Glicerol [g/100g]	T_{g-1} [°C]			DMS
	Argila [g/100g]			
	0,0	0,05	0,10	
0,75	36,15 ± 1,66 ^{a,A}	36,03 ± 3,38 ^{a,A}	36,63 ± 1,00 ^{a,A}	4,46
1,25	38,71 ± 1,92 ^{a,A}	37,28 ± 0,54 ^{a,A}	35,93 ± 2,45 ^{a,A}	7,62
DMS	4,16	10,42	4,74	

* Letras iguais na mesma coluna (maiúsculas) ou mesma linha (minúsculas) indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

Tabela 13 – Resultados da T_{g-2} [°C] dos filmes biodegradáveis elaborados de acordo com o planejamento fatorial $2^1 \times 3^1$.

Glicerol [g/100g]	T_{g-2} [°C]			DMS
	Argila [g/100g]			
	0,0	0,05	0,10	
0,75	56,62 ± 4,92 ^{a,A}	56,77 ± 0,57 ^{a,A}	53,86 ± 3,91 ^{a,A}	9,12
1,25	62,89 ± 0,04 ^{a,A}	59,70 ± 4,34 ^{a,A}	54,99 ± 5,31 ^{a,A}	11,53
DMS	11,67	7,02	10,57	

* Letras iguais na mesma coluna (maiúsculas) e/ou linha (minúsculas) indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

A Figura 14 apresenta um exemplo de termograma obtido para o filme biodegradável elaborado a partir da formulação contendo 0,75 g/100g de glicerol e sem adição de argila. Todas as formulações avaliadas apresentaram dois valores

distintos de T_g (T_{g-1} e T_{g-2}), sendo a primeira em torno de (35 e 39) °C, e a segunda em torno de (53 e 63) °C. Estas transições estão provavelmente relacionadas aos biopolímeros do amido, a amilose e a amilopectina.

Figura 14 – Termograma do filme biodegradável elaborado a partir da formulação contendo glicerol (0,75 g/100 g) e argila (0,10 g/100 g), mostrando dois valores distintos de temperaturas de transição vítrea.

Estes filmes não apresentaram picos de transição endotérmica no intervalo de temperatura testado (- 60 °C a 250 °C), indicando que o amido, o maior componente das matérias-primas utilizadas na elaboração dos filmes, foi totalmente gelatinizado durante o processo de elaboração dos filmes. ANOVA aplicada aos resultados indicou que os conteúdos de glicerol e nanopartículas de argila não exerceram influência significativa ($P > 0,05$) na temperatura de transição vítrea das amostras, o que difere dos resultados encontrados na literatura, principalmente em relação à variação de conteúdo de plastificante. Provavelmente um efeito significativo seria observado se a variação no conteúdo de glicerol fosse maior.

Tang, Alavi e Herald (2008) encontraram valores de T_g aproximadamente iguais a 50 °C para filmes biogradáveis a base de amido de milho, argila e glicerol.

Muitos autores encontram valores de T_g abaixo de zero, que é um valor atribuído à presença de glicerol. No caso deste trabalho, nenhum valor abaixo de zero foi notado, provavelmente devido à baixa quantidade de plastificante presente nos filmes. Ainda de acordo com esses autores, os maiores valores de T_g são geralmente atribuídos a fases ricas em amido, que é caso deste trabalho.

4.2.5 Difração de raio X (DRX)

As Figuras 15, 16 e 17 mostram, respectivamente, difratogramas das nanopartículas de argila pura e dos filmes biodegradáveis contendo diferentes conteúdos de glicerol e argila. Para melhor visualização das curvas, retirou-se a escala do eixo das ordenadas (eixo y) de cada figura, fazendo com que as curvas se posicionassem em regiões diferentes desse eixo.

Figura 15 – Difratograma das nanopartículas de argila pura.

Figura 16 – Difratograma dos filmes biodegradáveis elaborados com 0,75 g de glicerol/100 g de solução filmogênica. (G/F):(A/F) = (Glicerol/Fécúla):(Argila/Fécúla).

Figura 17 – Difratograma dos filmes biodegradáveis elaborados com 1,25 g de glicerol/100 g de solução filmogênica. (G/F):(A/F) = (Glicerol/Fécúla):(Argila/Fécúla).

Os picos mostrados em cada gráfico elucidam a distância dos átomos nos cristais de argila, ou seja, o espaçamento basal, e, conseqüentemente, fornecem informações a respeito da estrutura cristalina de cada material analisado.

A distância d_{001} da argila pura (1,44 nm) é típica de uma montmorilonita sódica e é menor do que a distância observada nos picos dos filmes biodegradáveis ((1,76 $\pm$ 0,01) nm), indicando que ocorreu intercalação de glicerol e/ou amido dentro das nanopartículas de argila. De acordo com Chen e Evans (2005), argilas montmorilonitas, quando em contato com muitos polímeros, produzem uma estrutura expandida com $d_{001} \sim 1,8$ nm, entretanto, é difícil afirmar se amido e glicerol entraram dentro das nanopartículas de argila, ou se foi somente o glicerol.

Como os difratogramas dos filmes biodegradáveis contendo nanopartículas de argila apresentaram picos, pode-se afirmar que não houve esfoliação total da argila, o que é comprovado pela redução dos valores de $R_{máx}$, uma vez que a argila não-delaminada induz o início da fratura do filme. Sendo assim, concluiu-se que não foi possível obter um material nanocompósito neste trabalho.

A intercalação do glicerol dentro das nanopartículas de argila é conhecida e tem sido estudada há muitos anos (HOFFMANN; BRINDLEY, 1961). De fato, o glicerol, usado como plastificante dos filmes biodegradáveis, pode atrapalhar a entrada das moléculas de amido dentro das camadas de argila, pois ele entra com mais facilidade e cobre todo o espaço existente entre as camadas lamelares da argila. Entretanto, um plastificante não-volátil é essencial, uma vez que é difícil obter filmes com boas propriedades mecânicas usando somente amido, argila e água como componentes.

Muitos autores já publicaram resultados de nanobiocompósitos sem obtenção de esfoliação das partículas em grande extensão. Como o amido e a argila são hidrofílicos, os pesquisadores assumem que esses compostos possuem grande afinidade um pelo outro, porém, de acordo com resultados de DRX, fica claro que é o glicerol que geralmente intercala, resultando em compostos com baixo grau de esfoliação (CHIVRAC et al., 2008).

4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de cravo e de canela contra os fungos *Penicillium commune* e *Eurotium amstelodami*

Os testes realizados mostraram resultados diferentes para cada óleo essencial e para cada fungo avaliado.

Testes com soluções alcoólicas de óleo essencial de cravo em diferentes concentrações: (0,5; 1,0 e 2,0) g/100 g_{solução}, foram realizados e nenhuma inibição do fungo *Penicillium commune* foi notada. A inibição começou a ocorrer em concentrações superiores a 4,0 g/100 g, apresentando um halo de inibição de 0,3 cm, que aumentou com o uso de 8,0 g/100 g (1,6 cm de inibição) e ocorreu de forma completa para a concentração de 16,0 g/100 g. Avaliando o óleo essencial de canela, a inibição do fungo *P. commune* foi completa com concentração mínima de 2,0 g/100 g, sendo que, mesmo com a menor concentração de óleo essencial de canela testada (0,5 g/100 g), a inibição foi de 0,2 cm.

Para o fungo *Eurotium amstelodami*, a concentração mínima de óleo essencial de cravo que apresentou inibição foi de 4,0 g/100 g (0,7 cm), e a completa ocorreu com a concentração de 16,0 g/100 g de óleo essencial de cravo. Com o óleo essencial de canela, o mesmo fungo foi 100 % inibido usando apenas 0,5 g/100 g.

Os halos de inibição de todas as placas de Petri foram medidos e, com a área de cada placa, os mesmos foram transformados em valores de porcentagem de área de inibição, os quais são apresentados na Tabela 14.

Pela análise dos dados obtidos, conclui-se que o óleo essencial de canela tem maior poder antimicrobiano do que o óleo essencial de cravo, quando avaliado contra os fungos citados.

Tabela 14 – Áreas de inibição [%] referentes a cada óleo essencial avaliado contra os fungos *P.commune* e *E. amstelodami*.

Concentração de óleo [g/100 g]	Área de inibição [%]			
	<i>P. commune</i>		<i>E. amstelodami</i>	
	Óleo essencial de cravo	Óleo essencial de canela	Óleo essencial de cravo	Óleo essencial de canela
0,5	0	10,4	0	100
1,0	0	32,1	0	100
2,0	0	100,0	0	100
4,0	11,9	100,0	18,7	100
8,0	40,1	100,0	62,3	100
16,0	100,0	100,0	100	100
32,0	100,0	100,0	100	100

As Figuras 18 a 22 ilustram os testes realizados, cujas fotos foram adquiridas após 5 dias da realização dos testes.

Na Figura 18 estão mostradas todas as placas controle, ou seja, aquelas inoculadas e com os discos de papel filtro sem incorporação dos óleos essenciais. Nessas imagens é possível observar as características próprias de cada fungo estudado.

Nas Figuras 19 e 20, estão mostradas as fotos das placas inoculadas com o fungo *E. amstelodami*, cada uma delas contendo disco de papel filtro embebido em óleo essencial de cravo (2,0 e 4,0) g/100 g) e canela (0,5 e 1,0) g/100 g), respectivamente, enquanto que nas Figuras 21 e 22, estão mostradas as placas inoculadas com o fungo *P. commune*, cada uma delas contendo disco de papel filtro embebido em óleo essencial de cravo (2,0 e 4,0) g/100 g) e canela (0,5 e 1,0) g/100 g), respectivamente.

Figura 18 – Placas de Petri controle contendo os fungos *E. amstelodami* e *P. commune*.

Figura 19 – Placas de Petri inoculadas com o fungo *E. amstelodami*, com disco de papel filtro embebido em duas concentrações diferentes de óleo essencial de cravo.

Figura 20 – Placas de Petri inoculadas com o fungo *E. amstelodami*, com disco de papel filtro embebido em duas concentrações diferentes de óleo essencial de canela.

Figura 21 – Placas de Petri inoculadas com o fungo *P. commune*, com disco de papel filtro embebido em duas concentrações diferentes de óleo essencial de cravo.

Figura 22 – Placas de Petri inoculadas com o fungo *P. commune*, com disco de papel filtro embebido em duas concentrações diferentes de óleo essencial de canela.

Diante dos resultados obtidos e, por meio de balanço de massa, as concentrações mínimas de cada óleo essencial a serem incorporadas nas formulações de filmes biodegradáveis foram definidas, de forma que, no produto final (solução filmogênica após secagem), as concentrações de óleo correspondessem às concentrações nas quais os papéis filtros foram imersos. Os cálculos foram realizados sem considerar eventual evaporação dos agentes antimicrobianos.

4.4 Caracterização dos filmes biodegradáveis compostos de fécula de mandioca, glicerol, nanopartículas de argila e óleo essencial de canela

Inicialmente diferentes métodos de incorporação dos óleos essenciais à formulação base foram estudados, bem como diferentes concentrações de emulsificante específico para emulsão óleo/água (éster de sacarose de ácidos graxos) foram avaliadas.

Mediante os resultados obtidos, 2,5 g/100g de emulsificante em relação ao conteúdo de óleo essencial de cada formulação foi adicionado. Os conteúdos de óleo essencial foram determinados a partir dos resultados obtidos nos testes de determinação da concentração inibitória mínima. Por meio de balanço de massa, concentrações finais de óleo essencial em cada filme biodegradável equivalentes à concentração determinada como inibitória mínima foram determinadas.

Os ensaios experimentais foram iniciados com a elaboração de filmes biodegradáveis incorporados com aditivos antimicrobianos, usando como base a formulação contendo 0,75 g de glicerol e 0,10 g de argila por 100 g de solução filmogênica. Essa formulação foi escolhida por ter fornecido filmes biodegradáveis com as melhores propriedades mecânicas e de barreira na segunda etapa de trabalho. Diversos conteúdos de óleos essenciais de cravo e canela foram testados. Logo no início dos ensaios, notou-se que a quantidade de óleo essencial de cravo necessária para fornecer filmes com comprovada ação antimicrobiana contra os fungos testados era elevada e, com isso, tornou-se inviável obter filmes com bom aspecto visual e boa manuseabilidade. Dessa forma, decidiu-se eliminar o uso do óleo essencial de cravo e somente usar o óleo essencial de canela. Os primeiros testes microbiológicos já mostraram bons resultados, indicando uma inibição quase completa dos fungos, porém, o aspecto visual ainda continuava comprometido, pois os filmes ficavam quebradiços.

Constatou-se também que usar uma quantidade fixa de glicerol e variar a quantidade de óleo essencial não fornecia filmes com bom aspecto visual, principalmente quando quantidades mais elevadas de óleo eram usadas. Assim, decidiu-se estabelecer uma relação (conteúdo de glicerol/ conteúdo de óleo essencial) igual a 1,85, que foi uma proporção que se mostrou adequada à obtenção de filmes biodegradáveis com propriedades visuais e táteis apropriadas.

Dessa forma, filmes biodegradáveis a base de fécula de mandioca, argila, glicerol, óleo essencial de canela e emulsificante éster de sacarose de ácidos graxos, foram elaborados de acordo com o planejamento experimental mostrado na Tabela 2, do item 3.2.3, e caracterizados quanto às suas propriedades mecânicas e de barreira. ANOVA *one-way* foi aplicada aos resultados para verificar a influência da relação (conteúdo de glicerol / conteúdo de óleo essencial) usada na elaboração dos filmes biodegradáveis.

4.4.1 Propriedades mecânicas

Os valores de resistência máxima à tração e de alongação na ruptura são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Resistência máxima à tração ($R_{m\acute{a}x}$) [MPa] e alongação na ruptura (E) [%] de filmes biodegradáveis com adição de óleo essencial de canela.

Formulação	Glicerol [g/100 g]	$R_{m\acute{a}x}$ [MPa]*	E [%]*
OE1	0,75	$2,32 \pm 0,40^a$	$256,13 \pm 48,57^a$
OE2	1,13	$1,36 \pm 0,18^b$	$264,03 \pm 35,06^a$
OE3	1,50	$1,05 \pm 0,16^c$	$191,27 \pm 22,62^b$
DMS		0,09	13,82

* Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

Observa-se uma tendência de diminuição da $R_{m\acute{a}x}$ com o aumento dos conteúdos de glicerol, emulsificante e óleo essencial de canela. Esta mesma tendência foi observada nos filmes elaborados na etapa anterior, sem o uso de óleo essencial de canela, devido à elevação do conteúdo de glicerol. Com relação à E , uma diminuição significativa foi verificada com o aumento dos conteúdos de glicerol, emulsificante e óleo essencial de canela, o que não era esperado, uma vez que o glicerol é usado para aumentar a flexibilidade e a extensibilidade do material. Um melhor entendimento desses resultados seria possível se os fatores (conteúdos de glicerol, de emulsificante e de óleo essencial de canela) fossem analisados separadamente, porém, isso não foi possível devido ao planejamento experimental usado.

4.4.2 Propriedades de barreira

Estudaram-se as propriedades de barreira dos filmes biodegradáveis adicionados de óleo essencial de canela. Os resultados de PVA e $P'O_2$ obtidos para cada formulação são mostrados na Tabela 16, a qual mostra um aumento dos valores das propriedades de barreira com o aumento dos conteúdos de emulsificante, óleo essencial de canela e glicerol.

Tabela 16 – Permeabilidade ao vapor d'água (PVA) [$g \cdot mm \cdot m^{-2} \cdot dia^{-1} \cdot KPa^{-1}$] e coeficiente de permeabilidade ao oxigênio ($P'O_2$) [$cm^3 \cdot m^{-1} \cdot dia^{-1} \cdot Pa^{-1}$] de filmes biodegradáveis com adição de óleo essencial de canela.

Formulação	Glicerol [g/100 g]	PVA [$g \cdot mm \cdot m^{-2} \cdot dia^{-1} \cdot KPa^{-1}$]*	$P'O_2 \times 10^{-9}$ [$cm^3 \cdot m^{-1} \cdot dia^{-1} \cdot Pa^{-1}$]*
OE1	0,75	$9,78 \pm 1,40^a$	$27,50 \pm 0,60^a$
OE2	1,13	$10,11 \pm 1,63^a$	$67,44 \pm 0,81^b$
OE3	1,50	$14,79 \pm 2,76^b$	$143,47 \pm 8,30^c$
DMS		2,97	19,17

* Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os resultados ($P > 0,05$).

Como a introdução de lipídios na matriz polimérica age como barreira ao vapor de água e ao oxigênio, pode-se supor que o óleo essencial de canela não foi o componente responsável pelo acréscimo nos valores de PVA e $P'O_2$.

O mesmo pode ser concluído com relação ao glicerol, pois a formulação OE1 apresentou resultados bem maiores que a formulação (G/F):(A/F)=15:2 (elaborada na etapa anterior usando os mesmos conteúdos de glicerol e argila), principalmente nos valores de PVA , cuja média sofreu um acréscimo de aproximadamente 156 %. Como ambas as formulações (OE1 e (G/F):(A/F)=15:2) possuem o mesmo conteúdo de glicerol e de nanopartículas de argila ((0,75 g e 0,10 g)/100 g de solução filmogênica, respectivamente), esperava-se que os resultados de propriedades de barreira fossem semelhantes.

Dessa forma, excluindo os efeitos do óleo essencial de canela e do glicerol, tem-se uma indicação de que o emulsificante foi o maior responsável pelos elevados valores de propriedades de barreira obtidos, principalmente na PVA , o que pode ser justificado pelo fato do emulsificante ser um agente sequestrante de água.

Um melhor entendimento desses resultados seria possível se os fatores (conteúdos de glicerol, de emulsificante e de óleo essencial de canela) fossem

analisados separadamente, porém, isso não foi possível devido ao planejamento experimental usado.

4.4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes biodegradáveis adicionados de óleo essencial de canela

Filmes biodegradáveis obtidos a partir das diferentes formulações testadas (OE1, OE2 e OE3) foram submetidos a testes de difusão em halo para verificar o poder antimicrobiano de cada conteúdo de óleo essencial de canela. Os testes foram realizados uma semana após a elaboração dos filmes.

Os halos de inibição de todas as placas de Petri foram medidos e, com a área de cada placa, os mesmos foram transformados em valores de porcentagem de área de inibição, os quais são apresentados na Tabela 17. Vale ressaltar que as placas avaliadas com a formulação OE1 contra o fungo *E. amstelodami* foram contaminadas por bactérias, provavelmente devido a erro experimental, e por isso o desenvolvimento do fungo foi prejudicado, dificultando o cálculo da área de inibição.

Tabela 17 – Áreas de inibição [%] referentes a cada formulação de filme biodegradável contra os fungos *P. commune* e *E. amstelodami*.

Formulação	Área de inibição [%]	
	<i>P. commune</i>	<i>E. amstelodami</i>
OE1	1,93 ± 0,74	-
OE2	10,77 ± 5,31	47,02 ± 4,69
OE3	25,94 ± 5,72	91,06 ± 15,48

As Figuras 23 a 25 ilustram os testes realizados, cujas fotos foram adquiridas 5 dias após a realização dos testes. A Figura 23 mostra as placas controle, enquanto que as Figuras 24 e 25 mostram fotos das placas inoculadas, respectivamente, com os fungos *E. amstelodami* e *P. commune*, cada uma delas contendo discos dos filmes biodegradáveis elaborados a partir das 3 formulações testadas.

Como já era esperado, nota-se um aumento da área de inibição dos fungos com o acréscimo do conteúdo de óleo essencial usado em cada formulação, o que leva a acreditar na validade da pesquisa e incentiva a continuidade do projeto.

Figura 23 – Placas de Petri inoculadas com os fungos *E. amstelodami* e *P. commune*.

Figura 24 – Placas de Petri inoculadas com o fungo *E. amstelodami*, com cortes circulares dos filmes biodegradáveis elaborados com óleo essencial de canela, de acordo com as formulações OE1, OE2 e OE3.

Figura 25 – Placas de Petri inoculadas com o fungo *P. commune*, com cortes circulares dos filmes biodegradáveis elaborados com óleo essencial de canela, de acordo com as formulações OE1, OE2 e OE3.

4.5 Caracterização dos filmes biodegradáveis compostos de fécula de mandioca, glicerol e nanopartículas de argila, impregnados com agentes antimicrobianos usando tecnologia de fluido supercrítico

Os experimentos aqui descritos foram executados no Laboratório de Alta Pressão e Tecnologia Supercrítica (LAPTS) do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, em Portugal, sob supervisão do Prof. Dr. Hermínio José Cipriano Sousa.

Inicialmente, filmes biodegradáveis produzidos por *casting* foram submetidos ao CO₂ nas diferentes condições supercríticas mostradas na Tabela 3, do item 3.4. As amostras resultantes foram caracterizadas em relação à permeabilidade ao vapor de água e foram submetidas à análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (*FTIR*). Os resultados de *PVA* dos filmes biodegradáveis sem tratamento a alta pressão foram estatisticamente comparados aos resultados dos filmes tratados nas diferentes condições de processo.

Em seguida, os testes de impregnação de agente antimicrobiano foram iniciados usando as mesmas condições operacionais indicadas na Tabela 3. Decidiu-se usar cinamaldeído ao invés de óleo essencial de canela por ele ser um líquido menos viscoso e por não deixar resíduos no equipamento. As amostras resultantes foram caracterizadas quanto à *PVA* e *FTIR*. Testes de libertação em água foram realizados para definir o conteúdo de cinamaldeído impregnado no filme biodegradável. Para essa quantificação, curvas de calibração dos agentes antimicrobianos foram determinadas. O óleo essencial de canela foi impregnado ao filme biodegradável somente na condição de melhor impregnação obtida com cinamaldeído puro.

Durante a despressurização dos primeiros testes, um frasco coletor contendo etanol foi colocado na saída de CO₂ da célula de impregnação. Análises espectrofotométricas do conteúdo do frasco coletor revelaram a presença de glicerol dissolvido no etanol. Conclui-se que, como o glicerol é bastante solúvel em CO₂, ele estava sendo arrastado para fora do material polimérico durante a despressurização do sistema. Mesmo com a perda do glicerol, todas as condições operacionais forneceram amostras de filmes biodegradáveis bastante flexíveis, fato que é comum, pois sabe-se que o CO₂ também age como plastificante de um material polimérico. O

mesmo fato foi observado com as amostras impregnadas com agente antimicrobiano.

4.5.1 Aspecto visual

As amostras de filmes biodegradáveis submetidas ao CO₂-sc, com e sem impregnação de agente antimicrobiano, tiveram sua aparência física analisada visualmente para verificar as modificações causadas pelo tratamento nas diferentes condições. A Tabela 18 mostra os resultados das amostras submetidas somente ao CO₂-sc, sem a impregnação de agente antimicrobiano. As amostras com impregnação de cinamaldeído e óleo essencial de canela ficaram com a mesma aparência dos filmes elaborados sem a impregnação, porém, um pouco mais amarelados devido à cor do agente antimicrobiano incorporado à matriz polimérica.

Observou-se que a condição de 3 h de exposição ao CO₂-sc, com despressurização lenta (1 bar·min⁻¹), causou a formação de bolhas e imperfeições na superfície das amostras. Esse fato pode ser atribuído a erro experimental durante a despressurização, uma vez que era difícil manter a sua taxa sempre controlada e o aparecimento de bolhas geralmente ocorria nos testes em que o descontrole da taxa era observado. Uma elevação muito brusca da taxa de despressurização pode ter ocasionado um desprendimento rápido do glicerol da matriz polimérica, formando bolhas dentro do polímero.

Outro resultado interessante foi a cor branca do filme exposto ao CO₂-sc por 15 h e despressurizado na condição mais rápida (10 bar·min⁻¹). O mesmo fenômeno ocorreu durante os ensaios de impregnação de cinamaldeído e óleo essencial de canela, sempre na mesma condição de tempo de exposição e taxa de despressurização. Nenhuma referência foi encontrada na literatura relatando o mesmo efeito em tratamentos de filmes poliméricos com alta pressão.

Tabela 18 – Aparência visual das amostras de filmes biodegradáveis submetidas ao tratamento com CO₂-sc nas diferentes condições operacionais testadas.

	$(T_e/T_d)^*$	Aparência física
Filmes sem tratamento	-	Filme homogêneo, transparente, flexível
	(3/1)	Filme poroso, com bolhas, flexível
Filmes submetidos ao CO ₂ -sc, sem incorporação de agente antimicrobiano	(3/10)	Filme homogêneo, transparente, flexível
	(15/1)	Filme homogêneo, transparente, flexível
	(15/10)	Filme homogêneo, branco, flexível

* (T_e/T_d) = (Tempo de exposição [h]/Taxa de despressurização [$\text{bar} \cdot \text{min}^{-1}$])

4.5.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Na Tabela 19 estão mostrados os valores de *PVA* dos filmes biodegradáveis sem tratamento a alta pressão em comparação aos submetidos à alta pressão (sem impregnação e com impregnação de agente antimicrobiano).

Tabela 19 – Permeabilidade ao vapor de água (*PVA*) [$\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$] dos filmes biodegradáveis sem tratamento e com tratamento com $\text{CO}_2\text{-sc}$ (sem incorporação e com incorporação de agente antimicrobiano).

		(T _e /T _d)	<i>PVA</i> [g·mm·m ⁻² ·dia ⁻¹ ·KPa ⁻¹]
Sem tratamento		-	10,09 ± 0,35 ^{bc}
Sem incorporação de agente antimicrobiano	CO ₂ -sc	(3/1)	12,57 ± 0,86 ^{ab}
		(3/10)	12,88 ± 1,24 ^{ab}
		(15/1)	12,17 ± 1,04 ^{ab}
		(15/10)	13,03 ± 1,19 ^a
Com incorporação de agente antimicrobiano	Cinamaldeído	(3/1)	7,27 ± 1,01 ^{cd}
		(3/10)	7,36 ± 1,43 ^{cd}
		(15/1)	5,64 ± 0,69 ^d
		(15/10)	4,07 ± 0,82 ^d
	O. E. canela	(15/10)	5,69 ± 0,42 ^d

* $(T_e/T_d) = (\text{Tempo de exposição [h]}/\text{Taxa de despressurização [\text{bar}\cdot\text{min}^{-1}]})$

Observou-se que, quando o filme foi exposto somente ao $\text{CO}_2\text{-sc}$, independentemente da condição, a *PVA* sofreu um aumento significativo de aproximadamente 25 %. Esperava-se uma diminuição dos valores de *PVA* devido à perda de glicerol que o filme sofre durante a despressurização do sistema. Neste caso, acredita-se que os valores de *PVA* ficaram acima de $(10,09 \pm 0,35) \text{ g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$ devido ao aumento da porosidade verificada visualmente após cada tratamento.

Entretanto, com o uso de um agente antimicrobiano, os valores de *PVA* sofreram uma redução significativa de aproximadamente 60 %, chegando a um valor mínimo de $(4,07 \pm 0,82) \text{ g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$ quando cinamaldeído foi impregnado durante 15 h e com taxa de despressurização mais rápida ($10 \text{ bar}\cdot\text{min}^{-1}$). Possivelmente, a porosidade obtida pelo material após o tratamento com $\text{CO}_2\text{-sc}$ foi preenchida pelo agente antimicrobiano, que funcionou como agente de barreira ao vapor de água.

4.5.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Análises de espectroscopia no infravermelho foram usadas para estudar as interações entre o filme biodegradável, o tratamento com fluido supercrítico e os agentes antimicrobianos impregnados. Espectros relativos à análise são mostrados nas Figuras 26, 27 e 28. Ressalta-se que o eixo das ordenadas (eixo y) de cada figura foi deslocada para cada amostra, para melhor visualização e comparação dos espectros.

A Figura 26 mostra o gráfico com os espectros das amostras de filmes biodegradáveis sem e com tratamento com CO₂-sc, sem impregnação de agente antimicrobiano. Nota-se que o tratamento com fluido supercrítico não afetou a estrutura química do polímero biodegradável estudado, uma vez que não se nota nenhum deslocamento, aparecimento e/ou desaparecimento de bandas.

Figura 26 – Espectros do filme biodegradável a base de amido antes e depois de ser submetido ao tratamento com fluido supercrítico.

A Figura 27 mostra os espectros para amostras biodegradáveis sem impregnação e com impregnação de cinamaldeído, na condição (T_e/T_d):(15/10), além da curva do cinamaldeído puro. Notam-se alterações entre (1200 e 1450) cm⁻¹, que corresponde a uma zona onde o cinamaldeído apresenta diversos picos. Porém, a

principal alteração acontece entre $(1600 \text{ e } 1700) \text{ cm}^{-1}$, onde aparecem dois picos característicos do cinamaldeído na amostra impregnada. Os picos relatados nestes intervalos correspondem ao anel aromático presente na estrutura química do cinamaldeído. Estas alterações permitem confirmar que existe cinamaldeído impregnado dentro da matriz polimérica.

Figura 27 – Espectros do cinamaldeído puro e do filme biodegradável a base de amido antes e depois da impregnação de cinamaldeído com fluido supercrítico.

A Figura 28 mostra as curvas para amostras biodegradáveis sem impregnação e com impregnação de óleo essencial de canela, na condição $(T_e/T_d):(15/10)$, além da curva do óleo essencial de canela puro. Neste caso, nota-se apenas uma alteração entre $(1600 \text{ e } 1700) \text{ cm}^{-1}$, onde aparecem dois picos característicos do óleo essencial de canela na amostra impregnada. Os picos relatados nestes intervalos correspondem ao anel aromático presente na estrutura química do cinamaldeído, que é o maior componente do óleo essencial de canela. Estas alterações permitem confirmar que existe óleo essencial de canela impregnado dentro da matriz polimérica.

Figura 28 – Espectro do óleo essencial de canela puro e do filme biodegradável a base de amido antes e depois da impregnação de óleo essencial de canela com fluido supercrítico.

4.6 Quantificação de agente antimicrobiano impregnado em filmes biodegradáveis pelo método tradicional e por tecnologia de fluido supercrítico

O principal objetivo desta etapa do trabalho foi caracterizar os filmes biodegradáveis em relação à sua capacidade de ser impregnado por tecnologia de fluido supercrítico com agente antimicrobiano em quantidade suficiente para promover inibição dos fungos estudados (*P. commune* e *E. amstelodami*).

Como a impregnação com CO₂-sc foi realizada no exterior, os testes microbiológicos para verificar a inibição dos fungos ficou inviável, uma vez que o Laboratório de Alta Pressão e Tecnologia Supercrítica da Universidade de Coimbra não era equipado com os materiais necessários para tal análise.

Para transpor este obstáculo, inicialmente realizou-se uma quantificação do conteúdo de óleo essencial de canela presente em amostras de filmes biodegradáveis elaborados pelo método tradicional na quarta etapa deste trabalho, onde o óleo essencial de canela é misturado aos demais ingredientes durante o

preparo da solução filmogênica. Para essa análise, usou-se a formulação OE1, uma vez que essa formulação contém agente antimicrobiano em quantidade suficiente para promover uma inibição parcial dos fungos estudados (de acordo com os resultados mostrados no item 4.4.3). Em seguida, quantificou-se o agente antimicrobiano impregnado em amostras de filmes biodegradáveis por tecnologia de fluido supercrítico, esperando sempre que a impregnação por fluido supercrítico resultasse em conteúdos no mínimo iguais aos quantificados nas amostras elaboradas pelo método tradicional. Toda quantificação foi realizada usando curvas de calibração dos compostos antimicrobianos usados.

4.6.1 Curvas de calibração do cinamaldeído e do óleo essencial de canela

Curvas de calibração dos agentes antimicrobianos foram determinadas (Figura 29) e as Equações (6 e 7) obtidas foram usadas nos cálculos de quantificação de agente incorporado nas amostras de filme biodegradável em cada condição operacional testada.

Figura 29 – Curvas de calibração dos agentes antimicrobianos incorporados às amostras de filmes biodegradáveis.

$$\text{Concentração (mL}_{\text{cin}} \cdot \text{mL}^{-1}_{\text{água}}) = 2 \cdot 10^{-06} \cdot \text{Absorbância}_{(289\text{nm})} \quad (r^2 = 0,98) \quad (6)$$

$$\text{Concentração (mL}_{\text{OEcanela}} \cdot \text{mL}^{-1}_{\text{água}}) = 4 \cdot 10^{-06} \cdot \text{Absorbância}_{(291\text{nm})} \quad (r^2 = 0,99) \quad (7)$$

4.6.2 Liberação de cinamaldeído e de óleo essencial de canela incorporados aos filmes biodegradáveis por casting e por tecnologia de fluido supercrítico

O objetivo inicial de impregnar um agente antimicrobiano por tecnologia supercrítica foi alcançado. A Figura 30 mostra as curvas de liberação, em água, de cinamaldeído impregnado em amostras de filmes biodegradáveis, usando CO₂-sc como solvente, a 250 bar, nas diferentes condições operacionais testadas. A liberação completou-se em aproximadamente 1 h, entretanto, o teste continuou por 3 h para assegurar que não havia mais nada a ser libertado. O valor final de cinamaldeído libertado em cada condição também está mostrado na Figura 30. Esse valor corresponde ao conteúdo total de cinamaldeído impregnado em cada grama de filme biodegradável.

Figura 30 – Liberação de cinamaldeído impregnado em amostras de filme biodegradável através de tecnologia supercrítica.

Percebe-se um aumento do conteúdo impregnado quando a taxa de

despressurização aumentou de $1 \text{ bar} \cdot \text{min}^{-1}$ para $10 \text{ bar} \cdot \text{min}^{-1}$. Provavelmente, com despressurização mais lenta, o cinamaldeído teve mais tempo para difundir para fora do polímero e precipitar no $\text{CO}_2\text{-sc}$.

Diante dos resultados obtidos, óleo essencial de canela foi impregnado na condição que forneceu o maior conteúdo de cinamaldeído libertado: 15 h de exposição e taxa de despressurização igual a $10 \text{ bar} \cdot \text{min}^{-1}$. Nesta condição, o conteúdo médio final de óleo essencial de canela impregnado foi igual a $(2,20 \pm 0,33) \text{ mg}_{\text{OEC}/\text{g}_{\text{amostra}}}$. Este resultado pode ser visualizado na Figura 31, que também mostra o resultado da libertação de óleo essencial de canela incorporado a filmes biodegradáveis pelo método tradicional.

Como pode ser visto, a tecnologia de fluido supercrítico foi eficiente para impregnar uma quantidade suficiente (superior a $0,86 \text{ mg}_{\text{OEC}/\text{g}_{\text{amostra}}}$) de agente antimicrobiano nos filmes biodegradáveis a base de fécula de mandioca capaz de inibir a proliferação dos fungos estudados. Dessa forma, concluiu-se que tanto a impregnação supercrítica quanto a incorporação de agente antimicrobiano pelo método tradicional são alternativas viáveis para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis ativos, alcançando, com sucesso, o objetivo proposto para este trabalho.

Figura 31 – Libertação de óleo essencial de canela presente em amostras de filme biodegradável, incorporado pelo método tradicional e por tecnologia de fluido supercrítico.

5 CONCLUSÕES GERAIS

As propriedades mecânicas e de barreira dos filmes biodegradáveis a base de fécula de mandioca foram fortemente afetadas pela composição da solução filmogênica.

O teor de glicerol foi a variável que mais influenciou as propriedades dos filmes elaborados neste trabalho. Embora seja necessária a adição de um plastificante para a formação de filmes íntegros e flexíveis, nota-se que eles são os maiores responsáveis pela produção de filmes menos resistentes e com melhores propriedades de barreira.

A adição de 0,75 g de glicerol/100 g de solução filmogênica nos filmes já contendo açúcares como plastificantes causou uma diminuição de 63 % na resistência máxima à tração, de $(6,06 \pm 1,04$ a $2,24 \pm 0,36)$ MPa, e elevações de 110 % e 890 %, respectivamente, na permeabilidade ao vapor de água, de $(3,36 \pm 0,51$ a $7,08 \pm 0,33)$ g·mm·m⁻²·dia⁻¹·KPa⁻¹, e no coeficiente de permeabilidade ao oxigênio, de $(4,28 \pm 0,05$ a $42,38 \pm 0,98)$ cm³·m⁻¹·d⁻¹·Pa⁻¹.

Para filmes sem açúcares e com nanopartículas de argila, a elevação do conteúdo de glicerol de (0,75 para 1,25) g/100 g de solução filmogênica também influenciou negativamente sua resistência máxima à tração. Reduções de 23 %, 50 % e 48 % foram observadas, respectivamente, nos filmes sem adição de argila e com adição de argila de (0,05 e 0,10) g/100 g de solução filmogênica. Percebe-se que, com os filmes contendo argila em sua formulação, independente da quantidade, a redução da $R_{máx}$ foi muito maior (50 % e 48 %) do que nos filmes sem argila (23 %), provavelmente devido a um excesso de nanocarga não esfoliada, enfraquecendo as ligações nas cadeias poliméricas. Já nas propriedades de barreira, as nanopartículas de argila causaram influência positiva, uma vez que sua adição foi responsável pela redução da PVA e do P'O₂, respectivamente, em 26 % e 27 % (com o uso de 0,75 g de glicerol/100 g de solução) e em 31 % e 19 % (com o uso de 1,25 g de glicerol/100 g de solução).

Comparando com filmes comerciais, as propriedades de barreira dos filmes a base de fécula de mandioca são equiparáveis ou até melhores do que as propriedades do celofane, polímero muito usado em embalagens de alimentos.

As temperaturas de transição vítrea dos filmes a base de fécula de mandioca não sofreram alterações com a variação dos conteúdos de glicerol e nanopartículas de argila.

Pelas análises de DRX, pode-se afirmar que não houve delaminação total da argila, o que é comprovado pela redução dos valores de $R_{máx}$, uma vez que a argila não-delaminada induz o início da fratura do filme.

Óleos essenciais de cravo e de canela provaram sua efetividade como agentes antimicrobianos contra a proliferação de dois fungos correntes em produtos de panificação: *Penicilium commune* e *Eurotium amstelodami*. As concentrações inibitórias mínimas dos óleos essenciais de cravo e de canela foram iguais a 16 g/100 g e 2 g/100 g, respectivamente. Dessa forma, concluiu-se que o óleo essencial de canela tem maior poder antimicrobiano do que o óleo essencial de cravo, quando avaliado contra os fungos citados.

Cinamaldeído e óleo essencial de canela foram incorporados, com sucesso, à matriz dos filmes biodegradáveis a base de fécula de mandioca, tornando-os, além de biodegradáveis, também ativos e efetivos contra os fungos estudados. As duas técnicas de incorporação (método tradicional e tecnologia de fluido supercrítico) forneceram filmes biodegradáveis com bom aspecto e propriedades de barreira aceitáveis para uso em embalagem para alimentos. O uso da tecnologia de fluido supercrítico foi responsável pela diminuição, em 62 %, da *PVA* dos filmes biodegradáveis a base de fécula de mandioca, contendo óleo essencial de canela incorporado como agente antimicrobiano, quando comparado ao método convencional.

Apesar das duas técnicas usadas terem fornecido filmes biodegradáveis ativos contra os fungos estudados, a impregnação de agente antimicrobiano (óleo essencial de canela) em filme biodegradável por fluido supercrítico foi mais efetiva

do que a incorporação pelo método tradicional, uma vez que resultou em amostras com maior conteúdo de agente antimicrobiano $((2,20 \pm 0,33) \text{ mg}_{\text{OEC}}/\text{g}_{\text{amostra}}$ com fluido supercrítico e $(0,86 \pm 0,07) \text{ mg}_{\text{OEC}}/\text{g}_{\text{amostra}}$ com incorporação tradicional).

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O estudo mostrado nesta tese de doutorado forneceu algumas evidências que necessitam ser completamente estudadas. Este projeto experimental deixou de abordar pontos relevantes no desenvolvimento desta nova classe de materiais devido a limitações de tempo e falta de equipamentos.

O principal ponto a ser explorado é a obtenção de filmes nanocompósitos de fécula de mandioca reforçados por nanocargas de argila (naturais e modificadas), através do processo de extrusão. Um futuro estudo também poderia abordar a utilização de nanopartículas de argila, não somente como cargas de reforço, mas principalmente atuando como proteção térmica de agentes antimicrobianos naturais, levando ao desenvolvimento de uma embalagem, além de biodegradável, também ativa. Empregar as técnicas e equipamentos convencionalmente utilizados na indústria de embalagens flexíveis seria o principal ponto de evolução dos projetos com filmes biodegradáveis a base de polímeros de origem vegetal e com substâncias ativas naturais incorporadas. Sugere-se, neste caso, a utilização de uma extrusora de dupla rosca com controle de temperatura, o que é fundamental para obtenção de filmes nanocompósitos com os aditivos antimicrobianos preservados.

Outro ponto de complementação do projeto é o estudo da vida útil dos filmes biodegradáveis a base de fécula de mandioca, em relação às suas propriedades mecânicas e de barreira e aspectos físico-químicos e microbiológicos. Além disso, é importante analisar a perda de agente antimicrobiano com o tempo e, com isso, definir um prazo máximo de utilização do filme biodegradável como embalagem ativa de alimentos.

Adicionalmente, aconselha-se o estudo da dispersão das nanopartículas de argila na matriz polimérica. Análises em escala micrométrica e nanométrica poderão ser realizadas por microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão e difração de raios X. Neste caso, a melhoria da dispersão das nanopartículas de argila na matriz polimérica incrementaria as propriedades mecânicas, de barreira e térmicas dos filmes biodegradáveis, que são requisitos importantes para a aplicação do novo material na indústria de alimentos.

Por fim, a incorporação, em escala industrial e conforme as normas brasileiras, de nanopartículas de argila e de aditivos antimicrobianos às embalagens

poliméricas sintéticas já encontradas no mercado nacional poderiam trazer benefícios extras, levando à melhoria das propriedades de uma embalagem e, principalmente, à redução da quantidade de conservante adicionado ao produto, satisfazendo um nicho de consumidores mais atentos à qualidade e segurança de um alimento e em busca de produtos mais naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS³

- ABDORREZA, M. N.; CHENG, L. H.; KARIM, A. A. Effects of plasticizers on thermal properties and heat sealability of sago starch films. *Food Hydrocolloids*, v. 25, p. 56-60, 2011.
- ABRE Associação Brasileira de Embalagens. 2009. Disponível em: <<http://www.abre.org.br>>. Acesso em: 19 out. 2010.
- ALEXANDRE, M.; DUBOIS, P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. *Materials Science and Engineering*, v. 28, p. 1-6, 2000.
- ALTIERI, C.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. R.; BUONOCORE, G. G.; FALCONE, P.; DEL NOBILE, M. A. Use of entrapped microorganisms as biological oxygen scavengers in food packaging. *LWT – Food Science and Technology*, v. 37, p. 9-15, 2004.
- ALVES, V. D.; MALI, S.; BELÉIA, A.; GROSSMANN, M. V. E. Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties. *Journal of Food Engineering*, v. 78, p. 941-946, 2007.
- ANKER, M.; BERNTSEN, J.; HERMANSSON, A. M.; STADING, M. Improved water vapor barrier of whey protein films by addition of an acetylated monoglyceride. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 3, p. 81-92, 2002.
- APEL, L.; HILL, L.; LOH, J.; NAYYAR, D.; BEHRINGER, M.; NAUTH, K. R. *Premium quality intermediate moisture vegetables*. CA n. 2355205, 14 fevereiro 2002.
- APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 3, p. 113-126, 2002.
- ARAUJO-FARRO, P. C.; PODADERA, G.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C. Development of films based on quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willdenow) starch. *Carbohydrate Polymers*, v.81, p. 839-848, 2010.
- ARORA, D. S.; KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 12, p. 257-262, 1999.
- ARVANITOYANNIS, I.; BILIADERIS, C. G. Physical properties of polyol-plasticized edible blends made of methyl cellulose and soluble starch. *Carbohydrate Polymers*, v. 38, p.47-58, 1999.

³ De acordo com as normas ABNT NBR 6023 (2002), com adaptações EPUSP- Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses, 1030. 2006. Disponível em www.poli.usp.br.

- ASTM Standard D 882-10 (2010), "Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting", ASTM International, West Conshohocken, PA, www.astm.org/Standards.
- ASTM Standard E 96/E 96M-10 (2010), "Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials", ASTM International, West Conshohocken, PA, www.astm.org/Standards.
- ASTM Standard F 1927-07 (2007), "Standard Test Method for Determination of Oxygen Gas Transmission Rate, Permeability and Permeance at Controlled Relative Humidity Through Barrier Materials Using a Coulometric Detector", ASTM International, West Conshohocken, PA, www.astm.org/Standards.
- ATTARIAN A. C.; VEIGA-SANTOS, P.; DITCHFIELD, C.; PARRA, F. D.; LUGÃO, A. B.; TADINI, C. C. Investigation of Natural Additives as pH Indicators for Cassava Starch Biobased Materials. In: *2nd CIGR Section VI International Symposium on Future of Food Engineering*, Warsaw. Proceedings of CIGR International Symposium Warsaw, 2006.
- AVELLA, M.; DE VIEGER, J. J.; ERRICO, M. E.; FISCHER, S.; VACCA, P.; VOLPE, M. G. Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food Chemistry*, v. 93, p. 467-474, 2005.
- AVÉROUS, L.; FAUCONNIER, N.; MORO, L.; FRINGANT, C. Blends of thermoplastic starch and polyesteramide: processing and properties. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 76, p. 1117-1128, 2000.
- AVÉROUS, L.; BOQUILLON, N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours. *Carbohydrate Polymers*, v. 56, p. 111-122, 2004.
- BARCELOUX, D. A. Cinnamon (*Cinnamomum* Species). *Foodborne and microbial toxins, Part II: Staples and spices*, v. 55, p. 327-335, 2009.
- BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT – Food Science and Technology*, v. 37, p. 263-268, 2004.
- BERTAN, L. C. *Desenvolvimento e caracterização de biofimes ativos à base de polímeros de fontes renováveis e sua aplicação no acondicionamento de pães de forma*. 2008. 203 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- BERTUZZI, M. A.; CASTRO VIDAURRE, E. F.; ARMANDA, M.; GOTTIFREDI, J. C. Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of Food Engineering*, v. 80, p. 972-978, 2007.
- BILIADERIS, C. G. The structure and interactions of starch with food. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 69, p. 60-78, 1991.

- BODMEIER, R.; PAERATAKUL, O. Plasticizer uptake by aqueous colloidal polymer dispersions used for the coating of solid dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 152, p. 17-26, 1997.
- BRODY, A. L.; STRUPINSKY, E. R.; KLINE, R. L. *Active Packaging for Food Applications*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2001, 223 p.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential application food – a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, p. 223-225, 2004.
- CACCIONI, D. R. L.; GUIZZARDI, M.; BIONDI, D. M.; RENDA, A.; RUBERTO, G. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 43, p. 73-79, 1998.
- CARVALHO, A. J. F.; CURVELO, A. A. S.; AGNELLI, J. A. M. A first insight on composites of thermoplastic starch and kaolin. *Carbohydrate Polymers*, v. 45, p. 189-194, 2001.
- CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Natural biodegradable polymers-starch. *Biodegradable Polymers*, v. 23, p. 1276-1279, 1998.
- CHASTAIN, D. E.; SANDERS, W. E.; SANDERS, C. C. *Using limonen-10-ol to kill bacteria, yeast, and fungi*. US n. 5543435, 06 agosto 1996.
- CHEN, B.; EVANS, J. R. G. Thermoplastic starch-clay nanocomposites and their characteristics. *Carbohydrate Polymers*, v. 61, p. 455-463, 2005.
- CHIOU, B-S.; WOOD, D.; YEE, E.; IMAM, S. H.; GLENN, G. M.; ORTS, W. J. Extruded starch-nanoclay nanocomposites: Effects of glycerol and nanoclay concentration. *Polymer Engineering Science*, v. 47, p. 1898-1904, 2007.
- CHIVRAC, F.; POLLET, E.; SCHMUTZ, M.; AVÉROUS, L. New approach to elaborate exfoliated starch-based nanobiocomposites. *Biomacromolecules*, v. 9, p. 896-900, 2008.
- CHIVRAC, F.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. Progress in nano-biocomposites based on polysaccharides and nanoclays. *Materials Science & Engineering*, v. 67, p. 1-17, 2009.
- CIPRIANO DE SOUSA, H. J.; MENDES GIL, M. H.; MARTINS DUARTE, C. M.; BAPTISTA LEITE, E. O.; CRUZ DUARTE, A. R. *Method for preparing sustained-release therapeutic ophtalmic articles using compressed fluids for impregnation of drugs*. EP 1611877 A1, 01 abril 2006.
- COCCHIARA, J.; LETIZIA, C. S.; LALKO, J.; LAPCZYNSKI, A.; API, A. M. Fragrance material review on cinnamaldehyde. *Food and Chemical Toxicology*, v. 43, p. 867-923, 2005.

- COELHO, A. C. V.; SANTOS, P. S.; SANTOS, H. S. Argilas especiais: o que são, caracterização e propriedades. *Química Nova*, v. 30, p. 146-152, 2007.
- CONTE, A.; SCROCO, C.; SINIGAGLIA, M.; DEL NOBILE, M. A. Innovative active packaging systems to prolong the shelf life of mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, v. 90, p. 2126-2131, 2007.
- CONTE, A.; GAMMARIELLO, D.; GIULIO, S.; ATTANASIO, M.; DEL NOBILE, M. A. Active coating and modified-atmosphere packaging to extend the shelf life of Fior di Latte cheese. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 887-894, 2009.
- COSTA, V. P.; BRAGA, M. E. M.; DUARTE, C. M. M.; ALVAREZ-LOURENÇO, C.; CONCEIRO, A.; GIL, M. H.; SOUSA, H. C. Anti-glaucoma drug-loaded contact lenses prepared using supercritical solvent impregnation. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 53, p. 165-173, 2010.
- CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Edible packaging film based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties. *Journal of Food Science*, v. 60, p. 1369-1374, 1995.
- CYRAS, V. P., MANFREDI, L. P., TON-THAT, M. T., VÁSQUEZ, A. Physical and mechanical properties of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, v. 73, p. 55-63, 2008.
- DAGLIA, M.; PAPETTI, A.; DACARRO, C.; GAZZANI, G. Isolation of an antibacterial component from roasted coffee. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 18, p. 219-225, 1998.
- DAI, H.; CHANG, P. R.; GENG, F.; YU, J.; MA, X. Preparation and properties of starch-based film using *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)formamide as a new plasticizer. *Carbohydrate Polymers*, v. 79, p. 306-311, 2010.
- DAISUKE, H.; HIROMICHI, M.; YOSHIE, M. *Temperature history indicator*. JP n. 172661, 20 julho 2003.
- DA RÓZ, A. L.; CARVALHO, A. J. F.; GANDINI, A.; CURVELO, A. A. S. The effect of plasticizers on thermoplastic starch compositions obtained by melt processing. *Carbohydrate Polymers*, v. 63, p. 417-424, 2006.
- DAVIDSON, P. M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington: ASM Press, 1997, p. 520-556.
- DAVIES, O. R.; LEWIS, A. L.; WHITAKER, M. J.; TAI, H.; SHAKESHEFF, K. M.; HOWDLE, S. M. Applications of supercritical CO₂ in the fabrication of polymer systems for drug delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, p. 373-387, 2008.

- DEBEAUFORT, F.; GALLO, J. A. Q.; VOILLEY, A. Edible films and coatings: Tomorrow's packagings: a review. *Critical Reviews in Food Science*, v. 38, p. 299-313, 1998.
- DEL NOBILE, M. A.; CONTE, A.; BUONOCORE, G. G.; INCORONATO, A. L.; MASSARO, A.; PANZA, O. Active packaging by extrusion processing of recyclable and biodegradable polymers. *Journal of Food Engineering*, v. 93, p. 1-6, 2009.
- DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, v. 114, p. 273-285, 2004.
- DIAS, A. B.; MÜLLER, C. M. O.; LAROTONDA, F. D. S.; LAURINDO, J. B. Biodegradable films based on rice starch and rice flour. *Journal of Cereal Science*, v. 51, p. 213-219, 2010.
- DILLOW, A. K.; DEHGHANI, F.; HRKACH, J. S.; FOSTER, N. R.; LANGER, R. Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, p. 10344-10348, 1999.
- DONALD, A. M. Understanding starch structure and functionality. In: *Starch in Food: Structure, function and applications*. Boca Raton: CRC Press LLC, 2004, p. 156-184.
- DURANGO, A. M.; SOARES, N. F. F.; ANDRADE, N. J. Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control*, v. 17, p. 336-341, 2006.
- ESQUENAZI, D.; WIGG, M. D.; MIRANDA, M. M. F. S.; RODRIGUES, H. M.; TOSTES, J. B. F.; ROZENTAL, S.; DA SILVA, A. J. R.; ALVIANO, C. S. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (*Palmae*) husk fiber extract. *Research in Microbiology*, v. 153, p. 647-652, 2002.
- FAMÁ, L.; FLORES, S. K.; GERSCHENSON, L.; GOYANES, S. Physical characterization of cassava starch biofilms with special reference to dynamic mechanical properties at low temperatures. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, p. 8-15, 2006.
- FAMÁ, L.; GOYANES, S.; GERSCHENSON, L. Influence of storage time at room temperature on the physicochemical properties of cassava starch films. *Carbohydrate Polymers*, v. 70, p. 265-273, 2007.
- FANNI, J.; RAMET, J. *Time-temperature control indicator for critical temperature sensitive materials and products*. WO n. 9617231, 06 junho 1996.
- FAOSTAT Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical Databases. Agricultural data. 2008. Disponível em: <http://faostat.fao.org/faostat/>. Acesso em: 15 fev. 2011.

- FARKAS, J. Physical Methods of Food Preservation. In: DOYLE, M.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington: ASM Press, 1997, p. 497-519.
- FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; ZHI, N; ALESON-CARBONELL, L.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A.; KURI, V. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, v. 69, p. 371-380, 2005.
- FISHMAN, M. L.; COFFIN, D. R.; KONSTANCE, R. P.; ONWULATA, C. I. Extrusion of pectin/starch blends plasticized with glycerol. *Carbohydrate Polymers*, v. 41, p. 317-325, 2000.
- FLORES, S.; FAMÁ, L.; ROJAS, A. M.; GOYANES, S.; GERSCHENSON, L. Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of film making and potassium sorbate. *Food Research International*, v. 40, p. 257-265, 2007.
- FORINI, S. H. *Estudo da dispersão e incorporação de argilas esmectitas em plastisol*. 2008. 114 f. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- FRANCO, C. M. L.; DAIUTO, E. R.; DEMIATE, I. M.; CARVALHO, L. J. C. B.; LEONEL, M.; VILPOUX, O. F.; SARMENTO, S. B. S. Propriedades do Amido, In: *Propriedades Gerais do Amido, Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas*. Campinas: Fundação Cargill, v. 1, 2002, p. 141-184.
- FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. *Microbiología de los alimentos*. 4th ed. espanhola. Zaragoza, Espanha: Editorial Acribia, SA, 1993, 522p.
- FRITZ, H. G.; SEICENDSTUCKER, T.; BOLZ, U.; JUZA, M.; SCHROETER, T.; ENDRES, H. J. Study on production of thermoplastics and fibers based mainly on biological materials. *Science Research Development*, European Comission, EUR 16102, 1994.
- GALICIA-GARCÍA, T.; MARTÍNEZ-BUSTOS, F.; JIMÉNEZ-AREVALO, O.; MARTÍNEZ, A. B.; IBARRA-GÓMEZ, R.; GAYTÁN-MARTÍNEZ, M.; MENDONZA-DUARTE, M. Thermal and microstructural characterization of biodegradable films prepared by extrusion-calendering process. *Carbohydrate Polymers*, v. 83, p. 354-361, 2011.
- GALLO, J. Q.; DEBEAUFORT, F.; CALLEGARIN, F.; VOILLEY, A. Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based edible films. *Journal of Membrane Science*, v. 180, p. 37-46, 2000.
- GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers*, v. 56, p. 339-345, 2004.

- GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A.; ZARITZKY, N. E. Physicochemical, water vapor barrier and mechanical properties of corn starch and chitosan composite films. *Starch*, v. 58, p. 453-463, 2006.
- GARCÍA, N. L.; RIBBA, L.; DUFRESNE, A.; ARANGUREN, M.; GOYANES, S. Effect of glycerol on the morphology of nanocomposites made from thermoplastic starch and starch nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, p. 203-210, 2011.
- GHANBARZADEH, B.; ALMASI, H.; ENTEZAMI, A. A. Physical properties of edible modified starch/carboxymethyl cellulose films. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 11, p. 697-702, 2010.
- GHANBARZADEH, B.; ALMASI, H.; ENTEZAMI, A. A. Improving the barrier and mechanical properties of corn starch-based edible films: Effect of citric acid and carboxymethyl cellulose. *Industrial Crops and Products*, v. 33, p. 229-235, 2011.
- GILMAN, J. W.; JACKSON, C. L.; MORGAN, A. B.; HARRIS, R. J.; MANIAS, E.; GIANNELIS, E. P.; WUTHENOW, M.; HILTON, D.; PHILIPS, S. H. Flammability properties of polymer-layered-silicate nanocomposites. Polypropylene and polystyrene nanocomposites. *Chemistry of Materials*, v. 12, p. 1866-1873, 2000.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*, v. 58, p. 206-211, 1993.
- GRASSMAN, O.; MÜLLER, G.; LÖBMAN, P. Organic-inorganic hybrid structure of calcite crystalline assemblies grown in a gelatin hydrogel matrix: Relevance to biomineralization. *Chemistry of Materials*, v. 14, p. 4530-4535, 2002.
- GUILBERT, S.; GONTARD, N.; GOSSIS, L. G. M. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *LWT – Food Science and Technology*, v. 29, p. 10-17, 1996.
- HANSEN, R. E.; RIPPL, C. G.; MIDKIFF, D. G.; NEUWIRTH, J. G. *Antimicrobial absorbent food pad*. US n. 4865855, 12 setembro 1989.
- HARA, K.; MURATA, S. *Germicidal antimicrobial composition*. JP n. 63253008, 20 outubro 1988.
- HAYASHI, A.; VEIGA-SANTOS, P.; DITCHFIELD, C.; TADINI, C.C. Investigation of Antioxidant Activity of Cassava Starch Biobased Materials. In: *2nd CIGR Section VI International Symposium on Future of Food Engineering*, Warsaw. Proceedings of CIGR International Symposium Warsaw, 2006.
- HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P. Utilização de biofilmes na conservação pós colheita de morango (*Fragaria ananassa* Duch). *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 19, p. 231-240, 1999.
- HENRIQUE, C. M. *Caracterização de filmes de féculas modificadas de mandioca como subsídios para a aplicação em pós-colheita de hortícolas*. 2002. 141 f. Tese

(Doutorado em Ciências Agrônômicas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 231-240, 2008.

HEREK, L. C. S.; OLIVEIRA, R. C.; RUBIRA, A. F.; PINHEIRO, N. Impregnation of PET films and PHB granules with curcumin in supercritical CO₂. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 23, p. 227-234, 2006.

HODGE, J. E.; OSMAN, E. M. Hidratos de carbono. In FENNEMA, O. R. *Introducción a la ciencia de los alimentos*. Barcelona: Reverté, 1985, v. 1, p. 48-160.

HOFFMANN, R. W.; BRINDLEY, G. W. Adsorption of ethylene glycol and glycerol by montmorillonite. *American Mineralogist*, v. 46, p. 450-452, 1961.

HONG, S. -I. & PARK, W-S. Use of color indicators as an active packaging system for evaluating kimchi fermentation. *Journal of Food Engineering*, v. 46, p. 67-72, 2000.

HOTCHKISS, J. H. Food-packaging interactions influencing quality and safety. *Food Additives and contaminants*, v. 14, p. 601-607, 1997.

HSIEH, P. C.; MAU, J. L.; HUANG, S. H. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. *Food Microbiology*, v. 18, p. 35-43, 2001.

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010. <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 19/10/2010.

JANGEHUD, A.; CHINNAN, M. S. Properties of peanut protein film: sorption isotherm and plasticizer effect. *LWT – Food Science and Technology*, v. 32, p. 89-94, 1999.

JAY, J. M. Modern Food Microbiology. 4th ed. Nova York: Editora Chapman & Hall, 1992, 701p.

JEREZ, A.; PARTAL, P.; MARTÍNEZ, I.; GALLEGOS, C.; GUERRERO, A. Rheology and processing of gluten based bioplastics. *Biochemical Engineering Journal*, v. 26, p. 131-138, 2005.

JONG, A. R.; BOUMANS, H.; SLAGHEK, T.; VEEN, J. V.; RIJK, R.; ZANDVOORT, M. V. Active and intelligent packaging for food: Is it the future?. *Food Additives and Contaminants*, v. 22, p. 975-979, 2005.

KAMPEERAPAPPUN, P.; AHT-ONG, D.; PENTRAKON, D.; SRIKULKIT K. Preparation of cassava starch/montmorillonite composite film. *Carbohydrate Polymers*, v. 67, p. 155-163, 2007.

- KANO, F. Antimicrobial Paper and Packaging Material. JP n. 11222796, 17 agosto 1999.
- KECHICHIAN, V.; DITCHFIELD, C.; VEIGA-SANTOS, P.; TADINI, C. C. *Filme biodegradável à base de amido e/ou fécula contendo ingredientes naturais antimicrobianos e seus usos*. INPI n. 0704589-1, 13 abril 2007.
- KECHICHIAN, V.; DITCHFIELD, C.; VEIGA-SANTOS, P.; TADINI, C. C. Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. *LWT – Food Science and Technology*, v. 43, p. 1088-1094, 2010.
- KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review. *Food Technology*, v. 40, p. 47-59, 1986.
- KIKIC, I.; VECCHIONE, F. Supercritical impregnation of polymers. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, v. 7, p. 399-405, 2003.
- KIM, B. S.; HRKACH, J. S.; LANGER, R. Biodegradable photo-crosslinked poly (ether-ester) networks for lubricious coatings. *Biomaterials*, v. 21, p. 259-265, 2000.
- KIM, S. J.; USTUNOL, Z. Solubility and moisture sorption isotherms of whey-protein-based edible films as influenced by lipid and plasticizer incorporation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 4388-4391, 2001.
- KIM, H. -O.; PARK, S. -W.; PARK, H. -D. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassia* shoot. *Food Microbiology*, v. 21, p. 105-110, 2004.
- KISHIMOTO, A. New Food Packaging Materials: An introduction. In: KADOYA, T. *Food Packaging*. California: Academic Press, Inc, 1990, p. 47-51.
- KRISHNAMOORTI, R.; YUREKLI, K. Rheology of polymer layered silicate nanocomposites. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 6, p. 464-470, 2000.
- KROCHTA, J. M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technology*, v. 51, p. 61-73, 1997.
- KURAUCHI, M.; FURUTA, K.; SATO, H. *Antimicrobial packaging material*. JP n. 2003144116, 20 maio 2003.
- LABUZA, T. P.; BREENE, W. M. Application of “Active packaging” for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended foods. *Journal of Food Processing & Preservation*, v. 13, p. 1-69, 1989.
- LEUSCHNER, R. G. K.; ZAMPARINI, J. Effects of spices on growth and survival of *Escherichia coli* 0157 and *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* in broth model systems and mayonnaise. *Food Control*, v. 13, p. 399-404, 2002.

- LÓPEZ-RUBIO, A.; ALMENAR, E.; HERNADEZ-MUÑOZ, P.; LAGARÓN, J. M.; CATALÁ, R.; GAVARA, R. Overview of active polymer-based packaging technologies for food applications. *Food Review International*, v. 20, p. 357-387, 2004.
- LÓPEZ, O. V.; GARCÍA, M. A.; ZARITZKY, N. E. Film forming capacity of chemically modified corn starches. *Carbohydrate Polymers*, v. 73, p. 573-581, 2008.
- LÓPEZ-LUNA, A.; GALLEGOS, J. L.; GIMENO, M.; VIVALDO-LIMA, E.; BÁRZANA, E. Lipase-catalyzed syntheses of linear and hyperbranched polyesters using compressed fluids as solvent media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 67, p. 143-149, 2010.
- LÓPEZ, O. V.; LECOT, C. J.; ZARITZKY, N. E.; GARCÍA, M. A. Biodegradable packages development from starch based heat sealable films. *Journal of Food Engineering*, article in press, 2011.
- LOURDIN, D.; COIGNARD, L.; BIZOT, H.; COLONNA, P. Influence of equilibrium relative humidity and plasticizer concentration on the water content and glass transition of starch materials. *Polymers*, v. 38, p. 5401-5406, 1997.
- MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITSKY, N. E. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, v. 56, p. 129-135, 2004.
- MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITSKY, N. E. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. *Journal of Food Engineering*, v. 75, p. 453-460, 2006.
- MALOA, F. W.; ROONEY, M. L.; WORMELL, P.; NGUYEN, M. Improved oxidative stability of sunflower oil in the presence of oxygen-scavenging film. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 73, p. 181-185, 1996.
- MASATCIOGLU, T. M.; AVSAR, Y. K. Effects of flavorings, storage conditions and storage time on survival of *Staphylococcus aureus* in Sürk chesse. *Journal of Food Protection*, v. 68, p. 1487-1491, 2005.
- MATTA JUNIOR, M. D. Caracterização de biofilmes obtidos a partir de amido de ervilha (*Pisum sativum*) associado à goma xantana e glicerol. 2009. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- MCGLASHAN, S. A.; HALLEY, P. J. Preparation and characterization of biodegradable starch-based nanocomposite materials. *Polymer International*, v. 52, p. 1767-1773, 2003.
- MCHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Permeability properties of edible films. In: KROCHTA, J.; BALDWIN, E. A. M.; NISPEROS-CARRIEDO, M. *Edible coatings*

- and films to improve food quality*. Estados Unidos: Technomic Publishing company, Inc., 1994, p. 139-187.
- MDIC Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. *O Futuro da Indústria de Transformados Plásticos: embalagens plásticas para alimentos*. Brasília: Instituto Evaldo Lodi – Núcleo Central, 2005, p. 25-34.
- MEXIS, S. F.; BADEKA, A. V.; RIGANAKOS, K. A.; KONTOMINAS, M. G. Effect of active and modified atmosphere packaging on quality retention of dark chocolate with hazelnuts. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 11, p. 177-186, 2010.
- MILKOWSKI, A. L.; SKAAR, G. R.; HIRSCHHEY, J. A.; OVERLY H. J.; SEMAN D. L. *Method for controlling microbial contamination of a vacuum-sealed food product*. CA n. 2435693, 23 janeiro 2004.
- MILLER, K. S.; KROCHTA, J.M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 8, p. 228-237, 1997.
- MIYAKE, T.; YAMAMOTO, T.; KURIHARA, Y. *Antimicrobial anti-fogging agent application*. JP n. 02018491, 22 janeiro 1990.
- MONTAÑES, F.; FORNARI, T.; OLANO, A.; IBÁÑEZ, E. Supercritical fluid purification of complex carbohydrate mixtures produced by enzymatic transglycosilation and isomerized with complexating reagents. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 53, p. 25-33, 2010.
- MOORTHY, S. N. Tropical sources of starch. In: *Starch in Food: Structure, function and applications*. Boca Raton: CRC Press LLC, 2004, p. 326-334.
- MOREIRA, M. R., PONCE, A. G., DEL VALLE, C. E., ROURA, S. I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT – Food Science and Technology*, v. 38, p. 565-570, 2005.
- MORRISON, W. R. Starch lipids and how they relate to starch granule structure and functionality. *Cereal Foods World*, v. 40, p. 437-446, 1995.
- MÜLLER, C. M. O.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. *Carbohydrate Polymers*, v. 72, p. 82-87, 2008.
- MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; YAMASHITA, F. Effect of cellulose fibers on the crystallinity and mechanical properties of starch-based films at different relative humidity values. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, p. 293-299, 2009.
- MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; YAMASHITA, F. Effect of nanoclay incorporation method on mechanical and water vapor barrier properties of starch-based films. *Industrial Crops and Products*, article in press, 2011.

- MUNDO, M. A.; PADILLA-ZAKOUR, O. I.; WOROBO, R. W. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology*, v. 97, p. 1-8, 2004.
- NAGAMURA, Y.; KAMINO, Y.; FUJITA, Y.; TABATA, A.; UENO, R. *Preservation of foods by the combined action of a natural antimicrobial agent and separately packaged deoxidizing agent*. US n. 5549919, 27 agosto 1996.
- NAKATSU, T.; KANG, K. L. R.; HELMS, R. L.; HUANG, J. *Antimicrobial compositions of indole and naturally occurring antimicrobials*. US n. 5453276, 26 setembro 1995.
- NGUEFACK, F.; LETH, V.; ZOLLO, A.; MATHUR, S. B. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroun for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, p. 329-334, 2004.
- NIELSEN, P. V.; RIOS, R. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *International Journal of Food Microbiology*, v. 60, p. 219-229, 2000.
- NOVACOSK, R.; TORRES, R. S. L. A. Atividade antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de lavanda (*Lavandula officialis*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), cedro (*Juniperus virginiana*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*). *Revista Analytica*, v. 21, p. 36-39, 2006.
- OLIVEIRA, M. A.; CEREDA, M. P. Efeito da película de mandioca na conservação de goiabas. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 2, p. 97-102, 1999.
- OLIVEIRA, N. S.; DORGAN, J.; COUTINHO, J. A. P.; FERREIRA, A.; DARIDON, J. L.; MARRUCHO, I. M. Gas solubility of carbon dioxide in poly(lactic acid) at high pressures. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymers Physics*, v. 44, p. 1010-1019, 2006.
- OUATTARA, B.; SABATO, S. F.; LACROIX, M. Combined effect of antimicrobial coating and gamma irradiation on shelf life extension of pre-cooked shrimp. *International Journal of Food Microbiology*, v. 68, p. 1-9, 2001.
- OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SALMIÉRI, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of alginate-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Food Protection*, v. 69, p. 2364-2369. 2006a.
- OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of selected plant oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, v. 73, p. 236-244, 2006b.
- OZDEMIR, M.; FLOROS, J. D. Active food packaging technologies. *Food Science and Nutrition*, v. 44, p. 185-193, 2004.

- PAES, S. S.; YAKIMETS, I.; MITCHELL, J. R. Influence of gelatinization process on functional properties of cassava starch films. *Food Hydrocolloids*, v. 22, p. 788-797, 2008.
- PAIVA, L. B.; MORALES, A. R.; DIAZ, F. R. V. Argilas organofílicas: metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. *Cerâmica*, v. 54, p. 213-226, 2008.
- PARK, S.-K.; KI, H.-U. *Natural food preservative and it's making method from natural coffee extract remainder*. KR n. 9508466, 31 julho 1995.
- PARK, H.; LI, X.; JIN, C.; PARK, C.; CHO, W.; HA, C. Preparation and properties of biodegradable thermoplastic starch/clay hybrids. *Macromolecular Materials and Engineering*, v. 287, p. 553-558, 2002.
- PARK, H.; LEE, W.; PARK, C.; CHO, W.; HA, C. Enviromentally friendly polymer hybrids: Mechanical, thermal and barrier properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites. *Journal of Materials Science*, v. 38, p. 909-915, 2003.
- PARKER, R.; RING, S. G. Aspects of the physical chemistry of starch. *Journal of Cereal Science*, v. 34, p. 1-17, 2001.
- PARRA, D. F.; TADINI, C. C.; PONCE, P.; LUGÃO, A. B. Mechanical properties and water vapor transmission in some blends of cassava starch edible films. *Carbohydrate Polymers*, v. 58, p. 475-481, 2004.
- PARRA, D. F.; CARR, L.G.; PONCE, P.; TADINI, C.C.; LUGÃO, A.B. Biodegradable Foams Made of Cassava Starch and Fibers: Influence in the Mechanical Properties. In: *2nd CIGR Section VI International Symposium on Future of Food Engineering*, Warsaw. Proceedings of CIGR International Symposium Warsaw, 2006.
- PEREIRA, R. M.; SOARES, N. F. F.; FONTES, E. R. A. F.; ANDRADE, N. J.; RAMOS, N. M.; FRAGA, K. F. Avaliação e desenvolvimento de filme antimicrobiano laminado na conservação de queijo tipo gorgonzola. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 60, p. 292-294, 2005.
- PERONI, F. H. G. Características estruturais e físico-químicas de amidos obtidos de diferentes fontes botânicas. 2003. 118f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), São José do Rio Preto, 2003.
- PONCE, A. G.; FRITZ, R.; DEL VALLE, C.; ROURA, S. I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT – Food and Science Technology*, v. 36, p. 679-684, 2003.
- PRASAD, M. M.; SEENAYYA, G. Effect of spices on the growth of red halophilic cocci isolated from salt cured fish and solar salt . *Food Research International*, v. 33, p. 793-798, 2000.

- PUSHPADASS, H. A.; BHANDARI, P.; HANNA, M. A. Effects of LDPE and glycerol contents and compounding on the microstructure and properties of starch composite films. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, p. 1082-1089, 2010.
- QUINTAVALLA, S.; VICINI, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, v. 62, p. 373-380, 2002.
- RAQUEZ, J. M.; NABAR, Y.; NARAYAN, R.; DUBOIS, P. New developments in biodegradable starch-based nanocomposites. *International Polymer Processing*, v. 5, p. 463-470, 2007.
- RODRÍGUEZ, M.; OSÉS, J.; ZIANI, K.; MATÉ, J. I. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*, v. 39, p. 840-846, 2006.
- RODRÍGUEZ, A.; BATLLE, R.; NERÍN, C. The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. *Progress in Organic Coatings*, v. 60, p. 33-38, 2007.
- ROONEY, M. L. Overview of active food packaging. *Active Food Packaging*. London: Blackie Academic & Professional. London, UK, 1995, p. 1-37.
- ROSA, D. S.; FRANCO, B. L. M.; CALIL, M. R. Biodegradabilidade e propriedades mecânicas de novas misturas poliméricas. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 61, n. 2, p. 82-88, 2001.
- ROY, S.; GENNADIOS, A. WELER, C.; TESTIN, R. F. Water vapor transport parameters of a cast wheat gluten film. *Industrial Crops and Products*, v. 11, p. 43-50, 2000.
- SABAH, J. R.; JUNEJA, V. K.; FUNG, D. Y. C.; Effect of spices and organic acids on the growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked ground beef. *Journal of Food Protection*, v. 69, p. 1840-1847, 2004.
- SALOMÃO, K.; DANTAS, A. P.; BORBA, C. M.; CAMPOS, L. C.; MACHADO, D. G.; AQUINO NETO, F. R.; CASTRO, S. L. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *The Society of Applied Microbiology*, v. 38, p. 87-92, 2004.
- SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R. M. V. O.; GARCIA, E. E. C. Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades. Campinas: CETEA/ ITAL, 2001, 215p.
- SARBU, T.; STYRANEC, T. J.; BECKMAN, E. J. Design and synthesis of low cost, sustainable CO₂-philes. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 39, p. 4678-4683, 2000.

- SASAKI, T.; YASUI, T.; MATSUKI, J. Effect of amylose content on gelatinization, retrogradation, and pasting properties of starch from waxy and nonwaxy wheat and their F1 seeds. *Cereal Chemistry*, v. 77, p. 58-63, 2000.
- SEABROOK JR., S. G.; CRAVER III, W. E. *Polymers containing antimicrobial agents and methods for making and using same*. US n. 5906825, 25 maio 1999.
- SEAVEY, K. C.; GHOSH, I.; DAVIS, R. M.; GLASSER, W. G. Continuous cellulose fibre-reinforced cellulose ester composites I: manufacturing options. *Cellulose*, v. 8, p. 149-159, 2001.
- SEIICHI, O. *Color thermometer*. JP n. 59094025, 30 maio 1984.
- SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, v. 39, p. 639-644, 2006.
- SFORCIN, J. M.; FERNANDES, A. JR; LOPES, C. A. M.; BANKOVA; V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, p. 243-249, 2000.
- SHIMAZU, A. A.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Efeito plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. *Ciências Agrárias*, v. 28, p. 79-88, 2007.
- SHIN, D. H.; CHEIGH, H. S.; LEE, D. S. The use of Na₂CO₃-based CO₂ absorbent systems to alleviate pressure buildup and volume expansion of kimchi packages. *Journal of Food Engineering*, v. 53, p. 229-235, 2002.
- SIHVONEN, M.; JAÈRVENPÄÄ, E.; HIETANIEMI, V.; HUOPALAHTI, R. Advances in supercritical carbon dioxide technologies. *Trends in Food Science & Technology*, v. 10, p. 217-222, 1999.
- SILVEIRA, M. F. A. *Filme antimicrobiano incorporado com ácido sórbico na conservação de massa de pastel*. 2005. 56 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- SINGH, A.; SINGH, R. K.; BHUNIA, A. K.; SINGH, N. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. *LWT – Food and Science Technology*, v. 36, p. 787-794, 2003.
- SOARES, N. F. F.; HOTCHKISS, J. H. Naringinase immobilization in packaging films for reducing naringin concentration in grapefruit juice. *Journal of Food Science*, v. 63, p. 61-65, 1998.
- SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C.; HUBINGER, M. D.; ROQUES, M. A. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, v. 15, p. 423-432, 2001.
- SOUZA, A. C.; DITCHFIELD, C.; TADINI, C. C. Biodegradable films based on biopolymers for food industries. In M. L. Passos, & C. P. Ribeiro (Eds), *Innovation*

- in Food Engineering: New techniques and products*, Boca Raton, FL: CRC Press, 2010, p. 511-537.
- SOUZA-SANTOS, P. 1989. *Ciência e Tecnologia de Argilas*, São Paulo, Ed. Edgard Blucher Ltda, v. 1, 2^a ed., 1989, 408 p.
- SPERTI, G. S.; SWAY, B. *Antifungal-antibacterial detergents containing cinnamic compounds*. US n. 4477361, 16 outubro 1984.
- STAMENIC, M.; ZIZOVIC, I.; EGGERS, R.; JAEGER, P.; HEINRICH, H.; RÓJ, E.; IVANOVIC, J.; SKALA, D. Swelling of plant material in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 52, p. 125-133, 2010.
- SUHR, K. I.; NIELSEN, P. V. Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. *International Journal of Food Microbiology*, v. 95, p. 67-78, 2004.
- SUPPAKUL, P.; MILTZ, J.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S. W. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 3197-3207, 2003.
- TALJA, R. A.; HELÉN, H.; ROOS, Y. H.; JOUPPILA, K. Effect of various polyols and polyol contents on physical and mechanical properties of potato starch-based films. *Carbohydrate Polymers*, v. 67, p. 288-295, 2007.
- TALJA, R. A.; HELÉN, H.; ROOS, Y. H.; JOUPPILA, K. Effect of type and content of binary polyol mixtures on physical and mechanical properties of starch-based edible films. *Carbohydrate Polymers*, v. 71, p. 269-276, 2008.
- TAN, B.; WOODS, H. M.; LICENCE, P.; HOWDLE, S. M.; COOPER, A. I. Synthesis and CO₂ solubility studies of poly(ether carbonate)s and poly(ether ester)s produced by step growth polymerization. *Macromolecules*, v. 38, p. 1691-1698, 2005.
- TANG, S.; ZOU, P.; XIONG, H.; TANG, H. Effect of nano-SiO₂ on the performance of starch/polyvinyl alcohol blend films. *Carbohydrate Polymers*, v. 72, p. 521- 526, 2008.
- TANG, X.; ALAVI, S.; HERALD, T. J. Effects of plasticizers on the structure and properties of starch–clay nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, v. 74, p. 552- 558, 2008.
- TANG, X.; ALAVI, S. Recent advances in starch, polyvinyl alcohol based polymer blends, nanocomposites and their biodegradability. *Carbohydrate Polymers*, article in press, 2011.
- TAORMINA, P. J.; NIEMIRA, B. A.; BEUCHAT, L. R. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International Journal of Food Microbiology*, v. 69, p. 217-225, 2001.

- TAPIA-BLÁCIDO, D.; SOBRAL, P. J.; MENEGALLI, F. C. Development and characterization of biofilms based on Amaranth flour. *Journal of Food Engineering*, v. 67, p. 215-223, 2005.
- TEIXEIRA, E. M.; DA RÓZ, A. L.; CARVALHO, A. J. F.; CURVELO, A. A. S. The effect of glycerol/sugar/water and sugar/water mixtures on the plasticization of thermoplastic cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, v. 69, p. 619-624, 2007.
- TEJA, A. S.; ECKERT, C. A. Commentary on supercritical fluids: research and applications. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.39, p. 4442-4444, 2000.
- TESTER, R. F; KARKALAS, J.; QI, X. Starch – composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, v. 39, p. 153-165, 2004.
- THUNWALL, M.; KUTHANOVÁ, V.; BOLDIZAR, A.; RIGDAHL, M. Film blowing of thermoplastic starch. *Carbohydrate Polymers*, v. 71, p. 583-590, 2008.
- TOMASKO, D. L.; LI, H.; LIU, D.; HAN, X.; WINGERT, M. J., LEE, L. J.; KOELLING, K. W. A review of CO₂ applications in the processing of polymers. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 42, p. 6431-6456, 2003.
- TORRES, A. P.; OLIVEIRA, F.A. R. Application of the acid hydrolysis of sucrose as temperature indicator in continuous processes. *Journal of Food Engineering*, v. 40, p. 181-188, 1999.
- TORRES, F. G.; TRONCOSO, O. P.; TORRES, C.; DÍAZ, D. A.; AMAYA, E. Biodegradability and mechanical properties of starch films from Andean crops. *International Journal of Biological Macromolecules*, article in press, 2011.
- TSEGAYE, M.; EPHRAIM, E.; ASHENAFI, M. Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation of Datta and Awaze, traditional Ethiopian fermented condiments and during product storage at ambient and refrigeration temperatures. *Food Microbiology*, v. 21, p. 743-751, 2004.
- UL-HAQ, M. I.; ACOSTA-RAMÍREZ, A.; MEHRKHODAVANDI, P.; SIGNORELL, R. Influence of polydispersity of poly(lactic acid) on particle formation by rapid expansion of supercritical CO₂ solutions. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 51, p. 376-383, 2010.
- VAIA, R. A. Polymer nanocomposites open a new dimension for plastics and composites. *The AMPTIAC Newsletter*, v. 6, p. 17-24, 2002.
- VALERO, M.; SALMERÓN, M. C. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, v. 85, p. 73-81, 2003.

- VALERO, M.; GINER, M. J. Effects of antimicrobial components of essential oil on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, v. 106, p. 90-94, 2006.
- VANIN, F. M.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C.; CARVALHO, R. A.; HABITANTE, A. M. Q. B. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. *Food Hydrocolloids*, v. 19, p. 899-907, 2005.
- VÁSCONEZ, M. B.; FLORES, S. K.; CAMPOS, C. A.; ALVARADO, J.; GERSCHENSON, L. N. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, v. 42, p. 762-769, 2009.
- VEIGA-SANTOS, P. *Elaboração, aditivação e caracterização de biofilmes à base de fécula de mandioca*. 2004. 262 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- VEIGA-SANTOS, P.; SCAMPARINI, A. R. P. *Indicador irreversível de temperatura utilizando carboidratos*. INPI n. 0403610-7, 23 agosto 2004.
- VEIGA-SANTOS, P., OLIVEIRA, L. M.; CEREDA, M. P., ALVES, A. J.; SCAMPARINI, A. R. P. Mechanical properties, hydrophilicity and water activity of starch-gum films: Effect of additives and deacetylated xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, v. 19, p. 341-349, 2005a.
- VEIGA-SANTOS, P.; SUZUKI, C. K.; CEREDA, M. P.; SCAMPARINI, A. R. P. Microstructure and color of starch-gum films: Effect of additives and deacetylated xanthan gum. Part 2. *Food Hydrocolloids*, v. 19, p. 1064-1073, 2005b.
- VEIGA-SANTOS, P.; SUZUKI, C. K.; NERY, K. F.; CEREDA, M. P.; SCAMPARINI, A. R. P. Evaluation of optical microscopy efficacy in evaluating cassava starch biofilms microstructure. *LWT – Food and Science Technology*, v. 41, p. 1506-1513, 2008.
- VERMEIREN, L.; DEVLIEGHIERE, F.; BEEST, M. V.; KRUIJF, N.; DEBEVERE, J. Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science & Technology*, v. 10, p. 77-86, 1999.
- VICENTINI, N. M.; CEREDA, M. P.; CÂMARA, F. L. A. Revestimentos de fécula de mandioca, perda de massa e alteração da cor de frutos de pimentão. *Scientia Agrícola*, v. 56, p. 713-716, 1999.
- VILPOUX, O., AVÉROUS, L. Starch-based plastics. In: CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. *Technology, use and potentialities of Latin American starchy tubers*. São Paulo: NGO Raízes and Cargill Foundation, 2004, p. 521-553.

- WANG, R.; WANG, R.; YANG, B. Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 10, p. 289-292, 2009.
- WEBER, C. J. *Bio-based Packaging Materials for the Food Industry: Status and Perspectives*. Denmark: CPL Scientific Publishing Services, 2000, 136 p.
- WENQIANG, G.; SHUFEN, L.; RUIXIANG, Y.; SHAOKUN, T.; CAN, Q. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chemistry*, v. 101, p. 1558-1564, 2007.
- WILHELM, H. M.; SIERAKOWSKI, M. R.; SOUZA, G. P.; WYPYCH, F. Starch films reinforced with mineral clay. *Carbohydrate Polymers*, v. 52, p. 101-110, 2003.
- WILHELMUS, T. J.; CHRISTIAAN, M. R.; WILH, T. H. M. *Antimicrobial envelopes*. WO n. 03101196, 11 dezembro 2003.
- WILHOIT, D. L. *Film and method for surface treatment of foodstuffs with antimicrobial compositions*. US n. 5573797, 12 novembro 1996.
- WINTHER, M.; NIELSEN, P. V. Active packaging of cheese with allyl isothiocyanate, an alternative to modified atmosphere packaging. *Journal of Food Protection*, v. 69, p. 2430-2435, 2006.
- WOLF, K. L.; SOBRAL, P. J. A.; TELIS, V. R. N. Physicochemical characterization of collagen fibers and collagen powder for self-composite film production. *Food Hydrocolloids*, v. 23, p. 1886-1894, 2009.
- XIONG, H.; TANG, S.; TANG, H.; ZOU, P. The structure and properties of a starch-based biodegradable film. *Carbohydrate Polymers*, v. 71, p. 263-268, 2008.
- YAMIN, F. F.; LEE, M.; POLLAK, L. M.; WHITE, P. J. Thermal properties of starch in corn variants isolated after chemical mutagenesis of inbred line B73. *Cereal Chemistry*, v. 76, p. 175-181, 1999.
- YANG, L.; PAULSON, A. T. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. *Food Research International*, v. 33, p. 571-578, 2000.
- YANO, Y.; SATOMI, M.; OIKAWA, H. Antimicrobial effects of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 111, p. 6-11, 2006.
- YIN, M.; TSAO, S. Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, v. 49, p. 49-56, 1999.
- YOKOTA, Y. *Antimicrobial paper*. JP n. 2104798, 17 abril 1990.

- YOKSAN, R.; CHIRACHANCHAI, S. Silver nanoparticle-loaded chitosan-starch based films : Fabrication and evaluation of tensile, barrier and antimicrobial properties. *Materials Science and Engineering C*, v. 30, p. 891-897, 2010.
- ZHANG, Q.-X.; YU, Z.-Z.; XIE, X.-L.; NAITO, K.; KAGAWA, Y. Preparation and crystalline morphology of biodegradable starch/clay nanocomposites. *Polymer*, v. 48, p. 7193-7200, 2007.
- ZHONG, Y.; SONG, X.; LI, Y. Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch-chitosan composite films as a function of acid solvent types. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, p. 335-342, 2011.
- ZULLO, R.; IANNACE, S. The effects of different starch sources and plasticizers on film blowing of thermoplastic starch: Correlation among process, elongational properties and macromolecular structure. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, p. 376-383, 2009.