UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GISELE LOURENÇO DA APARECIDA MAKISHI

Desenvolvimento de filmes à base de proteínas extraídas da torta de mamona (*Ricinus communis* L.) reticuladas com glutaraldeído e glioxal

Pirassununga

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GISELE LOURENÇO DA APARECIDA MAKISHI

(versão corrigida)

Desenvolvimento de filmes à base de proteínas extraídas da torta de mamona (*Ricinus communis* L.) reticuladas com glutaraldeído e glioxal

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Paulo José do Amaral Sobral

Pirassununga

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

A639d

Aparecida-Makishi, Gisele Lourenço da
Desenvolvimento de filmes à base de proteínas
extraídas da torta de mamona (*Ricinus communis* L.)
reticuladas com glutaraldeído e glioxal / Gisele
Lourenço da Aparecida-Makishi. -- Pirassununga, 2012.
139 f.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de
Alimentos.

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

1. Filmes biodegradáveis 2. Biopolímeros 3. Extração
4. Modificação química 5. Aldeídos 6. Propriedades
físicas. I. Título.

*Dedico aos meus pais, José Carlos (em memória) e Izilda, que nunca mediram esforços pra
que eu realizasse meus sonhos e ao meu marido Fausto, que desde o primeiro momento,
sempre me apoiou. Amo muito vocês!*

Agradecimentos

Sempre ao final de uma etapa tão importante é comum olharmos pra trás e vemos tudo o que passamos, vemos o quanto crescemos, o quanto rimos e o choramos, mas conseguimos ver também tudo o que conquistamos. Uma lição importante que fica é por mais competentes que sejamos, é impossível fazer qualquer coisa sozinho. Nada, do que temos, ou somos, foi conquistado sozinho, já dizia Tom Jobim:- É impossível ser feliz sozinho! E por isso que é tão importante agradecer.

Agradeço à Deus pela vida e principalmente por todas as oportunidades que Ele colocou e continua colocando em meu caminho, e por me conceder a graça de concluir mais essa etapa em minha vida: - Obrigado Senhor!

Agradeço ao meu pai, José Carlos (presente e não só na memória, mas no coração) e minha mãe Izilda, pelo amor incondicional, e por terem sempre acreditado e me apoiado em todas as decisões. Sem vocês nada disso seria possível.

Ao meu amado marido Fausto, pelo companheirismo, apoio, paciência, amor, enfim por TUDO. Você SEMPRE me deu segurança nos momentos mais difíceis e isso fez toda diferença.

Ao meu orientador Paulo José do Amaral Sobral, pela oportunidade, por todos os ensinamentos, puxões de orelha, paciência e prestatividade em me ajudar ao longo do projeto. Para mim, é sem sombra de dúvida um privilégio poder trabalhar com uma pessoa tão generosa e tão brilhante.

Agradeço às Profas Dra Catarina Abdalla Gomide, Dra. Izabel Cristina Freitas de Moraes e Dra Rosemary Aparecida de Carvalho, pelo apoio, atenção, generosidade e por todas as contribuições, tanto na parte profissional, como também na parte pessoal.

Às técnicas Ana Monica, Ednelí, Roseli e a pós-doutoranda Noemi, por toda a colaboração no andamento do projeto, pela disponibilidade em ajudar sempre e pelas muitas conversas e conselhos.

Aos estagiários do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA): Leandro Remédio, Caio Taliani, Patricia Costa, Alessandra Amorim, Samira Nassar, Liliam Sacanecchia, Carolina Itioka, Heloisa Moreira e Victor Vieira, obrigada por toda ajuda ao longo desse trabalho.

A minha amiga, irmã que meu coração escolheu, Luana Gomes Alves, por mais longe que estejamos, essa distância física não é páreo, para os nosso vinte e tantos anos de amizade, você sempre será parte da minha história. Amo muito você, obrigada por tudo!

Aos amigos, alguns estão longe, mas, sempre em meu coração: Guilherme Carneiro, Daniela Pereira, Romulo e Tábata Costa, Rafael Sanchez, Guilherme e Susana Costa, Giancarlo, Gislaine, Bruna Vendrusculo, Michele Corat, Fernanda Vanin, Marina Kokubo, Sirlei Carvalho, Melissa Selayim e Inez Lara, Deus me deu o privilégio de ter vocês em minha vida, mesmo com a distância e com nossa vida corrida, Vocês SEMPRE se fizeram presentes. O que posso dizer além de MUITO OBRIGADA?

Agradeço as duas pessoas, em especial, que me ensinaram muito nesses dois anos, e são exemplos de superação, força, garra e determinação, Débora Santos e Nayla Souki, obrigada por tudo!

Aos amigos da FZEA: Profa Dra Alessandra Lopes, Rosilda Loura, Carla (Kakau), Tiara Gomes, Josiane Borges, Camila Bittencourt, Keila Aracava, pelas conversas, risadas, conselhos e amizade.

Aos meus irmãos e cunhadas Carlos e Rozana, Gil e Carminha, Edson e Rosana, Cássio e Chris, Éder e Márcia, mesmo com nossas diferenças nos amamos e somos família, obrigada sempre!

Aos meus sobrinhos e amores da minha vida: Fellipe, Graciele, Lucas, Bruno, Fernanda, Tales, Debora, Rafael, Mariana, Lívia, Vinicius e Daniel. Agradeço simplesmente por vocês existirem.

À todos da seção de pós graduação pelo bom trabalho e disponibilidade em me auxiliar sempre. Muito obrigada!

Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia de Alimentos da FZEA, por toda colaboração ao longo desses anos.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pelo auxílio e informações prestadas.

Aos demais funcionários da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP) pela prestatividade.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado permitindo dedicação exclusiva ao projeto (Edital MCT nº70/2010).

À FAPESP, pelo do financiamento do projeto: Desenvolvimento de materiais biodegradáveis à base da proteína da torta de mamona, subproduto da cadeia agro-industrial do biodiesel (Proc. 2008/11341-5).

Por fim agradeço à todos que de alguma forma contribuíram com essa conquista.

Muito Obrigada!!!

Tu deviens responsable pour toujours de ce que tu as apprivoisé.(Le petit prince - Antoine de Saint-Exupéry).

Conceda-me Senhor, a serenidade necessária para aceitar as coisas que não posso modificar; coragem para modificar as que posso e sabedoria para distinguir umas das outras (Autor desconhecido).

*Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.
(Eclesiastes 3:1).*

Resumo

APARECIDA-MAKISHI, G.L. **Desenvolvimento de filmes à base de proteínas extraídas da torta de mamona (*Ricinus communis* L.) reticuladas com glutaraldeído e glioxal.** 2012. 139f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

O processo de extração do óleo de mamona gera, como subproduto, uma torta rica em proteínas, que tem sido utilizada como adubo e contra fitonematóide, devido à sua toxicidade. Entretanto, as proteínas da torta de mamona são ricas em aminoácidos que permitem modificação química com aldeídos bifuncionais, como o glutaraldeído e o glioxal, o que pode ser interessante para a produção de filmes biodegradáveis com propriedades físicas adequadas ao emprego na agricultura. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi a produção e caracterização de filmes à base de proteínas extraídas da torta de mamona e reticuladas com glioxal ou glutaraldeído e plastificados com glicerol. Especificamente, estudaram-se o efeito da concentração de proteína e do tipo de reticulante, e o efeito da concentração do reticulante sobre algumas propriedades dos filmes. Os filmes foram produzidos com uma técnica conhecida como tipo “casting”, que consiste na desidratação de uma solução filmogênica (SF). Os filmes foram submetidos a testes para determinação da umidade, espessura, propriedades mecânicas (testes de tração e perfuração), permeabilidade ao vapor de água, solubilidade em água, cor, opacidade, brilho, além da microestrutura, por microscopia eletrônica de varredura. A concentração da proteína e o tipo de reticulante não influenciaram a umidade, espessura, microestrutura e propriedades óticas. Mas, de maneira geral, os filmes produzidos com o glioxal apresentaram melhores propriedades mecânicas e menor solubilidade em água que aqueles produzidos com glutaraldeído, sendo que a concentração de 6g de proteínas/100g de SF foi a formulação que apresentou os melhores resultados para os testes de tração e de solubilidade em água. Este resultado é muito importante para o emprego

dos filmes na agricultura. Por outro lado, a concentração do glioxal não teve efeito sobre a umidade, espessura, propriedades óticas, microestrutura e nem sobre a permeabilidade ao vapor de água, influenciando apenas a solubilidade e as propriedades mecânicas. O teor de glioxal que proporcionou melhores propriedades mecânicas e baixa solubilidade em água foi de 5g/100g de proteínas. Filmes produzidos nessas melhores condições foram submetidos a análises complementares envolvendo testes de hidrofobicidade, propriedades térmicas, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, isoterma de sorção e biodegradabilidade. Finalmente, pode-se concluir que as proteínas da torta de mamona são capazes de formar uma matriz bem estruturada e que suas propriedades podem ser melhoradas com a adição de glioxal.

Palavras-chave: filmes biodegradáveis, biopolímeros, extração, modificação química, aldeídos, propriedades físicas.

Abstract

APARECIDA-MAKISHI, G.L. **Development of films based on proteins extracted from the castor bean cake (*Ricinus communis* L.) crosslinked with glutaraldehyde and glyoxal.** 2012. 139p. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

The extraction process of castor oil produces, as a co-product, a cake rich in proteins which has been used as a fertilizer and against plant parasitic nematode, because of its toxicity. However, the proteins of castor bean cake are rich in amino acids which allow chemical modification with bifunctional aldehydes such as glutaraldehyde and glyoxal. This may be interesting for the production of biodegradable films with adequate physical properties to the use in agriculture. The objective of this work was the production and characterization of films based on proteins extracted from the castor bean cake and crosslinked with glyoxal or glutaraldehyde and plasticized with glycerol. Specifically, we studied the effect of protein concentration and type of crosslinker and the effect of the crosslinker concentration on some properties of the films. The films were produced with a technique known as "casting", which consists of drying a film solution (FS). The films were tested for determination of moisture content, thickness, mechanical properties (tensile and puncture tests), water vapor permeability, water solubility, color, opacity, gloss, and the microstructure by scanning electron microscopy. The protein concentration and type of crosslinking did not affect the moisture content, thickness, microstructure and optical properties. But, in general, films made with glyoxal showed improved mechanical properties and lower water solubility than those produced using glutaraldehyde. And, the concentration of 6g proteins/100 g of FS was the formulation that presented the best results for the tensile tests and water solubility. This result is very important for the use of films in agriculture. Moreover, the concentration of glyoxal had no effect on the moisture content, thickness, optical properties, or on the microstructure

and permeability to water vapor, influencing only the solubility and mechanical properties. The concentration of glyoxal that provided the best mechanical properties and low water solubility of proteins was 5g/100g of gelatin. Films produced in the best conditions were subjected to further analyzes involving tests of hydrophobicity, thermal properties, spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, water vapor sorption isotherm and biodegradability. Finally, it can be concluded that the protein of castor bean cake are capable of forming a matrix structured and that their properties can be improved with the addition of glyoxal.

Keywords: biodegradable films, biopolymers, extraction, crosslinking, aldehydes, physical properties.

Lista de figuras

Figura 1: Diferentes empregos de plásticos na agricultura.	19
Figura 2: Exemplo do ciclo de vida de um biopolímero.	21
Figura 3: Aminoácidos não essenciais que compõem as proteínas.	22
Figura 4: Aminoácidos essenciais que compõem as proteínas.....	23
Figura 5: Estrutura química do glutaraldeído (a) e glioxal (b).....	26
Figura 6: Mamona (<i>Ricinus communis</i> L.).....	30
Figura 7: Semente de mamona.	31
Figura 8: Principal componente do óleo de mamona – ácido ricinoléico.	31
Figura 9: Torta de mamona.	32
Figura 10: (a) Estrutura tridimensional da ricina - em verde, a cadeia B; em vermelho, as α -hélices da cadeia A; em laranja, as folhas- β da cadeia A; em cinza, as alças da cadeia A.; (b) Estrutura química da ricinina.....	33
Figura 11: Reator para extração com controle digital de temperatura, pH e agitação.	37
Figura 12: Centrífuga refrigerada utilizada na separação do precipitado do sobrenadante.....	37
Figura 13: Liofilizador contendo o extrato proteico.	38
Figura 14: Determinação da cor do extrato proteico liofilizado.....	39
Figura 15: Elaboração das soluções filmogênicas.....	41
Figura 16: Dispersão da solução filmogênica e secagem dos filmes.	42
Figura 17: Determinação da espessura de uma amostra pra teste de tração.....	44
Figura 18: Testes de tração (a) e perfuração (b) dos filmes de proteínas extraídas da torta de mamona.	45
Figura 19: Agitador com amostras para teste de solubilidade.....	47
Figura 20: Determinação dos parâmetros de cor e opacidade para os filmes.	48
Figura 21: Glossímetro utilizado na análise de brilho dos filmes.	49
Figura 22: Goniômetro utilizado para o teste de hidrofobicidade (ângulo de contato).....	50
Figura 23: Imagens do teste de permeabilidade ao vapor de água (a) Célula para o teste de PVA e (b) dessecador contendo a célula para o teste de PVA	51
Figura 24: Microscópio eletrônico de varredura.	52
Figura 25: DSC TA 2010 utilizado nas análises térmicas.....	53
Figura 26: Filmes de torta de mamona acondicionados para elaboração da isoterma de sorção.	54
Figura 27: Espectrofotômetro FT-IR com amostra de filmes de torta de mamona.	55
Figura 28: Sólido de cores - Sistema CIELab (1976)	63
Figura 29: Extrato proteico liofilizado.	63
Figura 30: Micrografia do extrato proteico liofilizado (pH12).	64
Figura 31: Filmes elaborados com proteínas reticuladas com glutaraldeído.	66
Figura 32: Filmes elaborados com proteínas reticuladas com glioxal.	67
Figura 33: Micrografias das superfícies em contato com o ar de filmes com diferentes concentrações de proteínas reticuladas com glutaraldeído. Aumento de 1000x.....	70
Figura 34: Micrografias das superfícies em contato com a placa de filmes com diferentes concentrações de proteínas reticuladas com glutaraldeído. Aumento de 1000x.	71
Figura 35: Micrografias das superfícies em contato com o ar de filmes com diferentes concentrações de proteínas reticuladas com glioxal. Aumento de 1000x.....	72
Figura 36: Micrografias das superfícies em contato com a placa de filmes com diferentes concentrações de proteínas reticuladas com glioxal. Aumento de 1000x.	73
Figura 37: Solubilidade dos filmes de proteínas reticuladas com glutaraldeído.	84

Figura 38: Solubilidade dos filmes de proteínas reticuladas com glioxal.	84
Figura 39: Exemplos de curvas típicas de tração para filmes de diferentes concentrações de proteínas de torta de mamona reticuladas com glioxal (GX).....	85
Figura 40: Exemplos de curvas típicas de tração para filmes de diferentes concentrações de proteínas de torta de mamona reticuladas com glutaraldeído (GT).	86
Figura 41: Exemplos de curvas do teste de perfuração para filmes de diferentes concentrações de proteínas de torta de mamona reticuladas com glioxal (GX).	88
Figura 42: Exemplos de curvas do teste de perfuração para filmes de diferentes concentrações de proteínas de torta de mamona reticuladas com glutaraldeído (GT).	89
Figura 43: Filmes elaborados com proteínas reticuladas com glioxal em diferentes concentrações. ...	92
Figura 44: Micrografias das superfícies em contato com o ar dos filmes de proteínas reticuladas com glioxal em diferentes concentrações diferentes. Aumento de 1000x.	94
Figura 45: Micrografias das superfícies em contato com a placa dos filmes de proteínas reticuladas com glioxal em diferentes concentrações diferentes. Aumento de 1000x.	95
Figura 46: Micrografias das criofraturas dos filmes EPL reticulado com glioxal em diferentes concentrações. Aumento de 2000x.....	96
Figura 47: Etapas do teste de solubilidade para filmes de proteínas de torta de mamona.	102
Figura 48: Exemplos de curvas de tração – efeito de concentração de glioxal (GX).....	107
Figura 49: Exemplos de curvas de perfuração – efeito de concentração de glioxal (GX).	109
Figura 50: Esquema das concentrações dos reagentes para obtenção do filme referente à melhor formulação.....	113
Figura 51: Micrografias da ruptura do teste de tração do filme da torta de mamona.....	113
Figura 52: Ângulo de contato entre a gota e a superfície do sólido.	114
Figura 53: O efeito de uma gota de água em equilíbrio com uma superfície de alta energia e uma superfície de baixa energia (variação do ângulo e do volume das gotas).	115
Figura 54: Imagens do formato das gotas capturadas para superfície em contato com a placa e ar. ..	116
Figura 55: Isoterma de sorção do filme produzido com proteínas reticuladas com glioxal (6g de proteína/100g de SF; 5g de glioxal/100g de proteínas; 25g de glicerol/100g de proteínas).	117
Figura 56: Curvas de DSC do filme de proteína de torta de mamona: — primeira varredura. --- segunda varredura.	119
Figura 57: Espectro infravermelho do filme de proteínas de mamona (formulação otimizada).	121
Figura 58: Filmes em vários estágios do teste de biodegradabilidade.	123
Figura 59: Gráfico de acompanhamento da biodegradabilidade (<i>indoor</i>) do filme de EPL.	124
Figura 60: Filmes em algumas semanas do teste de biodegradabilidade.	125
Figura 61: Filmes na 11ª semana do ensaio de biodegradabilidade (<i>indoor</i>).	125

Lista de tabelas

Tabela 1: Composição da torta de mamona segundo vários autores.....	34
Tabela 2: Composição bromatológica da torta de mamona segundo vários autores.....	34
Tabela 3: Composição em aminoácidos na torta de mamona destoxicada.....	35
Tabela 4: Quantidade em g de SF por placa de acordo com o teor de proteínas.....	42
Tabela 5: Características da terra vermelha ⁽¹⁾ utilizada nos testes de biodegradabilidade.	56
Tabela 6: Composição centesimal (%) do extrato proteico liofilizado.	57
Tabela 7: Composição de aminoácidos das proteínas extraídas da torta de mamona, ervilha, tremço e soja.	61
Tabela 8: Parâmetros do sistema CIELab para o EPL de mamona e o CPL de cupuaçu.....	62
Tabela 9: Resultados para espessura dos filmes produzidos com proteínas modificadas com glutaraldeído (GT) e glioxal (GX).	68
Tabela 10: Valores dos parâmetros L*, a* e b* de amostras de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glutaraldeído e glioxal – contato com a placa.....	75
Tabela 11: Valores dos parâmetros ΔE^* e opacidade de amostras de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glutaraldeído e glioxal – contato com a placa.....	76
Tabela 12: Valores dos parâmetros L*, a* e b* de amostras de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glutaraldeído e glioxal - contato com o ar.....	77
Tabela 13: Valores dos parâmetros ΔE^* e opacidade de amostras de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glutaraldeído e glioxal - contato com o ar.....	78
Tabela 14: Valores de brilho amostras de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glutaraldeído e glioxal - contato com a placa.....	81
Tabela 15: Valores de brilho amostras de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glutaraldeído e glioxal - contato com o ar.....	81
Tabela 16: Valores umidade e solubilidade em água de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glutaraldeído e glioxal.	83
Tabela 17: Valores de tensão na ruptura (TR), elongação na ruptura (ER) e módulo de elasticidade (ME) de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glutaraldeído e glioxal.	87
Tabela 18: Valores de força na perfuração e deformação na perfuração de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glutaraldeído e glioxal.....	89
Tabela 19: Resultados para espessura dos filmes produzidos com proteínas modificadas com diferentes concentrações de glioxal (GX).....	93
Tabela 20: Valores dos parâmetros L*, a* e b* para as superfícies em contato com a placa e com o ar de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glioxal.....	98
Tabela 21: Valores dos parâmetros DE e opacidade para as superfícies em contato com a placa e com o ar de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glioxal.	99
Tabela 22: Valores de brilho (20° e 60°GU) para as superfícies em contato com a placa e com o ar de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glioxal.	100
Tabela 23: Valores de umidade e solubilidade em água dos filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glioxal em diferentes concentrações.	101
Tabela 24: Valores de permeabilidade e taxa de permeação dos filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glioxal em diferentes concentrações.	104
Tabela 25: Valores de tensão na ruptura, elongação na ruptura e módulo de elasticidade de filmes de proteínas modificadas com glioxal em diferentes concentrações.....	107
Tabela 26: Valores de força na perfuração e deformação na perfuração de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glioxal em diferentes concentrações.	110

Tabela 27: Caracterizações dos filmes elaborados com a melhor formulação.....	112
Tabela 28: Valores de ângulo de contato (θ) para superfícies placa (θ_{PL}) e ar (θ_{AR}) e seus respectivos tempos.	115
Tabela 29: Coeficientes para as isotermas de sorção dos filmes de proteínas da torta de mamona, gelatina e glutenina, todas reticuladas com glioxal.....	118

Sumário

1. Introdução	15
2. Objetivos	17
3. Revisão bibliográfica.....	18
3.1. Emprego de plásticos na agricultura	18
3.2. Filmes biodegradáveis à base de biopolímeros	20
3.3. Filmes de proteínas com modificação química	24
3.4. Filmes à base de proteínas oriundas de tortas residuais e fontes não convencionais	27
3.5. Proteínas de torta de mamona	29
4. Materiais e Métodos	36
4.1. Materiais.....	36
4.2. Extração das proteínas.....	36
4.3. Elaboração dos filmes	40
4.4. Caracterização dos filmes.....	43
4.4.1. Espessura	43
4.4.2. Propriedades mecânicas	44
4.4.3. Umidade e Solubilidade em água	46
4.4.4. Cor e Opacidade	47
4.4.5. Brilho.....	48
4.4.6. Hidrofobicidade (Determinação do ângulo de contato)	49
4.4.7. Permeabilidade ao vapor de água.....	50
4.4.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	51
4.4.9. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	52
4.4.10. Isoterma de sorção.....	53
4.4.11. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	54
4.4.12. Biodegradabilidade no solo (<i>Indoor</i>)	55
4.5. Análise estatística.....	56
5. Resultados e Discussões.....	57
5.1. Caracterização do extrato proteico liofilizado (EPL).....	57
5.1.1. Composição centesimal e teor de aminoácidos	57
5.1.2. Determinação de cor e microestrutura do EPL.....	62
5.2. Estudo do efeito da concentração de proteína e do tipo de reticulante: glutaraldeído e glioxal	65
5.2.1. Aspecto visual	65
5.2.2. Espessura	68

5.2.3.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	69
5.2.4.	Propriedades óticas.....	74
5.2.4.1.	<i>Cor e Opacidade</i>	74
5.2.4.2.	<i>Brilho</i>	80
5.2.5.	Umidade e Solubilidade em água.....	82
5.2.6.	Propriedades Mecânicas	85
5.2.6.1.	<i>Testes de Tração</i>	85
5.2.6.2.	<i>Testes de perfuração</i>	88
5.3.	Estudo do efeito da concentração do glioxal sobre as propriedades físicas dos filmes.....	91
5.3.1.	Aspecto visual	91
5.3.2.	Espessura.....	93
5.3.3.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	93
5.3.4.	Propriedades óticas.....	97
5.3.4.1.	<i>Cor e Opacidade</i>	97
5.3.4.2.	<i>Brilho</i>	99
5.3.5.	Umidade e Solubilidade em água.....	101
5.3.6.	Permeabilidade ao vapor de água (PVA)	104
5.3.7.	Propriedades Mecânicas	106
5.3.7.1.	<i>Testes de tração</i>	106
5.3.7.2.	<i>Testes de perfuração</i>	109
5.4.	Caracterização dos filmes produzidos com a melhor formulação.....	112
5.4.1.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	113
5.4.2.	Hidrofobicidade (Determinação do ângulo de contato)	114
5.4.3.	Isoterma de sorção.....	117
5.4.4.	Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	118
5.4.5.	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	121
5.4.6.	Biodegradabilidade (<i>Indoor</i>)	123
6.	Conclusões	127
7.	Perspectivas para trabalhos futuros	129
8.	Referências Bibliográficas	130

1. Introdução

A preocupação com as políticas ambientais e com os princípios de sustentabilidade tem sido amplamente difundida nas últimas décadas. Além disso, o esgotamento dos recursos petrolíferos, matéria prima dos polímeros sintéticos, aliada ao aumento do rigor da legislação ambiental, tem impulsionado os estudos que visam a obtenção de materiais “verdes” para serem empregados em substituição aos plásticos (MOHANTY et al., 2005b).

A utilização dos plásticos não é somente voltada à produção de embalagens em geral. Na agricultura seja ela intensiva ou extensiva esses materiais são amplamente utilizados na cobertura de solos (“mulching”), em estufas para crescimento e em sacos ou tubetes para mudas (KAPANEN et al., 2008).

Segundo Kapanen et al. (2008) o consumo mundial de plásticos na agricultura chega à 1,3 milhão de toneladas/ano. Após o uso, estes plásticos são classificados como resíduos podendo ser dispostos de diferentes maneiras. Mas, a maioria é incinerada gerando poluentes atmosféricos.

Uma alternativa ao uso desses materiais que tem sido estudada são os filmes à base de biopolímeros. Os biopolímeros são macromoléculas de origem biológica. Esses materiais, além de serem biodegradáveis, são de fontes renováveis, pois são produzidos na agricultura e/ou agroindústria. Dentre os principais biopolímeros estudados para o desenvolvimento de filmes, estão os polissacarídeos (ex: amido, quitosana, pectina, gomas em geral, entre outros) e as proteínas (ex.: glúten, zeína, proteínas do soro do leite, colágeno, gelatina, proteínas provenientes de tortas residuais, entre outras) (KROCHTA, 2002; TORRES, 1994).

Dentre as alternativas mencionadas, a utilização de proteínas provenientes de tortas residuais ainda é pouco explorada. Essas tortas são provenientes das indústrias produtoras de óleos como soja, girassol, canola e mamona, independente do tipo de extração. As proteínas oriundas de tortas residuais da extração de óleo são utilizadas, em sua maioria, como

suplemento alimentar animal ou humano e fertilizantes devido ao seu alto teor de proteínas (BARBOSA et al., 2007).

No Brasil, desde o lançamento do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNBP) pelo Governo Federal, intensificam-se as pesquisas na área de transformação de óleos vegetais e animais em biodiesel. Com isso, a mamona começou a ser altamente cotada como uma das fontes de matéria-prima para a produção do biodiesel (MADAIL; BELARMINO; NEUTZLING, 2007).

Da extração do óleo de mamona têm-se como co-produto a torta, rica em nitrogênio, fósforo e potássio e que pode ser utilizada na recuperação de solos desgastados e o farelo, que é obtido após a desativação das principais substâncias alergênicas e tóxicas, sendo usado como composto na ração animal (COSTA, H. et al., 2004; SAVY FILHO, 2005).

Avaliando-se as proteínas da torta de mamona, (globulinas, albuminas, proteases, gluteninas, proteínas conjugadas e compostos nitrogenados não proteicos), pode-se sugerir que se trata de boa matéria prima para a produção de material biodegradável, já que vários desses materiais tem sido desenvolvidos com proteínas de frações similares (SEVERINO, 2005; THARANATHAN, 2003).

Além disso, as proteínas provenientes da torta de mamona apresentam em sua composição, aminoácidos, como a arginina, histidina e lisina que favorecem a modificação química, como a reticulação com aldeídos, a fim de melhorar as propriedades físicas desses materiais, viabilizando assim o emprego desses biomateriais na agricultura (BELTRÃO, 2003; MARQUIÉ; GUILBERT, 2002).

2. Objetivos

Assim, o objetivo geral deste trabalho foi a produção e caracterização de filmes à base de proteínas extraídas da torta de mamona e reticuladas com glicoxal e glutaraldeído e plastificados com glicerol.

Os objetivos específicos foram:

1. Avaliação do efeito da concentração de proteína e do tipo de reticulante na microestrutura, cor, opacidade, brilho, umidade, solubilidade e propriedades mecânicas (tração e perfuração);
2. Avaliação do efeito da concentração do reticulante na microestrutura, cor, opacidade, brilho, umidade, solubilidade, permeabilidade ao vapor de água e propriedades mecânicas (tração e perfuração);
3. Caracterização do filme produzido a partir da formulação com as melhores propriedades, além das propriedades já avaliadas, estudou-se ainda a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, as propriedades térmicas, biodegradabilidade no solo, isoterma de sorção e hidrofobicidade.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Emprego de plásticos na agricultura

A busca de uma vida mais saudável aumentou não só o consumo de frutas, vegetais e hortaliças, como influenciou diretamente no tipo de produção desses alimentos. A demanda por esses produtos gerou no mercado a necessidade de encontrar alimentos frescos durante todo ano fazendo com que o setor agrícola se especializasse buscando alternativas para atender as necessidades dos consumidores (BATALHA, 2001).

O plástico foi o principal aliado dos agricultores nessa mudança de perfil, isso devido a sua ampla utilização na agricultura intensiva. O plástico está presente nos túneis, estufas, “mulching” e sacos para mudas (Figura 1). As estufas são construções altas feita de madeira ou pré-fabricada em metal e revestida de plástico aditivado. Dentro, cria-se um ambiente controlado que favorece o desenvolvimento de plantas o ano inteiro. São usadas na produção de flores, hortaliças e mudas (POLIAGRO, 2006).

Os túneis podem ser de dois tipos: o túnel baixo possui a mesma finalidade da estufa, no entanto, trata-se de uma construção baixa ($0,60 < \text{altura} < 1,00\text{m}$), feita com arcos de ferro ou madeira de formato semi-circular onde se cultiva plantas de pequeno porte como alface e morango, e o túnel alto que é usado para cultivar hortaliças de porte alto como pimentão e tomate e sua altura fica entre 3 e 4m (POLIAGRO, 2006).

Ainda de acordo com Poliagro (2006), o “mulching” é o revestimento do canteiro com filme plástico para proteger o solo e o sistema radicular das plantas e assim desenvolver determinadas influências nos cultivos. Como a forração plástica evita a lixiviação do solo pelas chuvas, economiza nutrientes, segura a umidade, melhora a amplitude térmica e mantém os frutos limpos. A produção aumenta consideravelmente e há melhoria da qualidade e precocidade de colheita.

A utilização de sacos ou tubetes para as mudas permite a formação de mudas saudáveis e bem desenvolvidas, o que por consequência possibilita que a planta tenha grandes chances de ter uma boa produtividade. As mudas normalmente são produzidas em saquinhos de polietileno opaco e dotados de orifícios de dreno ou em tubetes (RICCI; NEVES, 2006).

Após o uso, esses plásticos são classificados como resíduos e podem ser eliminados de diferentes maneiras, podendo ser colocados em aterros sanitários, queimados e reciclados. No entanto, a reciclagem desses plásticos não se dá de forma convencional, pois antes do processo de reciclagem eles devem ser lavados várias vezes para que não fique nenhum resquício de terra, pesticidas e adubos. Sendo assim, o gasto excessivo de água inviabiliza a reciclagem desses materiais. A queima também não é considerada como uma forma ecológica de descarte devido a produção de gases poluentes. Além disso, os plásticos são produzidos a partir do petróleo, que é uma matéria-prima não renovável (BRIASSOULIS, 2005; KAPANEN et al., 2008).

Estufa

Cobertura de solo

Sacos para mudas

Túnel

Figura 1: Diferentes empregos de plásticos na agricultura.

Fonte: PLANT TEC, 2012; ASTERPLAS, 2012.

Visando a sustentabilidade das práticas agrícolas e a superação dos problemas de eliminação dos resíduos gerados pelos plásticos convencionais, o uso de biopolímeros surge como uma boa alternativa. Os estudos voltados à produção desses materiais são um campo emergente da ciência. Existem inúmeras pesquisas que apresentam os biopolímeros como alternativa à substituição dos polímeros sintéticos (BRIASSOULIS, 2005; LI; LAROCK,

2005; KAPANEN et al., 2008; KROCHTA, 2002; SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010; THARANATAN, 2003; TORRES, 1994).

3.2. Filmes biodegradáveis à base de biopolímeros

Os biopolímeros são macromoléculas produzidas por sistemas biológicos. Os filmes à base de biopolímeros são total ou parcialmente elaborados a partir de matérias-primas renováveis, sendo que sua característica mais importante é a biodegradabilidade (KAPANEN et al., 2008; THARANATAN, 2003).

De acordo com Chandra e Rustgi (1998), a biodegradação é um processo natural pelo qual produtos químicos orgânicos no ambiente são convertidos em compostos mais simples, mineralizados e redistribuídos através de ciclos elementares tais como: ciclos de carbono, nitrogênio e enxofre (Figura 2).

Os primeiros filmes à base de biopolímeros manufaturados foram provenientes de recursos de biomassa (ossos de animais, chifres e cascos). Contudo, o desenvolvimento da indústria petroquímica por volta dos anos 30, implicou diretamente na substituição destes por polímeros sintéticos (SOUZA; DITCHFIELD; TADINI, 2010).

Inicialmente, os estudos envolvendo polissacarídeos estavam focados no amido e celulose (CHANDRA; RUSTGI, 1998). Atualmente as pesquisas estão buscando polissacarídeos mais complexos com unidades monoméricas diferentes gerando inúmeras possibilidades de interação tornando a matriz mais coesa (ARVANITOYANNIS, 2002; HUANG; YU; XIAO, 2006; MOE et al., 1995).

Figura 2: Exemplo do ciclo de vida de um biopolímero.

Fonte: Adaptado de Mohanty et al. (2005a)

Os filmes produzidos com proteínas apresentam, de forma geral, propriedades funcionais superiores aos filmes elaborados com polissacarídeos. As proteínas são macromoléculas complexas que constituem 50% ou mais da massa seca das células vivas. As propriedades funcionais das proteínas dependem de suas propriedades físicas e químicas, estas propriedades podem ser modificadas por agentes físicos, químicos e biológicos, nos processos de obtenção ou isolamento das proteínas, o tipo de extração empregado, a temperatura, o pH, a força iônica, as condições de secagem e estocagem da proteína isolada (ARVANITOYANNIS, 2002; CHANDRA; RUSTGI, 1998; CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1985; CUQ et al., 1997; NORDE, 2003; SGARBIERI, 1996; THARANATHAN, 2003).

Apesar dos diferentes tipos de proteínas encontradas, todas as estruturas são polímeros específicos com arranjos regulares dos 21 aminoácidos (Figuras 3 e 4). Esses aminoácidos se dividem em aminoácidos não essenciais, que são aqueles que podem ser sintetizados pelo organismo humano, e os aminoácidos essenciais sendo aqueles que não podem ser sintetizados pelo organismo humano (CHANDRA; RUSTGI, 1998; CUQ et al., 1997; SGARBIERI, 1986).

Figura 3: Aminoácidos não essenciais que compõem as proteínas.

Fonte: Adaptado de Cheftel, Cuq e Lorient (1985) e Sgarbieri, (1986).

Figura 4: Aminoácidos essenciais que compõem as proteínas.

Fonte: Adaptado de Cheftel, Cuq e Lorient (1985) e Sgarbieri, (1986).

As propriedades físico-químicas, tais como a solubilidade, carga, e reatividade química, são dependentes da natureza química do grupo lateral da cadeia. A proteína pode ser classificada em quatro estruturas: primárias, secundárias, terciárias, e quaternárias. A estrutura de uma proteína é importante e afeta a direção da modificação da proteína por meio de enzimas e produtos químicos (MOHANTY et al., 2005b).

Estudos sobre desenvolvimento de filmes à base de proteínas têm sido realizados com fontes proteicas de diversas origens, no entanto a maioria das proteínas utilizadas são produzidas industrialmente, às vezes com qualidade analítica, e encontradas comercialmente.

Em relação às proteínas de origem vegetal, podem-se encontrar trabalhos sobre filmes a base de glúten, de zeína, de proteínas de soja, da proteína do arroz, de proteínas de pistache e de ervilha. Esses filmes apresentaram características típicas de filmes à base de biopolímeros com plastificantes higroscópicos, ou seja, alta elasticidade, baixa resistência mecânica e alta permeabilidade ao vapor de água (AYRANCI; ÇETIN, 1995; CHOI; HAN, 2001; GUEGUEN et al., 1998; JANGCHUD; CHINNAN, 1999; KROCHTA, 2002; LIU; TELLEZ-GARAY; CASTELL-PEREZ, 2004; MARQUIÉ et al., 1995; ORLIAC et al., 2003; RHIM et al., 1998; SHIH, 1996; TORRES, 1994).

Além disso, a elevada sensibilidade à umidade relativa pode causar grandes mudanças devido ao caráter higroscópico do material, isto é, as propriedades do material podem variar drasticamente em função da absorção/dessorção de umidade do ambiente, uma vez que as moléculas de água têm um importante efeito plastificante em biopolímeros (JANGCHUD; CHINNAN, 1999; LIU; TELLEZ-GARAY; CASTELL-PEREZ, 2004; ORLIAC et al., 2003; RHIM et al., 1998).

Ainda que as proteínas possuam afinidade por água, elas podem ser consideradas boas matérias-primas para a produção de filmes. Além disso, ressalta-se que a variada composição de aminoácidos permite que algumas reações sejam induzidas a fim de melhorar as propriedades mecânicas, barreira e resistência à água, como por exemplo, a modificação química (BOURTOOM, 2009; CUQ et al., 1997; MARQUIÉ et al., 1995).

3.3. Filmes de proteínas com modificação química

O grande número de grupos reativos presentes nas proteínas fazendo parte da cadeia proteica permite certas modificações químicas, como reticulação com agentes químicos, possibilitando-se assim, a produção de materiais com melhores propriedades mecânicas (HERNÁNDEZ-MUÑOZ; VILLALOBOS; CHIRALT, 2004; ORLIAC et al., 2002).

Entretanto, o grau de reticulação depende da reatividade dos constituintes da proteína e da especificidade do agente modificador (WONG; WONG, 1992). A habilidade de sofrer modificações depende largamente da composição de aminoácidos, da sequência e da localização individual dos aminoácidos reativos na estrutura tridimensional da molécula (MEANS; FEENEY, 1971).

Os agentes utilizados na reticulação possuem peso molecular inferior ao peso molecular da cadeia principal e normalmente apresentam grupos funcionais reativos que formam pontes entre cadeias poliméricas adjacentes conduzindo à formação de uma rede tridimensional (COSTA Jr; MANSUR, 2008).

Esses agentes podem ser basicamente classificados como monofuncionais, que possuem um único tipo de grupo funcional reativo, ou homobifuncionais, que são compostos por dois grupos funcionais reativos idênticos, sendo que ambos reagem com os grupos laterais dos aminoácidos da cadeia. Além desses, existem também os heterobifuncionais que possuem dois grupos funcionais com diferentes especificidades e, ainda, como reagentes de comprimento zero que se comportam de maneira similar aos monofuncionais (COSTA Jr; MANSUR, 2008; WONG; JAMESON, 1991a,b; WONG; WONG, 1992).

A reticulação utilizando aldeídos normalmente é obtida utilizando-se um excesso do agente reticulante que satura a superfície da matriz proteica formando ligações covalentes entre o grupo amino e o grupo aldeído terminal, sendo que essas ligações são irreversíveis e resistem à extremos de pH e temperatura. A qualidade da reticulação precisa ser avaliada quanto às variáveis concentração, tempo de contato, temperatura e pH (BEPPU; ARRUDA; SANTANA, 1999; MARQUIÉ, 2001).

O glutaraldeído (Figura 5a) é um agente reticulante homobifuncional normalmente usado na formação de redes de polipeptídios e proteínas, apresenta reações mais específicas do que o formaldeído. As reações, que podem implicar em melhora significativa das

propriedades mecânicas e de barreira, ocorrem facilmente em meios alcalinos, tendo como grupos funcionais reativos resíduos de lisina, cistina, histidina e tirosina (Figuras 3 e 4) (BEPPU et al., 2007, COSTA Jr; MANSUR, 2008; HERNÁNDEZ-MUÑOZ; VILLALOBOS; CHIRALT, 2004, MARQUIÉ, 2001).

Figura 5: Estrutura química do glutaraldeído (a) e glioxal (b)

Fonte: Adaptado de Marquié (2001) e Oliveira et al. (2009).

Uma alternativa, ainda não muito explorada, é o glioxal (Figura 5b) que é um agente reticulante heterobifuncional. Em relação ao glutaraldeído, o glioxal apresenta uma menor toxicidade e volatilidade (HERNÁNDEZ-MUÑOZ; VILLALOBOS; CHIRALT, 2004; ZHANG et al., 2006). Segundo Gupta e Jabrail (2006), quando utilizado visando melhoria nas propriedades de barreira, o glioxal apresenta melhores resultados que o glutaraldeído. No entanto, o glioxal é capaz de reagir somente com a arginina e a lisina (Figuras 3 e 4) em pH alcalino. Mas ainda assim, sua utilização como agente reticulante tem sido cada vez mais estudada (HERNÁNDEZ-MUÑOZ; VILLALOBOS; CHIRALT, 2004; MARQUIÉ, 2001; ZHANG et al., 2006).

Marquié et al. (1995) observaram aumento na resistência dos filmes com o emprego do glutaraldeído para filmes produzidos a partir de proteínas extraídas do caroço de algodão. Galletta et al. (1998), em experimentos com proteína do soro de leite, também conseguiram uma aumento significativo nas propriedades termomecânicas e mecânicas. Além desses,

podem-se citar Rhim et al. (1998), trabalhando com isolado proteico de soja, e Orliac et al. (2002), com isolado proteico de girassol, sendo que em ambos trabalhos, os aldeídos bifuncionais promoveram melhoria nas propriedades mecânicas e de barreira.

3.4. Filmes à base de proteínas oriundas de tortas residuais e fontes não convencionais

A produção de filmes proteicos abriu um novo horizonte para aproveitamento dos resíduos de produtos de origem vegetal ricos em proteínas, como por exemplo, as tortas provenientes da extração dos óleos. As proteínas de origem vegetal obtidas desses resíduos mostraram não só capacidade de formar filmes, mas também apresentam plasticidade e elasticidade (AYHLLON-MEIXUEIRO; VACA-GARCIA; SILVESTRE, 2000; GAO et al., 2005; GAO et al., 2006; WÄSCHE et al., 1998).

A crescente atenção para o biodiesel implicou diretamente no aumento da disponibilidade de algumas tortas residuais, como: tortas de girassol (AYHLLON-MEIXUEIRO; VACA-GARCIA; SILVESTRE, 2000; ORLIAC et al., 2002, ORLIAC et al., 2003; ROUILLY et al., 2006; SALGADO et al., 2010), soja (CHO; RHEE, 2004; DENAVI et al., 2009; MAURI; AÑON, 2006; 2008), colza (WÄSCHE et al., 1998), algodão (MARQUIÉ et al., 1995; MARQUIÉ et al. 1997; MARQUIÉ, 2001), e pinhão manso (LESTARI; MULDER; SANDERS, 2011).

Além disso, existem pesquisas que envolvem tortas proteicas de óleos não tão convencionais, como é o caso da torta de abóbora (POPOVIĆ et al., 2010; POPOVIĆ et al., 2011; POPOVIĆ et al., 2012), além de proteínas de cereais, como o sorgo (BUFFO; WELLER; GENNADIOS, 1997; GAO et al., 2005; GAO et al., 2006).

Esses estudos utilizaram, em sua maioria, extração em pH básico, variando entre 7,5 a 11, utilizando o hidróxido de sódio como agente alcalinizante. A solubilização das proteínas

foi sempre seguida de centrifugação e abaixamento do pH (HCl ou H₂SO₄), até o respectivo ponto isoelétrico de cada proteína, visando a precipitação (AYHLLON-MEIXUEIRO; VACA-GARCIA; SILVESTRE, 2000; CHO; RHEE, 2004; LESTARI; MULDER; SANDERS, 2011; MAURI; AÑON, 2006; 2008; POPOVIĆ et al., 2010; POPOVIĆ et al., 2011; POPOVIĆ et al., 2012; WÄSCHE et al., 1998).

A diferenciação dos procedimentos está principalmente na maneira de secar o isolado proteico obtido. Em se tratando de isolado proteico de girassol, Ayhllon-Meixueiro, Vaca-Garcia e Silvestre (2000) optaram por secagem *overnight* à 50°C, já, Rouilly et al. (2006) e Salgado et al. (2010) utilizaram um *spray dryer*, e Orliac et al. (2002, 2003) secaram em estufa à 40°C por 48 horas. Wäsche et al. (1998) também realizaram a secagem do isolado proteico de colza em *spray dryer*.

Com relação ao isolado proteico de soja produzido em laboratório, observou-se que em todos os trabalhos, a liofilização foi escolhida como método de secagem (CHO; RHEE, 2004; DENAVI et al., 2009; MAURI; AÑON, 2006; 2008).

Existem ainda os trabalhos que extraem as proteínas com álcoois. Este foi o método utilizado para as proteínas do sorgo. Buffo, Weller e Gennadios (1997) utilizaram massa de sorgo desengordurada que foi colocada em etanol (95%) e homogeneizada com um ultra-agitador. Depois, a mistura foi filtrada à vácuo e a solução aquosa foi refrigerada à -5°C para facilitar a precipitação. A kafirina foi recuperada por centrifugação e lavada com água destilada para eliminar possíveis resíduos de etanol, sendo em seguida seca em uma estufa convencional à 50°C.

Gao et al. (2005) trabalharam com o mesmo tipo de extração de Buffo, Weller e Gennadios (1997), contudo, utilizaram o álcool tert-butílico além do etanol e a secagem foi realizada à 40°C em estufa de circulação forçada. Gao et al. (2006) seguiram o mesmo protocolo.

Ainda considerando a extração alcalina, existem trabalhos que utilizam a trietilamina (TEA) como agente alcalinizante. A extração ocorreu da mesma maneira que para o hidróxido de sódio, ou seja, as proteínas foram solubilizadas e em seguida, centrifugadas recuperando-se desta forma o sobrenadante. Entretanto, o sobrenadante não foi submetido à nenhum processo de secagem, sendo utilizado diretamente na produção dos filmes (MARQUIÉ et al. 1995. MARQUIÉ et al., 1997; MARQUIÉ, 2001).

A possibilidade de empregar a solução proteica na produção dos filmes, sem necessidade de precipitação das proteínas, ainda é pouco estudada, mas pode ser considerada como um fator de grande importância tecnológica. Isso porque, visando a produção dos filmes em escala industrial, é importante preconizar a diminuição de custos com reagentes e etapas.

Por outro lado, o armazenamento da solução requer maiores cuidados, portanto, uma alternativa seria a secagem ou liofilização do sobrenadante oriundo da centrifugação, produzindo assim, um extrato proteico.

3.5. Proteínas de torta de mamona

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma planta xérofila e heliófila, pertencente à família das Euforbiáceas. A planta tem origem provavelmente na África ou na Índia, e atualmente é cultivada em diversos países do mundo, sendo a Índia, a China e o Brasil, nesta ordem, os maiores produtores mundiais (MENDES, 2008; SAVY FILHO, 2005; VIEIRA NETO, 2008).

A mamona (Figura 6) é muito conhecida no Brasil, podendo ser encontrada desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul. Mas, é na região Nordeste que ela é mais popular. Devido à sua resistência à seca e sua sensibilidade ao encharcamento do solo, essas plantas encontram, nessa região, condições propícias para o pleno desenvolvimento (AMORIM NETO; ARAÚJO; BELTRÃO, 2001).

Figura 6: Mamona (*Ricinus communis* L.).

Fonte: MedQuímica (2010)

A semente da mamona (Figura 7) é rica em óleo, que possui várias aplicações industriais. Além da utilização na fabricação do biodiesel, ele é utilizado na fabricação de tintas, vernizes, cosméticos, sabões, plásticos, fibras sintéticas e lubrificantes (SANTOS et al., 2001).

O óleo de mamona quando comparado à maioria dos óleos vegetais possui características atípicas. A principal diferença está em sua composição química, pois, o óleo de mamona é composto por cerca de 90% de ácido ricinoléico (Figura 8). Esse ácido apresenta uma estrutura química particular onde estão presentes três grupos funcionais altamente reativos, permitindo que o óleo seja submetido a diversos processos químicos que acarretam em uma gama de diversos produtos (CANGEMI; SANTOS; CLARO NETO, 2010).

Figura 7: Semente de mamona.

Atualmente umas das aplicações do óleo de mamona de maior destaque, é seu emprego na produção do biodiesel, isso porque O Governo Federal, através da Lei 11.097 de 13/01/2005, determinou que até 2008 todo o óleo diesel consumido no Brasil deveria conter um percentual mínimo obrigatório de 2% de biodiesel e em 2008, esse percentual foi aumentado para 3% (BRASIL, 2005; ANP, 2008).

Figura 8: Principal componente do óleo de mamona – ácido ricinoléico.

Fonte: Adaptado de Ogunniyi (2006)

O biodiesel de mamona é produzido por transesterificação, utilizando-se um álcool e uma substância alcalina como catalisador, e apresenta propriedades similares ao diesel (do petróleo). A reação de transesterificação gera dois produtos: o biodiesel e o glicerol, e um sub-produto: a torta de mamona. O glicerol é largamente empregado como matéria prima para

a indústria farmacêutica e de cosméticos, além de ser bastante utilizado com agente plastificante de filmes à base de biopolímeros (ALMEIDA et al., 2006; ANANDAN et al., 2005; OGUNNIYI, 2006; SEVERINO, 2005; SOBRAL et al., 2001).

A torta de mamona (Figura 9) é o principal subproduto da cadeia produtiva do óleo de mamona, produzida após a extração do óleo das sementes desta oleaginosa. Em todo o mundo, seu uso predominantemente tem sido como adubo orgânico, embora possa obter valor significativamente maior se utilizada como alimento animal, aproveitando o alto teor de proteínas. No entanto, este uso não tem sido possível, até o presente momento, devido à presença de toxinas (ricina e ricinina) e alergênicos (CB-1A, castor bean allergen-1) em sua composição (ANANDAN et al., 2005; SEVERINO, 2005).

Figura 9: Torta de mamona.

A ricina (Figura 10a) é uma proteína encontrada exclusivamente no endosperma das sementes de mamona e é o componente mais letal presente na torta de mamona. A concentração dessa proteína na torta é de 1,5%, e sua ingestão implica em problemas gastrointestinais e distúrbios neuromusculares podendo levar ao óbito (FREIRE, 2001; LIMA, 2007; MENDES, 2008).

Figura 10: (a) Estrutura tridimensional da ricina - em verde, a cadeia B; em vermelho, as α -hélices da cadeia A; em laranja, as folhas- β da cadeia A; em cinza, as alças da cadeia A.; (b) Estrutura química da ricinina.

Fonte: Lima (2007) e Leite et al. (2005).

A ricinina (Figura 10b) é um alcalóide que pode ser encontrado em todas as partes da planta, podendo ser detectado desde as fases iniciais de desenvolvimento (HOLFELDER et al, 1998). Segundo Leite et al. (2005), a contribuição da ricinina à toxicidade da torta é muito pequena por apresentar baixa atividade tóxica e estar presente em baixa concentração (0,23%).

A fração alergênica (CB-1A) da torta de mamona é um composto não tóxico, mas apresenta elevada ação alergênica. O CB-1A é um conjunto de glicoproteínas e está presente na baga (3 a 6%) (CANGEMI; SANTOS; CLARO NETO, 2010).

De acordo com Anandan et al. (2005), muitas técnicas foram estudadas a fim de eliminar tantos os componentes tóxicos, como o alergênico, no entanto até o presente momento não existe tecnologia viável industrialmente para tal processamento.

Segundo Costa, F. et al. (2004), a torta é um produto com elevado teor de proteínas, produzida na proporção de 1,2 toneladas para cada tonelada de óleo extraído. As Tabelas 1 e 2 mostram a composição bromatológica da torta de mamona de acordo com alguns estudos.

Tabela 1: Composição da torta de mamona segundo vários autores

Fração	Teor¹ (%)	Teor² (%)	Teor³ (%)	Teor⁴ (%)
Matéria-seca	91,50	91,17	92,52	93,3
Umidade	8,50	8,13	7,48	6,7

Fonte: ¹ Severino (2005); ² Costa, F. et al., (2004); ³ Beltrão (2003); ⁴ Ascheri et al., (2007).

Tabela 2: Composição bromatológica da torta de mamona segundo vários autores

Fração	Teor¹ (% em b.s)	Teor² (%) (% em b.s)	Teor³ (%) (% em b.s)	Teor⁴ (%) (% em b.s)
Proteína bruta	42,50	28,74	41,50	36,5
Fibra	20,04	ND	32,84	ND
Extrato etéreo	4,23	13,10	2,62	2,62
Cinzas	ND	12,11	7,65	9,96
Carboidratos	ND	ND	ND	44,9
Extrato não nitrogenado	ND	ND	7,91	ND
Cálcio	0,68	ND	ND	ND
Fósforo	0,78	3,00	ND	ND
Potássio	ND	0,96	ND	ND
Nitrogênio	ND	4,60	ND	ND

Fonte: ¹ Severino (2005); ² Costa, F. et al., (2004); ³ Beltrão (2003); ⁴ Ascheri et al., (2007) ND: não disponível.

Considerando-se que a proteína da torta de mamona é composta por 60% de globulinas, 16% de albuminas, 4% de proteases e 20% de glutelinas, proteínas conjugadas e compostos nitrogenados não-protéicos (SEVERINO, 2005), pode-se sugerir que se trata de boa matéria prima para produção de material biodegradável a base de proteínas, pois vários

desses materiais têm sido desenvolvidos com proteínas de frações similares (THARANATHAN, 2003).

Além disso, a composição de aminoácidos dessa proteína (Tabela 3), que é relativamente rica em arginina (11%), histidina (11%), lisina (3,1%), metionina (1,5%) (BELTRÃO, 2003) permite a realização de certas modificações químicas, como reticulação com aldeídos bifuncionais, possibilitando-se assim, a produção de material com melhores propriedades mecânicas. Mas, para isso, é necessário se conhecer a disponibilidade dos mesmos (MARQUIÉ, 2001; MARQUIÉ et al., 1997).

Tabela 3: Composição em aminoácidos na torta de mamona destoxicada.

Aminoácido	Teor (%) ¹	Teor (%) ²
Arginina	3,5	1,1
Cistina	0,4	3,5
Fenilalanina	1,8	4,2
Histidina	0,6	11
Isoleucina	1,9	5,3
Leucina	2,8	7,2
Lisina	0,7	3,1
Metionina	0,6	1,5
Tirosina	ND	1,0
Treonina	1,2	3,6
Triptofano	0,1	0,6
Valina	2,4	6,6

Fonte: ¹ Benesi (1979); ² Beltrão (2003).

4. Materiais e Métodos

4.1. Materiais

Para extração das proteínas foram utilizados a torta de mamona doada pela indústria A. Azevedo Ind. Com. de Óleos Ltda (Itupeva - SP) e o hidróxido de sódio (Synth) para o ajuste do pH.

A solução filmogênica (SF) foi elaborada a partir do extrato proteico liofilizado adicionado de glutaraldeído (Merck) e glioxal (Sigma). E como plastificante, foi utilizado o glicerol (Synth). O nitrato de magnésio (Nuclear) foi utilizado como controlador de umidade relativa.

4.2. Extração das proteínas

A extração das proteínas foi realizada por solubilização em meio alcalino (pH=12), utilizando hidróxido de sódio. O processo de extração foi realizado em reator com controle digital de temperatura, pH, agitação e capacidade de 5 litros, especialmente concebido para esse projeto (Figura 11).

A torta de mamona, na concentração de 20%, foi adicionada no reator contendo água à temperatura de 50 °C e solução de NaOH (10%). O tempo de extração foi de 30 minutos sob agitação constante de 400rpm.

Figura 11: Reator para extração com controle digital de temperatura, pH e agitação.

Em seguida, as soluções foram centrifugadas em uma centrífuga refrigerada (THERMOIEC, CENTRAGP8R, EUA), a 4000 rpm, por 20 minutos (MARQUIÉ et al., 1995). O sobrenadante foi liofilizado, após prévio congelamento em nitrogênio líquido, peneirado e, então, utilizado para produção dos filmes (Figuras 12 e 13).

Figura 12: Centrífuga refrigerada utilizada na separação do precipitado do sobrenadante.

Figura 13: Liofilizador contendo o extrato proteico.

Após a liofilização, o extrato proteico liofilizado (EPL) foi caracterizado segundo as metodologias a seguir:

a) Análises bromatológicas gerais - matéria seca, matéria mineral, proteína bruta (fator=6,25), fibra bruta, fibras em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), extrato etéreo (SILVA; QUEIROZ, 2002) e nitrogênio não proteico, de acordo com a AOAC (1995);

b) Composição de aminoácidos - a análise foi realizada segundo método de derivatização de aminoácidos em pré-coluna de fenilisotiocianato e cromatografia líquida de alta performance (JAOAC, 1989). Utilizando-se uma coluna C18 (250x4,6mm), detector UV-Visível ajustado em comprimento de onda de 254nm, fase móvel composta por dois eluentes diferentes, um contendo acetato de sódio, trietilamina, acetonitrila, EDTA, ácido acético glacial e o outro contendo acetonitrila e água. Como solução derivatizante foi utilizada o fenilisotiocianato (PITC).

c) Cor - a análise foi realizada diretamente no extrato proteico liofilizado utilizando-se uma célula de quartzo polido. A amostra foi colocada na célula e foi levemente compactada

com o auxílio de uma espátula evitando a formação de espaços vazios. Em seguida colocou-se a célula no equipamento Miniscan XE (HunterLab) (Figura 14). Foram realizadas seis medidas para cada replicata sendo que a cada medida a amostra foi misturada e novamente compactada. A cor foi determinada segundo Sobral et al. (2001), de acordo com os padrões dos CIELab, onde L^* , a^* , b^* .

Figura 14: Determinação da cor do extrato proteico liofilizado.

4.3. Elaboração dos filmes

Os filmes foram produzidos por secagem de soluções filmogênicas previamente preparadas. As soluções filmogênicas (SF) foram elaboradas de acordo com as concentrações estabelecidas em cada estudo:

1. Efeito da concentração de proteína e do tipo de reticulante – neste estudo, os filmes foram elaborados com extrato proteico liofilizado obtido à pH=12 em cinco concentrações diferentes: 2, 4, 6, 8 e 10g de proteína/100g de SF. Os agentes reticulantes (glutaraldeído e glioxal) foram adicionados em concentração fixa de 1g de reticulante/100g de proteínas, a concentração de glicerol foi de 25g de glicerol/100g de proteínas.
2. Efeito da concentração do reticulante – neste estudo foram fixados o tipo de agente reticulante (glioxal) e a concentração de proteínas (6g de proteínas/100g de SF). Foram estudadas oito concentrações diferentes de glioxal: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0 e 5,0g de glioxal/100g de proteínas. A concentração de plastificante foi mantida em 25g de glicerol/100g de proteínas;
3. Caracterização complementar do filme com as melhores propriedades – os filmes com as melhores propriedades mecânicas e menor solubilidade tiveram suas propriedades estudadas de forma mais abrangente. A SF foi elaborada com 6g de proteínas/100g de SF, 5,0g de glioxal/100g de proteínas e 25g de glicerol/100g de proteínas.

O extrato proteico liofilizado foi disperso em água sob agitação magnética, à temperatura ambiente (Figura 15a). Após a completa dispersão, a solução permaneceu por mais 30 minutos em agitação para permitir a completa homogeneização (Figura 15b). Decorrido esse período, foi adicionado o agente reticulante (glutaraldeído - GT ou glioxal -

GX) e o tempo de reticulação foi de 5 minutos (Figura 15c). Após esse intervalo, colocou-se o glicerol (Figura 15d) e efetuou-se a correção de massa com o restante da água. As soluções foram então agitadas por mais um minuto e em seguida, dispersas em placas de poliestireno com diâmetro de 150mm (Figura 16a) e desidratada em estufa à 30°C Marconi) com circulação forçada por 16 horas (Figura 16b).

Figura 15: Elaboração das soluções filmogênicas.

Figura 16: Dispersão da solução filmogênica e secagem dos filmes.

A fim de minimizar o efeito da espessura foram fixados os valores de SF colocados na placa. Para a obtenção desses valores padronizou-se a quantidade de proteína por placa (1,5g) e a partir da realização dos cálculos obtiveram-se os valores para cada formulação (Tabela 4).

Tabela 4: Quantidade em g de SF por placa de acordo com o teor de proteínas

Teor de proteínas na SF	Quantidade de SF (g)
2,0g de proteínas/100g de SF	75,00
4,0g de proteínas/100g de SF	37,50
6,0g de proteínas/100g de SF	25,00
8,0g de proteínas/100g de SF	18,75
10,0g de proteínas/100g de SF	15,00

4.4. Caracterização dos filmes

Os filmes foram acondicionados em dessecadores contendo solução saturada de nitrato de magnésio (UR=52,5% à 25°C) por 24 horas. Em seguida, os filmes foram cortados e re-acondicionados nos dessecadores, nas mesmas condições de umidade e temperatura supracitadas por sete dias ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$). Os filmes foram submetidos às caracterizações descritas à seguir, de acordo com cada estudo:

1. Efeitos da concentração de proteínas e o do tipo de reticulante - espessura, microestrutura, cor, opacidade, brilho, umidade, solubilidade e propriedades mecânicas (tração e perfuração);
2. Efeito da concentração do agente reticulante – espessura, microestrutura, cor, opacidade, brilho, umidade, solubilidade, permeabilidade ao vapor de água e propriedades mecânicas (tração e perfuração);
3. Caracterização complementar do filme com as melhores propriedades – além das propriedades já avaliadas, estudou-se ainda a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, as propriedades térmicas, biodegradabilidade no solo e isoterma de sorção.

4.4.1. Espessura

A espessura dos filmes foi determinada no sexto dia de acondicionamento como a média aritmética de dez medidas aleatórias feitas com um micrômetro digital (resolução 0,001mm, MITUTOYO (Figura 17).

Figura 17: Determinação da espessura de uma amostra pra teste de tração.

4.4.2. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas por de testes de tração e perfuração utilizando-se um texturômetro TA.XT2i (TA Instruments). Os dados foram analisados com auxílio do Exponent Lite Express (versão 4,013,0 XT Express).

4.4.2.1. Teste de tração

Para os testes de tração (Figura 18a), as amostras ($15 \times 90\text{mm}^2$) foram fixadas na sonda de tração com separação inicial de 50mm, e a velocidade de realização do teste foi estabelecida em 1,0mm/s. A tensão na ruptura (TR, em MPa) e a elongação na ruptura (ER, em %) foram obtidas diretamente das curvas de tensão *versus* elongação, mas, o módulo elástico (ME, em MPa/%) foi obtido a partir do cálculo da inclinação da porção linear da curva (THOMAZINE; CARVALHO; SOBRAL, 2005).

Figura 18: Testes de tração (a) e perfuração (b) dos filmes de proteínas extraídas da torta de mamona.

4.4.2.2. Testes de perfuração

Os testes de perfuração (Figura 18b) foram realizados segundo Sobral et al. (2001), onde amostras circulares ($d=46\text{mm}$), colocadas em um suporte cilíndrico, foram perfuradas por uma sonda ($d=3\text{mm}$) movendo-se com velocidade de 1mm/s . A força na perfuração (FP, em N) foi obtida da curva força *versus* distância (mm). A deformação na perfuração (DP, em %) foi calculada a partir da distância percorrida pela sonda, com a equação 1.

$$\text{Deformação (\%)} = \left[\frac{\left(\sqrt{d^2 + l_0^2} - l_0 \right)}{l_0} \right] \times 100 \quad (1)$$

Onde: d é a distância percorrida pela sonda em mm; l_0 é o comprimento inicial do filme (23mm).

4.4.3. Umidade e Solubilidade em água

Para a determinação da umidade, as amostras dos filmes foram colocadas em pesa filtros e levadas à estufa à 105°C por 24 horas. A umidade dos filmes foi calculada com a equação 2 (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1992).

$$\text{Umidade (\%)} = \left(1 - \frac{m_f}{m_i}\right) \times 100 \quad (2)$$

Onde: m_f é a massa da amostra seca em g; m_i é a massa da amostra inicial em g (base seca).

A solubilidade em água dos filmes foi determinada segundo metodologia adaptada de Gontard, Guilbert e Cuq (1992). Os filmes foram cortados em discos de 2cm de diâmetro e imersos em 50mL de água destilada permanecendo por 24 horas sob agitação (Mesa Agitadora Marconi-MA141) (Figura 19). Decorrido este período, o material foi filtrado em papel de filtro de 80g/m² e porosidade de 3micras (Nalgon) previamente pesado, a fim de evitar superestimação da solubilidade em água dos filmes, a umidade do filtro foi descontada antes da realização dos cálculos. Após a filtração, o papel de filtro foi colocado em pesa filtro e levado para secagem em estufa à 105°C (MARCONI, 315 SE) por 24 horas. Para o cálculo da solubilidade foi utilizada a equação 3.

$$\text{Solubilidade (\%)} = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i}\right) \times 100 \quad (3)$$

Onde: m_i é a massa inicial do filme em g; m_f é a massa seca do filme (sem o filtro) em g.

Figura 19: Agitador com amostras para teste de solubilidade.

4.4.4. Cor e Opacidade

A cor dos filmes foi medida por meio dos padrões do CIELab: L^* luminosidade , variando de 0 (preto) a 100 (branco); a^* de verde (-) à vermelho (+); e b^* , de azul (-) à amarelo (+), determinados com um colorímetro Miniscan XE (HunterLab) (Figura 20), trabalhando com D65 e luz do dia, com o auxílio do programa Universal Software 3.2 (HunterLab Associates Laboratory). Os filmes foram colocados sobre a placa branca e foram realizadas 10 medidas aleatórias de ambos os lados. A diferença total de cor (ΔE^*) foi determinada com a equação 4 (SOBRAL, 2000).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (4)$$

Onde: $\Delta L^* = L^*_{amostra} - L^*_{padrão}$; $\Delta a^* = a^*_{amostra} - a^*_{padrão}$; $\Delta b^* = b^*_{amostra} - b^*_{padrão}$

Figura 20: Determinação dos parâmetros de cor e opacidade para os filmes.

A opacidade dos filmes foi determinada utilizando-se o mesmo aparelho das medidas de cor. A opacidade da amostra (Y) foi calculada como a relação entre opacidade da amostra colocada sobre o padrão preto e (Y_p) e a opacidade da amostra colocada sobre o padrão branco (Y_b), com a equação 5 (SOBRAL, 2000). Os resultados foram obtidos a partir de 10 medidas aleatórias em ambos os lados da amostra.

$$Y = \frac{Y_p}{Y_b} \quad (5)$$

4.4.5. Brilho

O brilho dos filmes foi determinado a partir de dez medidas aleatórias utilizando-se um glossímetro Rhopoint NGL 20/60 (Figura 21), nos ângulos de 20° e 60°, de acordo com Villalobos et al. (2005). Assim como para as análises de cor e opacidade, as medidas foram realizadas em ambos os lados da amostra, ou seja, superfície em contato com o ar e em contato com a placa.

Figura 21: Glossímetro utilizado na análise de brilho dos filmes.

4.4.6. Hidrofobicidade (Determinação do ângulo de contato)

A hidrofobicidade superficial dos filmes foi determinada a partir das medidas do ângulo de contato, utilizando-se um goniômetro G1 Kruss (Kruss, GmgH, Alemanha) (Figura 22), com um software de análise de imagem (Drom Shape Analysis, Kruss GmgH, Alemanha) à temperatura ambiente, de acordo com Marcuzzo et al. (2010).

Uma gota de água deionizada ($\sim 1\mu\text{L}$) foi depositada na superfície das amostras de filme ($40 \times 15\text{mm}^2$) com auxílio de uma seringa de precisão. A imagem da gota foi fotografada com uma câmera digital em intervalos de 0,5s. O analisador de imagens foi usado para medir o ângulo de contato da gota de ambos os lados, durante 15 segundos. Foram realizadas 6 medidas para cada amostra de ambos lados (superfície em contato com a placa e em contato com o ar).

Figura 22: Goniômetro utilizado para o teste de hidrofobicidade (ângulo de contato).

4.4.7. Permeabilidade ao vapor de água

A determinação da permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi realizada segundo Gontard, Guilbert e Cuq (1992), onde as amostras de filme foram fixadas em células de alumínio com um anel perfurado (área exposta $12,29\text{cm}^2$), contendo sílica gel (Figura 23a). Essas células foram colocadas em um dessecador com água destilada (UR=100%) e mantidas em ambiente controlado ($T=22\pm0,2^\circ\text{C}$) (Figura 23b). O ganho de massa do sistema (célula+sílica+filme) foi medido em balança semi-analítica (Gehaka BG2000) em intervalos regulares (24h) por um período de 144h. A permeabilidade foi calculada com a equação 6:

$$\text{PVA}(\text{g.mm/h.m}^2.\text{kPa}) = \frac{G \cdot x}{t \cdot A_e \cdot P_0 \cdot (R_1 - R_2)} \quad (6)$$

Onde: x: espessura média dos filmes (mm); A_e : área exposta (cm^2); P_0 : pressão de vapor da água (Pa) na temperatura média do período; $(R_1 - R_2)$: diferença de umidade relativa (%); G/t (g/h): coeficiente angular da regressão linear da reta de ganho de massa do sistema *versus* tempo.

Figura 23: Imagens do teste de permeabilidade ao vapor de água (a) Célula para o teste de PVA e (b) dessecador contendo a célula para o teste de PVA

4.4.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise de microscopia eletrônica de varredura, a amostra de EPL foi acondicionada por 7 dias em sílica-gel. Além disso, no sexto dia, o dessecador contendo a amostra foi conectado a uma bomba de vácuo permanecendo assim por 24 horas, então a amostra foi analisada.

O estudo da microestrutura dos filmes foi realizado em amostras rompidas no teste de tração, amostras criofraturadas e nas superfícies em contato com o ar e placa. Foi utilizado um microscópio MEV Hitachi, TM3000 (Tokyo, Japão) com feixe a 15kV (Figura 24) (CARVALHO; GROSSO, 2004).

Figura 24: Microscópio eletrônico de varredura.

4.4.9. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As determinações das propriedades térmicas dos filmes foram realizadas por calorimetria diferencial de varredura, utilizando-se um DSC TA 2010 (Figura 25) controlado por módulo TA 4000 (TA Instruments, USA) e com um acessório para resfriamento, segundo Sobral et al. (2001). Após acondicionamento de uma semana em NaBr (UR=58%), foram pesadas alíquotas (~10mg) em balança de precisão ($\pm 0,0001\text{g}$) (Scientech, SA210) e colocadas em recipientes herméticos. O sistema (recipiente+amostra) foi aquecido a $5^\circ\text{C}/\text{min}$, entre -150 e 150°C , em atmosfera inerte ($45\text{mL}/\text{min}$ de N_2). Como referência foi utilizado um recipiente vazio.

Figura 25: DSC TA 2010 utilizado nas análises térmicas

A temperatura de transição vítrea (T_g) foi calculada como o ponto de inflexão da linha de base, causada pela descontinuidade do calor específico da amostra. A temperatura de fusão (T_m) foi calculada onde ocorreu o pico endotérmico. Todas as propriedades foram calculadas com auxílio do software Universal Analysis V1.7F (TA Instruments) e as análises foram realizadas em triplicata.

4.4.10. Isoterma de sorção

A isoterma de sorção de vapor de água dos filmes à base de proteínas de torta de mamona foi determinada utilizando-se um método gravimétrico (SOBRAL; HABITANTE, 2001; CARVALHO; GROSSO, 2004). Para isto, as amostras, acondicionadas previamente em P_2O_5 durante 10 dias, foram pesadas em balança analítica e em seguida foram condicionadas por três semanas utilizando-se dessecadores contendo solução saturada de sal ($LiCl$, $MgCl_2$, K_2CO_3 , $Mg(NO_3)_2$, $NaNO_2$, $NaCl$, KCl , $BaCl_2$) variando assim a atividade de água entre 0,11 e 0,90. A temperatura foi mantida a $25^\circ C$ em estufa com circulação de ar (Figura 26) (BOD-TE-390, TECNAL).

Figura 26: Filmes de torta de mamona acondicionados para elaboração da isoterma de sorção.

O modelo de Guggenheim-Anderson de Boer (GAB) foi ajustado aos dados experimentais (Equação 7). As constantes X_m (umidade da monocamada), C_{GAB} (constante da monocamada) e k_{GAB} (constante da multicamada) foram calculadas. O ajuste do modelo foi avaliado com o valor de R^2 , obtido do programa STATISTICA® v.8.0.

$$X_W = \frac{C_{GAB} k_{GAB} X_m A_W}{(1 - k_{GAB} A_W)(1 - k_{GAB} A_W + C_{GAB} k_{GAB} A_W)} \quad (7)$$

4.4.11. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para as análises de FTIR, os filmes foram acondicionados por sete dias em dessecadores contendo sílica-gel. Após o período de acondicionamento, as amostras foram colocadas de forma sobreposta sob o sensor do espectrofotômetro Spectrum One (Perkin Elmer, USA) (Figura 27), de acordo com Vicentini et al. (2005). As amostras foram colocadas sobre a célula de leitura e foram realizadas 16 varreduras espectrais de 40 a 4.000 cm^{-1} com

resolução de 2cm^{-1} . Os dados foram coletados e tratados com o software Spectrum One, (Spectrum One, versão 5.3).

Figura 27: Espectrofotômetro FT-IR com amostra de filmes de torta de mamona.

4.4.12. Biodegradabilidade no solo (*Indoor*)

A determinação da biodegradabilidade dos filmes foi calculada a partir da perda de massa (PM) dos filmes. A análise foi realizada em laboratório adaptando-se a metodologia de Martucci e Ruseckaite (2009). Foram utilizadas bandejas plásticas (510x330x95mm), com 7.000g de terra vermelha. A terra foi caracterizada antes do início do experimento (Tabela 5). As amostras foram cortadas em retângulos ($5 \times 4\text{cm}^2$) e colocadas em envelopes plásticos identificados. A umidade inicial das amostras foi determinada. Os envelopes foram enterrados e a biodegradabilidade foi calculada com a equação 8. A umidade da terra foi mantida com adição periódica de água.

$$\text{PM}(\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (8)$$

Onde: m_i : massa inicial da amostra (g em base seca); m_f : massa final da amostra (g em base seca).

Tabela 5: Características da terra vermelha⁽¹⁾ utilizada nos testes de biodegradabilidade.

Componentes*	Teor (%)
Matéria Orgânica	3,3
Argila	33,7
Areia	28,9
Silte	37,4
pH	5,5

⁽¹⁾Análises realizadas pelo Laboratório de Solos do departamento de Zootecnia da FZEA/USP, Campus de Pirassununga em setembro de 2011. Contato: (agrarias@usp.br)

4.5. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa computacional SAS (SAS, versão 9.2). As diferenças significativas entre as médias foram identificadas através dos testes de Tukey ($p < 0,05$).

5. Resultados e Discussões

5.1. Caracterização do extrato proteico liofilizado (EPL)

5.1.1. Composição centesimal e teor de aminoácidos

Os resultados das análises do EPL estão apresentados na Tabela 6, onde se observou que se trata de um concentrado proteico devido ao seu teor de proteínas (69%). O extrato proteico liofilizado apresentou um teor de matéria mineral (MM) igual à 12,3%, esse valor justificou-se pelo grande volume de NaOH utilizado na solubilização das proteínas (NEVES, LOURENÇO; SILVA, 2001).

Os valores de fibra bruta (FB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram 0,22, 1,9 e 0,1%, respectivamente. Os valores obtidos para FB, FD e FDA podem ser atribuídos à solubilização parcial da fração da hemicelulose, celulose ou lignina da parede celular (VAN SOEST; FERREIRA; HARTLET, 1984).

Tabela 6: Composição centesimal (%) do extrato proteico liofilizado.

Análises	Valores em %
Matéria seca	95,6±0,3
Matéria mineral	12,3±0,4
Proteína bruta	69,0±0,6
Fibra bruta	0,22±0,1
Extrato etéreo	1,1±0,5
Extrativo não nitrogenado	19,6±4,0
Nitrogênio não proteico	7,1±0,4
FDA	1,9±0,4
FDN	0,1±0,0

O EPL apresentou baixo teor de extrato etéreo (EE=1,1%), sugerindo que o EPL não apresenta alto teor de lipídeos, viabilizando desta forma a re-suspensão desse material em

água para o preparo das soluções filmogênicas. O conteúdo de nitrogênio não proteico (NNP) encontrado no EPL foi relacionado a desnaturação das proteínas em decorrência do elevado pH de extração. Por diferença, calculou-se, o valor do extrativo não nitrogenado (ENN=19,6%), que foi atribuído a presença de carboidratos não identificados.

O teor de PB no extrato proteico liofilizado de torta de mamona foi menor que os valores encontrados para isolados proteicos de tortas residuais. A maioria dos estudos encontrados na literatura está relacionada à caracterização de isolados proteicos obtidos de diferentes fontes. Os isolados proteicos, desses trabalhos, foram produzidos a partir da precipitação das proteínas extraídas. Com o abaixamento do pH do extrato proteico até o ponto isoelétrico ocorrendo a separação das proteínas. Assim, nesses casos, o resultado final é uma matéria prima para produção de filmes com valores de proteínas em média de 90% (AYHLLON-MEIXUEIRO; VACA-GARCIA; SILVESTRE, 2000; BARBIN; NATSCH; MÜLLER, 2011; LESTARI; MULDER; SANDERS, 2011; ORLIAC et al., 2002; ORLIAC et al., 2003; WÄSCHE et al., 1998).

Ayhllon-Meixueiro, Vaca-Garcia e Silvestre (2000) produziram isolado proteico de torta de girassol com teor de PB=90%. O mesmo resultado foi obtido por Orliac et al (2002) trabalhando também com torta de girassol (TG). Ainda em estudos envolvendo TG, Orliac et al. (2003) produziram um isolado com 84% de proteínas.

Outros estudos encontrados, envolvendo proteínas extraídas de tortas residuais, também incorporaram a precipitação das proteínas em seu procedimento obtendo isolados proteicos. Lestari, Mulder e Sanders (2011) trabalhando com isolado proteico de torta de pinhão manso obtiveram 97,7% de proteínas, Wäsche et al. (1998) e Barbin, Natsch e Müller (2011) estudando a extração de proteínas da torta de colza obtiveram isolados com teores de proteínas de 40,7 e 63,6%, respectivamente.

Ao longo desse estudo, optou-se por não realizar a precipitação das proteínas, isso para evitar a adição de mais uma etapa no processo de elaboração dos biofilmes. Tornando assim, mais viável a transposição desse projeto para escala industrial.

Neves, Lourenço e Silva (2001) caracterizaram o extrato líquido elaborado a partir extração de proteínas de tremoço. O valor de PB obtido foi de 66%, semelhante ao resultado encontrado nesse estudo. No entanto, Carvalho et al. (2009) estudaram o extrato proteico obtido de sementes de cupuaçu, o teor de PB foi equivalente à 31,18%, ou seja, inferior ao valor encontrado para EPL. Firatligil-Durmus e Evranuz (2010) obtiveram 57% de PB na isolado proteico de farinha desengordurada de semente de pimenta. Essas diferenças nos valores de proteína bruta podem ser atribuídas à solubilidade das proteínas e também ao tipo de extração realizado.

Embora o extrato proteico não tenha sido submetido à precipitação o valor de matéria seca (MS) foi bastante semelhante ao obtido em isolado proteico de girassol (MS=94%) (AYHLLON-MEIXUEIRO; VACA-GARCIA; SILVESTRE, 2000; ORLIAC et al., 2002, ORLIAC et al., 2003).

Porém, o teor de matéria mineral (MM) no EPL de torta de mamona, foi maior que para os isolados proteicos de girassol e colza, e também para o concentrado proteico de tremoço (MM=7,6; 7,3 e 2,38, respectivamente) (AYHLLON-MEIXUEIRO; VACA-GARCIA; SILVESTRE, 2000; BARBIN; NATSCH; MÜLLER, 2011; ORLIAC et al., 2002, ORLIAC et al., 2003; WÄSCHE et al., 1998). A diferença nos teores de MM entre os isolados proteicos e o EPL desse estudo foi justificada por diferenças no pH da extração das proteínas.

O valor de EE do EPL desse estudo foi próximo ao valor de lipídeos para isolado proteico de girassol (EE=0,6%), mas foi inferior ao observado para o concentrado proteico de semente de cupuaçu (EE=3,83%) (AYHLLON-MEIXUEIRO; VACA-GARCIA;

SILVESTRE, 2000; CARVALHO et al., 2009; ORLIAC et al., 2002, ORLIAC et al., 2003).

O valor encontrado para o EE do concentrado proteico de semente de cupuaçu está relacionado com o processo de extração do óleo desta semente. Pois, a torta de girassol e a torta de mamona foram oriundas de processos industriais que visam o maior rendimento em termos de extração de óleos. Enquanto que, a torta de cupuaçu foi obtida em escala laboratorial, ou seja, a extração do óleo foi realizada seguindo um protocolo menos agressivo.

Informações sobre os valores médios de fibra bruta (FB), fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN), nitrogênio não proteico (NNP) e extrativo não nitrogenado (ENN), de isolados proteicos produzidos de tortas não foram encontrados na literatura.

A composição de aminoácidos do EPL encontra-se na Tabela 7. Observou-se que o extrato proteico de torta de mamona apresentou altas concentrações de arginina (14,0g/100g de proteínas), ácido glutâmico (20,3g/100g de proteínas) e triptofano (13,4g/100g de proteínas). Entretanto, foram encontrados baixos teores de lisina, tirosina e treonina (2,3g/100g de proteínas), fenilalanina e prolina (3,1g/100g de proteínas), histidina (2,4g/100g de proteínas) e cistina (1,1g/100g de proteínas). Os aminoácidos: alanina, ácido aspártico, glicina, isoleucina, leucina, metionina, valina e serina foram encontrados no EPL de torta de mamona em concentrações que variaram de 3,4 à 7,1g/100g de proteínas (Figuras 4 e 5).

A composição em aminoácidos da EPL de torta de mamona não apresentou muitas diferenças quando comparada à composição de aminoácidos dos isolados proteicos liofilizados (IPL) de ervilha, tremço e soja estudados por Tömösközi et al. (2001). Sendo que, nesse caso, foi realizada a extração alcalina seguida de precipitação das proteínas no ponto isoelétrico (pI). O EPL apresenta teores inferiores de ácido aspártico e lisina quando comparado aos três IPL (ervilha, tremço e soja), entretanto os teores de metionina e triptofano são consideravelmente superiores aos encontrados para estes mesmo isolados.

Tabela 7: Composição de aminoácidos das proteínas extraídas da torta de mamona, ervilha, tremço e soja.

Aminoácidos	EPL de mamona (g/100g de proteínas)	IPL* de ervilha (g/100g de proteínas)⁽¹⁾	IPL* de tremço (g/100g de proteínas)⁽¹⁾	IPL* de soja (g/100g de proteínas)⁽¹⁾
Alanina	3,5±0,1	4,13	3,69	4,11
Arginina	14,0±0,2	14,22	9,53	7,59
Ácido Aspártico	7,1±0,1	11,58	9,80	10,81
Glicina	3,9±0,1	4,50	3,25	4,26
Isoleucina	3,4±0,1	3,48	3,83	3,62
Leucina	5,2±0,2	6,94	7,42	7,98
Ácido Glutâmico	20,3±0,4	16,39	25,77	21,29
Lisina	2,3±0,0	8,12	5,31	8,56
Cistina	1,1±0,7	0,35	0,98	0,85
Metionina	4,8±0,5	0,85	0,49	0,62
Fenilalanina	3,1±0,1	4,67	3,60	5,17
Tirosina	2,3±0,1	3,35	4,73	3,61
Treonina	2,3±0,1	3,12	3,98	4,33
Triptofano	13,4±0,5	0,51	0,99	0,80
Prolina	3,1±0,1	4,30	3,92	4,81
Valina	4,0±0,0	5,13	3,45	3,87
Histidina	2,4±0,0	3,39	2,79	3,71
Serina	4,0±1,0	4,96	6,41	5,45

*IPL: Isolado proteico liofilizado; (1) Tömösközi et al. (2001).

A comparação entre os perfis de aminoácidos obtidos para os diferentes isolados ou concentrados proteicos não pôde ser realizada de forma direta. Isso porque, a composição das proteínas varia de acordo com sua origem, que por sua vez é a grande responsável pelas diferentes concentrações desses aminoácidos nas proteínas. Existem diferenças no processo de

obtenção dos isolados e concentrados proteicos que também podem acarretar em diferenças no perfil de aminoácidos.

De forma geral, estão presentes no EPL de mamona os principais aminoácidos envolvidos nas reações de modificações químicas com aldeídos bifuncionais. O alto teor de argina (14,0g/100g de proteínas) sugere que o EPL de torta de mamona pode reagir com glioxal formando filmes com boas propriedades funcionais. Ao passo que, os baixos teores de lisina, cistina, histidina e tirosina, cujos valores encontram-se entre 1,1 e 2,4g/100g de proteínas, indicam a reação entre o EPL e o glutaraldeído pode não apresentar os resultados esperados.

5.1.2. Determinação de cor e microestrutura do EPL

Os resultados obtidos para os padrões do sistema CIELab estão apresentados na Tabela 8, os valores foram 54,3, 6,6 e 19,6 para L^* , a^* , e b^* respectivamente. A combinação dos valores obtidos, quando plotada no sólido de cor (Figura 28), indicou que a cor do EPL foi resultado da mescla de vermelho (valor positivo de a^*), com amarelo (valor positivo de b^*) que representa a cor laranja. E o valor intermediário de L^* (referente a luminosidade), foi como se um pouco de cinza fosse adicionado ao laranja resultando em um tom marrom claro.

Tabela 8: Parâmetros do sistema CIELab para o EPL de mamona e o CPL de cupuaçu.

Parâmetros	EPL de torta de mamona	CPL* de semente de cupuaçu ⁽¹⁾
L^*	54,3±0,6	75,64±0,24
a^*	6,6±0,1	5,49±0,02
b^*	19,6±0,1	17,70±0,08

*CPL: Concentrado proteico liofilizado; (1) Carvalho et al. (2009)

Figura 28: Sólido de cores - Sistema CIELab (1976)

Fonte: HunterLab (2001)

Esse resultado foi confirmado pela Figura 29, que é a imagem do extrato proteico liofilizado de torta de mamona utilizado na realização desse teste.

Figura 29: Extrato proteico liofilizado.

Carvalho et al. (2009) avaliaram os mesmos parâmetros para concentrado proteico de cupuaçu (CPL) e obtiveram resultados similares para os padrões a^* e b^* (Tabela 8). O valor do L^* , para o CPL de cupuaçu, foi ligeiramente superior ao valor obtido para o EPL da torta de mamona. A coloração levemente alaranjada foi, segundo esses autores, atribuída ao processo de extração das proteínas que pode ter causado escurecimento não enzimático (Maillard), ou ainda, oxidação de compostos fenólicos (CARVALHO et al., 2009).

A partir da micrografia do EPL (Figura 30), observou-se que se trata de uma estrutura típica de material liofilizado, com escamas bem definidas e sem presença de estruturas estranhas que possam sugestionar qualquer tipo de contaminação, ou ainda presença de resíduos oriundos da extração. Russ (2005) analisou isolado proteico de soja seco em “*spray dried*”, e observou que este apresentou uma estrutura globular, diferente, portanto, da observada para o EPL.

Figura 30: Micrografia do extrato proteico liofilizado (pH12).

5.2. Estudo do efeito da concentração de proteína e do tipo de reticulante: glutaraldeído e glioxal

Nesse estudo foram elaborados filmes de proteínas extraídas da torta de mamona em diferentes concentrações. Foram utilizados dois agentes reticulantes: o glutaraldeído e o glioxal na concentração de 1g de agente reticulante/100g de proteínas e 25g de glicerol/100g de proteínas.

Foram avaliados os efeitos da concentração de proteínas e do tipo de reticulante sobre o aspecto visual, espessura, microestrutura, cor, opacidade, brilho, umidade, solubilidade em água e propriedades mecânicas (tração e perfuração).

5.2.1. Aspecto visual

Os filmes elaborados com as proteínas da torta de mamona modificadas com glutaraldeído/glioxal e plastificados com glicerol apresentaram bom aspecto e coloração amarronzada (Figuras 31 e 32). Entretanto, após a retirada dos filmes da estufa, foi necessário o acondicionamento por 24 horas em dessecador contendo nitrato de magnésio (UR=52,5%) para facilitar o desprendimento das placas e facilitar o corte.

Embora os filmes tenham sido produzidos com concentrações proteicas diferentes e com dois tipos de agentes reticulantes, não houve diferença perceptível no aspecto visual dos filmes. Contudo, pôde-se observar que os pontos extremos desse planejamento (2 e 10% de proteínas), apresentaram problemas durante a elaboração da solução filmogênica (SF) e a secagem. As formulações com 2% de proteína/100de SF, tanto para o glutaraldeído, como para o glioxal, demoraram em média 40 horas para desidratar. Já, as soluções com 10% de proteínas/100g de SF, também para ambos os reticulantes, levaram um longo tempo para

completa dispersão do EPL, de 4 a 6 horas. Além disso, a agitação foi bastante lenta a fim de evitar a incorporação de ar formando bolhas na matriz filmogênica.

Figura 31: Filmes elaborados com proteínas reticuladas com glutaraldeído.

Figura 32: Filmes elaborados com proteínas reticuladas com glioxal.

Tanto o tempo de secagem, quanto a elaboração da SF devem ser considerados como pontos importantes na avaliação dos resultados, pois, como mencionado anteriormente, espera-se, ao final desse trabalho, obter um material que possa ser adaptado para produção em escala industrial.

5.2.2. Espessura

Os resultados para a espessura dos filmes foram obtidos a partir das medidas realizadas para os testes de tração e perfuração. Em ambos os testes, as medidas foram aleatórias sendo que a resposta de cada replicata foi obtida da média dessas medidas (n=210 em média). Os dados apresentados na Tabela 9 são médias das triplicatas.

Tabela 9: Resultados para espessura dos filmes produzidos com proteínas modificadas com glutaraldeído (GT) e glioxal (GX).

C _{PROT}	Espessura (mm)	
	GT	GX
2	0,122±0,003 ^{A,a}	0,125±0,003 ^{A,a}
4	0,121±0,003 ^{A,a}	0,119±0,001 ^{B,a}
6	0,120±0,004 ^{A,a}	0,116±0,001 ^{B,a}
8	0,119±0,001 ^{A,a}	0,117±0,001 ^{B,a}
10	0,125±0,003 ^{A,a}	0,126±0,001 ^{A,a}

C_{PROT}: Concentração de proteínas em g/100g de SF; GT: glutaraldeído; GX: glioxal

A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

Observa-se que nem a variação da concentração de proteína, nem o tipo de reticulante apresentaram efeito sobre a espessura dos filmes elaborados com as proteínas de torta de mamona, ainda que para o glioxal a análise estatística tenha apresentado significância ($p < 0,05$), isto é, considerou-se que as espessuras permaneceram em torno de 0,120mm.

Conforme mencionado anteriormente a concentração de proteína por placa foi mantida constante para todas as formulações independente da concentração de proteína na solução. Essa correção implicou na diminuição da massa de solução filmogênica colocada na placa à medida que a concentração de proteína aumentou (Tabela 4). Esse controle foi realizado para

eliminar o efeito da variável espessura, pois, como o observado em Sobral (2000), esta apresenta efeito sobre as propriedades dos filmes.

Observou-se também que, esse valor (0,120mm) permitiu melhores condições de trabalho (maquinabilidade, corte, etc.). Não foram encontrados os dados técnicos sobre os materiais convencionais, sendo assim, não foi possível estabelecer um valor de espessura que estivesse em concordância com os materiais disponíveis no mercado. Por outro lado é sabido que para o emprego na agricultura a espessura não é um fator determinante, pois não há necessidade de visualizar as mudas, ao contrário, uma das finalidades dos sacos para mudas é, de acordo com Poliagro (2006), oferecer barreira aos raios solares.

5.2.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura dos filmes elaborados com EPL com glutaraldeído e glioxal foi estudada nas superfícies em contato com o ar e com a placa (Figuras 33, 34, 35 e 36). As micrografias foram obtidas com um aumento de 1000x em amostras de filmes acondicionadas em dessecadores contendo sílica-gel por uma semana.

As imagens evidenciaram que a secagem influenciou na superfície dos filmes, uma vez que, estas mostram a presença de muitas partículas na face em contato com o ar, independente da formulação (Figuras 33 e 35). As mesmas partículas são observadas na face em contato com a placa (Figuras 34 e 36), mas, em menor quantidade. Assim, pôde-se constatar que a desidratação dos filmes causa um fenômeno de arraste que provocou o surgimento dessas partículas na parte superior dos filmes.

González, Strumia e Igarzabal (2011), estudaram filmes elaborados com proteínas de soja (isolado proteico) reticuladas com genipina, e, observaram a formação de agregados devido a reticulação, isso não foi observado nos filmes elaborados com EPL de torta de mamona, independente do agente reticulante utilizado.

Figura 33: Micrografias das superfícies em contato com o ar de filmes com diferentes concentrações de proteínas reticuladas com glutaraldeído. Aumento de 1000x.

(a) 2 de proteínas; (b) 4% de proteínas; (c) 6% de proteínas; (d) 8% de proteínas; (e) 10% de proteínas.

Figura 34: Micrografias das superfícies em contato com a placa de filmes com diferentes concentrações de proteínas reticuladas com glutaraldeído. Aumento de 1000x.

(a) 2 de proteínas; (b) 4% de proteínas; (c) 6% de proteínas; (d) 8% de proteínas; (e) 10% de proteínas.

Figura 35: Micrografias das superfícies em contato com o ar de filmes com diferentes concentrações de proteínas reticuladas com glioxal. Aumento de 1000x.

(a) 2 de proteínas; (b) 4% de proteínas; (c) 6% de proteínas; (d) 8% de proteínas; (e) 10% de proteínas.

Figura 36: Micrografias das superfícies em contato com a placa de filmes com diferentes concentrações de proteínas reticuladas com glioxal. Aumento de 1000x.

(a) 2 de proteínas; (b) 4% de proteínas; (c) 6% de proteínas; (d) 8% de proteínas; (e) 10% de proteínas.

Mauri e Añón (2006) estudaram filmes de isolado proteico de soja produzidos em diferentes pH. Os filmes elaborados em pH alcalino apresentaram estruturas mais coesas, esses autores atribuíram essa coesão a formação de novas ligações entre as proteínas, isso

porque em extremos de pH, as proteínas foram totalmente ou parcialmente desnaturadas havendo desdobramento de estruturas que levaram à interação das cadeias de proteínas produzindo matrizes bem estruturadas.

Assim, pôde-se sugerir que o pH de extração, juntamente com a adição do agente reticulante culminaram em uma estrutura sem indícios de poros ou falhas. Com exceção da figura 36e, referente à superfície em contato com a placa do filme com 10% de proteínas e glioxal, onde aparece uma trinca, que pode ter ocorrido no momento em que o filme foi retirado da placa.

5.2.4. Propriedades óticas

5.2.4.1. Cor e Opacidade

Os resultados das determinações de cor e opacidade foram obtidos a partir de medidas realizadas nas superfícies contato com a placa (Tabelas 10 e 11) e com o ar de secagem (Tabelas 12 e 13).

Avaliando-se as respostas obtidas para a superfície que ficou em contato com a placa (Tabelas 10 e 11), observou-se que o valor médio para o padrão L^* , relativo à luminosidade, ficou em torno de $18,8 \pm 1,3$, não havendo efeito significativo nem para o tipo de reticulante, nem para a concentração de proteínas. Com exceção dos filmes elaborados com 10g de proteínas/100g de SF, onde os filmes elaborados com glioxal ($L^*=17,4$), apresentaram luminosidade significativamente menor ($p < 0,05$) aos filmes elaborados com glutaraldeído ($L^*=18,2$).

Os valores obtidos para a^* e b^* foram bastante semelhantes para todas as formulações. Não houve efeito significativo ($p > 0,05$) em se tratando de filmes elaborados com glutaraldeído, sendo que a média foi de $30,5 \pm 1,3$ e $27,2 \pm 2,5$ para a^* e b^* , respectivamente.

Constatou-se a partir da análise estatística, que existiu um leve efeito da concentração de proteínas sobre o padrão a^* , dos filmes elaborados com glioxal. Assim, os filmes produzidos com 2 e 6g de proteínas/100g de SF, tiveram resultados inferiores aos dos filmes elaborados com as outras concentrações (4, 8 e 10g/100g de SF), para o padrão a^* . A adição de glutaraldeído nos filmes apresentou efeito significativo ($p<0,05$), ainda que pouco expressivo, para esse mesmo padrão (a^*). Verificou-se que os filmes contendo 2, 6 e 8g de proteínas/100g de SF tiveram respostas superiores aos filmes elaborados com glioxal, para estas mesmas concentrações.

Tabela 10: Valores dos parâmetros L^* , a^* e b^* de amostras de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glutaraldeído e glioxal – contato com a placa.

C_{PROT}	L^*		a^*		b^*	
	GT	GX	GT	GX	GT	GX
2	20,2±0,8 ^{A,a}	17,3±1,6 ^{A,a}	31,9±1,3 ^{A,a}	28,7±0,4 ^{B,b}	28,9±3,0 ^{A,a}	26,4±2,5 ^{A,a}
4	17,2±1,7 ^{A,a}	18,7±0,1 ^{A,a}	29,7±2,7 ^{A,a}	30,5±0,3 ^{A,a}	23,5±4,8 ^{A,a}	29,0±0,2 ^{A,a}
6	18,6±1,5 ^{A,a}	20,2±0,7 ^{A,a}	30,5±0,4 ^{A,a}	29,4±1,0 ^{B,b}	26,3±1,3 ^{B,a}	29,4±1,0 ^{A,a}
8	19,9±0,4 ^{A,a}	20,2±1,9 ^{A,a}	31,8±0,1 ^{A,a}	30,8±0,4 ^{B,a}	30,1±0,9 ^{A,a}	30,7±2,8 ^{A,a}
10	18,2±0,2 ^{A,a}	17,4±0,2 ^{B,a}	28,8±1,1 ^{A,a}	30,3±0,0 ^{A,a}	27,4±0,4 ^{A,a}	26,5±0,3 ^{B,a}

C_{PROT} : Concentração de proteínas em g/100g de SF; GT: glutaraldeído; GX: glioxal

A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

Não foi constatado efeito significativo ($p>0,05$), para a concentração de proteínas, sobre o padrão b^* . A média para os filmes com glutaraldeído foi equivalente à 27,2±2,5 e 28,4±1,9 para os filmes com glioxal. Houve somente uma discreta diferença, entre os filmes produzidos com 6g de proteínas/100g de SF, onde, os filmes com glioxal ($b^*=29,4$) apresentaram resultados superiores aos filmes elaborados com glutaraldeído ($b^*=26,3$). O comportamento inverso foi apresentado para o ponto com 10g de proteínas/100g de SF, ou

seja, os filmes com glutaraldeído tiveram valores iguais a 27,4, que foram superiores aos valores obtidos para esse mesmo ponto com a adição de glioxal ($b^*=26,5$).

Os valores para a diferença de cor total (ΔE^*) e opacidade da superfície em contato com a placa encontram-se na Tabela 11. Percebeu-se que, quando os filmes foram elaborados com glutaraldeído, não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$), para o ΔE^* , sendo que o valor médio foi $45,1\pm 2,7$. No caso dos filmes contendo glioxal, houve uma diferença sutil entre as diferentes concentrações, os valores de ΔE^* variaram entre 42,7 à 48,0.

Tabela 11: Valores dos parâmetros ΔE^* e opacidade de amostras de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glutaraldeído e glioxal – contato com a placa.

C_{PROT}	ΔE^*		Opacidade	
	GT	GX	GT	GX
2	$47,6\pm 3,0^{A,a}$	$42,7\pm 2,3^{A,b}$	$15,2\pm 4,3^{A,a}$	$16,7\pm 2,0^{A,a}$
4	$41,7\pm 5,3^{A,a}$	$46,1\pm 0,3^{A,ab}$	$21,1\pm 7,0^{A,a}$	$14,9\pm 0,4^{A,ab}$
6	$44,3\pm 1,6^{A,a}$	$46,3\pm 1,0^{A,ab}$	$19,1\pm 1,1^{A,a}$	$13,4\pm 1,5^{B,abc}$
8	$48,1\pm 0,8^{A,a}$	$48,0\pm 2,8^{A,a}$	$14,1\pm 1,1^{A,a}$	$12,1\pm 1,4^{A,bc}$
10	$43,7\pm 1,0^{A,a}$	$43,9\pm 0,3^{A,ab}$	$17,9\pm 0,6^{A,a}$	$11,2\pm 0,3^{B,c}$

C_{PROT} : Concentração de proteínas em g/100g de SF; GT: glutaraldeído; GX: glioxal

A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

Os valores de opacidade obtidos para os filmes com glutaraldeído (14,1 à 21,1) foram ligeiramente superiores aos valores obtidos para os filmes com glioxal (11,2 à 16,7). Sendo que, o aumento da concentração dos filmes com GT não apresentou efeito significativo ($p>0,05$) sobre esta propriedade, o mesmo comportamento não foi observado para os filmes com GX, onde o aumento da concentração implicou na diminuição da opacidade.

Observando-se os dados obtidos para os padrões L^* , a^* e b^* (Tabela 12), ΔE^* e opacidade (Tabela 13), para a superfície dos filmes que ficou em contato com o ar de

secagem, pôde-se constatar que o comportamento dos filmes para essa face é bastante semelhante ao da face em contato com a placa.

Assim como o observado para a superfície em contato com a placa, com relação ao padrão L* (valor médio=18,6±1,6), a variação do tipo agente reticulante (GT ou GX) não apresentou efeito estatístico significativo ($p>0,05$). Por outro lado, a concentração das proteínas apresentou efeito significativo somente para filmes com GX, e nesse caso o valor L* variou de 16,9 à 21,2.

Tabela 12: Valores dos parâmetros L*, a* e b* de amostras de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glutaraldeído e glioxal - contato com o ar.

C _{PROT}	L*		a*		b*	
	GT	GX	GT	GX	GT	GX
2	20,3±1,5 ^{A,a}	16,9±1,6 ^{A,b}	31,4±0,9 ^{A,a}	27,8±0,6 ^{B,b}	27,9±2,5 ^{A,a}	24,7±2,9 ^{A,a}
4	16,3±3,1 ^{A,a}	18,9±0,2 ^{A,ab}	30,5±2,2 ^{A,a}	29,7±0,3 ^{A,a}	23,8±5,3 ^{A,a}	28,1±0,3 ^{A,a}
6	18,2±0,9 ^{A,a}	18,4±1,0 ^{A,ab}	31,4±0,5 ^{A,a}	29,3±0,4 ^{B,ab}	28,0±1,6 ^{A,a}	27,8±1,6 ^{A,a}
8	20,4±1,0 ^{A,a}	21,2±1,5 ^{A,a}	31,3±0,4 ^{A,a}	29,8±0,5 ^{B,a}	29,3±1,0 ^{A,a}	30,2±3,1 ^{A,a}
10	18,7±0,9 ^{A,a}	16,9±2,2 ^{A,b}	29,5±0,7 ^{A,a}	29,7±0,8 ^{A,a}	28,2±1,0 ^{A,a}	25,1±3,2 ^{A,a}

C_{PROT}: Concentração de proteínas em g/100g de SF; GT: glutaraldeído; GX: glioxal
 A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.
 a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

Alguns filmes apresentaram diferenças ($p<0,05$), ainda que sutis, para o padrão a* (Tabela 12). Foi possível observar que, as superfícies de alguns filmes com GT apresentaram valores superiores aos filmes com GX (2, 6 e 8g de proteínas/100g de SF). Os valores do padrão a* variaram de 29,5 e 31,4 para os filmes com GT e de 27,8 a 29,7 para os filmes com GX.

Os valores para o parâmetro b* não sofreram influência nem da variação da concentração de proteínas, nem do tipo de agente reticulante, sendo que o valor médio para esse padrão foi de 27,3±2,1.

Em se tratando da diferença de cor total (ΔE^*), no caso da superfície em contato com o ar, nenhuma das duas variáveis, concentração e tipo de reticulante, exerceram efeito sobre o valor de ΔE^* , o valor médio observado ficou em torno de $44,7 \pm 2,3$ (Tabela 13).

Tabela 13: Valores dos parâmetros ΔE^* e opacidade de amostras de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glutaraldeído e glioxal - contato com o ar.

C_{PROT}	ΔE^*		Opacidade	
	GT	GX	GT	GX
2	$46,7 \pm 2,8^{A,a}$	$40,9 \pm 2,8^{A,a}$	$17,0 \pm 2,6^{A,a}$	$19,6 \pm 2,0^{A,a}$
4	$42,0 \pm 5,8^{A,a}$	$45,1 \pm 0,5^{A,a}$	$16,9 \pm 3,7^{A,a}$	$18,1 \pm 1,2^{A,ab}$
6	$45,8 \pm 1,6^{A,a}$	$44,4 \pm 1,5^{A,a}$	$15,2 \pm 1,0^{A,a}$	$13,5 \pm 1,7^{B,b}$
8	$47,5 \pm 0,9^{A,a}$	$47,6 \pm 3,0^{A,a}$	$16,9 \pm 2,0^{A,a}$	$16,2 \pm 3,9^{A,ab}$
10	$44,9 \pm 1,3^{A,a}$	$42,5 \pm 3,3^{A,a}$	$16,7 \pm 0,2^{A,a}$	$12,2 \pm 1,5^{B,b}$

C_{PROT} : Concentração de proteínas em g/100g de SF; GT: glutaraldeído; GX: glioxal

A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

A variação na concentração de proteínas não apresentou efeito sobre a opacidade dos filmes elaborados com GT (Tabela 13), e o valor médio dessa propriedade foi $16,5 \pm 0,8$. Entretanto, a alteração da concentração de proteínas ocasionou diferenças significativas ($p < 0,05$) na opacidade dos filmes com GX. O aumento na concentração de proteínas implicou em diminuição da opacidade, exceto para 8g de proteínas/100g de SF, onde a opacidade apresentou um valor superior. Nesse caso os valores ficaram entre 12,2 e 19,6. Observou-se também que os filmes com glutaraldeído apresentaram, de forma geral, valores de opacidade superiores aos valores obtidos para os filmes com glioxal.

Os resultados de opacidade dos filmes de proteínas de torta de mamona reticuladas com glutaraldeído e glioxal foram semelhantes aos obtidos por Carvalho e Grosso (2006) para filmes de gelatina reticulada com formaldeído e glioxal. Nesse caso, não houve diferença entre as formulações com os agentes reticulantes e a formulação controle (sem reticulação)

sugerindo que a reação não provoca efeito sobre esse parâmetro. Micard et al (2000) também obteve esse mesmo comportamento nos filmes de glúten reticulado com formaldeído.

Com a similaridade dos valores apresentados para os padrões L^* , a^* e b^* para ambas as superfícies (Tabela 8 e 10), não foi possível associar a diferença de cor total (ΔE^*) especificamente a um padrão. Esse comportamento foi diferente do observado em Alves et al. (2011), onde as blendas de gelatina/PVA com glutaraldeído apresentaram valores de L^* e a^* com menor intensidade que b^* , e por isso, o ΔE^* foi associado ao valor de b^* (coloração amarelada).

A coloração amarronzada dos filmes pode ser atribuída à coloração da matéria prima (EPL), que é proveniente da cor da torta de mamona, e também ao processo de extração. A extração alcalina aliada a reação de calor são capazes de extrair maiores quantidades de pigmentos (BAMDAD; GOLI; KADIVAR, 2006; CHO; RHEE, 2004; JANGCHUD; CHINNAN, 1999).

O desenvolvimento da coloração marrom também pode ser atribuído às reações que ocorrem entre as proteínas e os agentes reticulantes (GT e GX). Por exemplo, a formação das ligações entre o glioxal e arginina (bases de Schiff) acarretam, segundo alguns autores, no aumento do parâmetro b^* e diminuição do L^* (HERNÁNDEZ-MUÑOZ; VILLALOBOS; CHIRALT, 2004; PARK; BAE; RHEE, 2000).

A face superior dos filmes (contato com o ar) apresentou o mesmo comportamento que para a face em contato com a placa. Com isso, tem-se que o processo de secagem não exerceu influência nos parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*), e conseqüentemente na coloração do filme (ΔE^*), o mesmo foi observado para a opacidade dos filmes.

5.2.4.2. *Brilho*

As análises de brilho realizadas em ambas as superfícies dos filmes mostraram que para as medidas realizadas à 20° não houve efeito estatístico significativo ($p > 0,05$) nem para a concentração de proteínas, nem para o tipo de reticulante (Tabelas 14 e 15). Os valores para os filmes com GT ficaram entre 31,8 e 50,9GU para superfície em contato com a placa e 20,3 e 36,8GU para as superfícies em contato com o ar. Já, os valores para os filmes com GX foram de 42,3 à 47,2GU e de 20,3 à 36,8GU, para superfície em contato com a placa e em contato com o ar, respectivamente. Os valores tiveram uma grande diferença, mas, o desvio entre as medidas impediu que a análise estatística identificasse significância entre as amostras. O equipamento estando ajustado à 20° é indicado para a realização de medidas de superfícies que tenham valores de brilho superiores a 70GU. Isso permitiu justificar o alto desvio encontrado no caso dos filmes de EPL de mamona com GT ou GX, para este ângulo (MORAES et al., 2008; VILLALOBOS et al., 2005).

No entanto, quando a análise foi realizada com o ângulo de incidência em 60°, para a superfície em contato com a placa (Tabela 14), percebeu-se que a concentração de proteínas não influenciou no brilho dos filmes com GT, o valor médio obtido foi $91,2 \pm 1,9$ GU.

Enquanto que, as variações na concentração de proteínas, dos filmes com GX, provocaram diferenças significativas ($p < 0,05$). Conforme o observado na Tabela 14, o ponto 6g de proteínas/100g de SF com glioxal foi o valor mais alto para essa propriedade, os valores variaram de 91,0 à 96,2GU. Quando se avaliou o tipo de reticulante, observou-se que não houve diferenças significativas, exceto para a concentração intermediária (6g de proteínas/100g de SF), onde os filmes elaborados com GX foram mais brilhosos que os com GT.

Tabela 14: Valores de brilho amostras de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glutaraldeído e glioxal - contato com a placa.

C _{PROT}	20°		60°	
	GT (GU)	GX (GU)	GT (GU)	GX (GU)
2	50,9±1,6 ^{A,a}	42,3±6,2 ^{A,a}	92,7±1,9 ^{A,a}	92,1±1,9 ^{A,ab}
4	41,2±5,2 ^{A,a}	46,9±15,0 ^{A,a}	88,3±3,2 ^{A,a}	92,7±1,4 ^{A,ab}
6	31,8±10,7 ^{A,a}	47,2±8,0 ^{A,a}	90,2±2,2 ^{B,a}	96,2±2,1 ^{A,a}
8	50,6±12,6 ^{A,a}	42,6±4,4 ^{A,a}	92,3±0,9 ^{A,a}	91,0±1,2 ^{A,b}
10	32,9±6,5 ^{A,a}	45,4±17,2 ^{A,a}	92,5±0,5 ^{A,a}	92,6±1,2 ^{A,ab}

C_{PROT}: Concentração de proteínas em g/100g de SF; GT: glutaraldeído; GX: glioxal; GU: gloss units. A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro. a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

No estudo da superfície de contato com o ar (Tabela 15) para as medidas realizadas à 60° não se observou efeito com relação à variação da concentração proteica para nenhum dos agentes reticulantes, contudo, com relação ao tipo de reticulante as formulações com 4 e 10% de proteína apresentaram valores superiores quando adicionadas de glutaraldeído.

Tabela 15: Valores de brilho amostras de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glutaraldeído e glioxal - contato com o ar.

C _{PROT}	20°		60°	
	GT (GU)	GX (GU)	GT (GU)	GX (GU)
2	23,3±16,0 ^{A,a}	25,0±13,4 ^{A,a}	61,4±24,4 ^{A,a}	65,4±11,1 ^{A,a}
4	31,0±2,6 ^{A,a}	24,8±3,3 ^{A,a}	84,0±1,3 ^{A,a}	69,9±4,3 ^{B,a}
6	30,9±5,9 ^{A,a}	36,8±0,7 ^{A,a}	81,2±6,2 ^{A,a}	77,4±2,7 ^{A,a}
8	20,7±3,4 ^{A,a}	20,3±2,9 ^{A,a}	58,7±11,3 ^{A,a}	62,6±3,5 ^{A,a}
10	28,0±4,3 ^{A,a}	21,2±4,4 ^{A,a}	75,8±3,5 ^{A,a}	61,4±5,5 ^{B,a}

C_{PROT}: Concentração de proteínas em g/100g de SF; GT: glutaraldeído; GX: glioxal; GU: gloss units. A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro. a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

Dessa forma, os valores para a superfície em contato com a placa apresentaram-se superiores aos medidos para a superfície em contato com o ar. Isso foi atribuído ao fato de

que durante o processo de secagem, a eliminação da água leva à um rearranjo estrutural que, por sua vez, é responsável pelo surgimento de certa rugosidade e consequentemente pela diminuição do brilho na face em contato com o ar.

As medidas de brilho ainda são análises pouco realizadas nos estudos com filmes, no entanto, Alves et al. (2011), ao avaliar o brilho em filmes de gelatina/PVA com glutaraldeído, constataram que a reticulação não influenciou essa propriedade.

5.2.5. Umidade e Solubilidade em água

Em relação à umidade, que expressa a capacidade de absorção de vapor de água durante o período de acondicionamento, observou-se que não houve ($p>0,05$) efeito nem da concentração de proteínas e nem do tipo de reticulante. Ou seja, ambas as modificações químicas não foram suficientes para provocar alterações estruturais e químicas que implicassem em mudanças na higroscopicidade dos filmes. Assim, pode-se observar na Tabela 16 que a umidade dos filmes ficou em torno de 13%. Ou seja, a grande quantidade de hidróxido de sódio empregada na extração das proteínas não implicou necessariamente, na produção de filmes bastante higroscópicos.

Esse comportamento também foi observado para filmes produzidos com proteínas extraídas da torta de abóbora, onde os filmes produzidos com proteínas extraídas em pH=12 apresentaram teor de umidade em torno de 13%, mesmo sem adição de agentes reticulantes (POPOVIĆ et al., 2012). Filmes produzidos com isolado proteico de girassol (ISPG) foram mais higroscópicos, sendo que a umidade destes foi cerca de 25% (SALGADO et al., 2010). No entanto, filmes de ISPG com glutaraldeído e glioxal apresentaram umidade de 10,1 e 9,4%, respectivamente (ORLIAC et al., 2002).

Tabela 16: Valores umidade e solubilidade em água de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glutaraldeído e glioxal.

C_{PROT}	Umidade (%)		Solubilidade (%)	
	GT	GX	GT	GX
2	12,3±1,2 ^{A,a}	13,5±0,4 ^{A,a}	74,5±3,2 ^{A,ab}	47,1±1,2 ^{B,a}
4	13,1±0,6 ^{A,a}	13,7±1,1 ^{A,a}	76,3±2,5 ^{A,a}	47,2±1,3 ^{B,a}
6	13,0±0,1 ^{A,a}	13,8±0,5 ^{A,a}	76,3±0,2 ^{A,a}	42,9±0,3 ^{B,b}
8	13,1±0,9 ^{A,a}	12,8±0,8 ^{A,a}	69,3±0,3 ^{A,bc}	49,5±1,7 ^{B,a}
10	12,4±1,5 ^{A,a}	13,0±0,8 ^{A,a}	64,8±2,4 ^{A,c}	48,4±1,8 ^{B,a}

C_{PROT} : Concentração de proteínas em g/100g de SF; GT: glutaraldeído; GX: glioxal

A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

Por outro lado, observou-se nítido efeito do tipo de reticulante sobre a solubilidade em água dos filmes de EPL de mamona (Tabela 16). A solubilidade dos filmes elaborados com glioxal ficou entre 42,9 e 49,5%, e os filmes com glutaraldeído tiveram valores que foram de 64,8 à 76,3%. Portanto, os filmes elaborados com glioxal foram em média 35% menos solúveis do que os elaborados com glutaraldeído.

Diferente do obtido neste estudo, o glutaraldeído apresentou boa capacidade de redução da solubilidade em filmes elaborados com proteínas extraídas do caroço de algodão (25% em média) (MARQUIÉ et al., 1995). E ainda, em filmes de proteína de soja com genipina a solubilidade foi de 35% (GONZÁLEZ; STRUMIA; IGARZABAL, 2011).

As diferenças de comportamento dos agentes reticulantes, em relação à solubilidade em água foram condizentes com os resultados obtidos para a composição em aminoácidos do EPL da torta de mamona (Tabela 7). Isso porque, o alto teor de arginina favoreceu a interação com o glioxal. E, como o EPL mostrou-se pobre em lisina, histidina, cistina e tirosina, sendo esses os aminoácidos que estariam aptos a reagir com glutaraldeído, justifica-se assim, a alta solubilidade dos filmes com GT.

Figura 37: Solubilidade dos filmes de proteínas reticuladas com glutaraldeído.

Além disso, os filmes com glutaraldeído mostraram-se bastante frágeis (sensíveis ao toque), após as 24 horas de agitação em água, conforme se pode verificar nas ilustrações apresentadas na Figura 37a. Assim, como não era possível retirar os filmes da água sem desintegrá-los, optou-se por fazer a separação do material da água por filtração (Figura 37b).

Por outro lado, os filmes produzidos com glioxal mostraram-se íntegros durante todo o período do teste (Figura 38a e 38b), mas, por questão de padronização dos testes, a retirada desses filmes da água também foi realizada por filtração.

Figura 38: Solubilidade dos filmes de proteínas reticuladas com glioxal.

A solubilidade teórica dos filmes foi calculada em função da concentração de glicerol (25g/100g de proteínas), da concentração de agente reticulante (1g/100g de proteínas). A

partir deste cálculo foi possível verificar se houve solubilização de proteínas ao longo do tempo de imersão em água, ou se os valores de solubilidade são referentes a lixiviação do plastificante e do agente reticulante. Para estas formulações, a solubilidade teórica foi de 19,8%, sendo assim, pôde-se constatar que houve solubilização de material proteico.

5.2.6. Propriedades Mecânicas

5.2.6.1. Testes de Tração

A tensão na ruptura (TR, em MPa), alongação na ruptura (ER, em %) e o módulo de elasticidade (ME, em MPa/%) dos filmes elaborados com EPL de torta de mamona foram obtidos a partir das curvas do teste de tração. Exemplos de curvas obtidas nos testes mecânicos de tração, com os filmes produzidos com os dois agentes reticulantes em diferentes concentrações de proteínas, estão apresentados nas Figuras 39 e 40.

Figura 39: Exemplos de curvas típicas de tração para filmes de diferentes concentrações de proteínas de torta de mamona reticuladas com glicolal (GX).

Observou-se que as curvas foram típicas de filmes a base de biopolímeros com baixa concentração de plastificante, uma vez que não se observou o “ombro” (“*yield point*”) característico. Além disso, percebeu-se que o tipo de reticulante não afetou o comportamento dessas curvas, já que elas são similares para ambos reticulantes.

Figura 40: Exemplos de curvas típicas de tração para filmes de diferentes concentrações de proteínas de torta de mamona reticuladas com glutaraldeído (GT).

De maneira geral, o glioxal (5,2-6,2MPa) produziu filmes mais resistentes que o glutaraldeído (3,6-4,7MPa) (Tabela 17). Com relação ao teor de proteínas, percebe-se que os filmes com GT apresentaram discreto aumento na TR com o aumento da concentração de proteínas. E, os filmes com GX, não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), na TR quando se variou a concentração das proteínas.

Por outro lado, o glioxal (ER=60-96%) também produziu filmes com maiores valores de elongação na ruptura (ER) que o glutaraldeído (ER=28-46%), com efeitos significativos observados em relação à concentração de proteínas. Para o glioxal, a ER diminuiu com o aumento da concentração de proteínas, e com o glutaraldeído as concentrações de 6 e 8g de proteínas/100g de SF apresentaram os maiores valores para ER.

Entretanto, apesar de se ter observado efeitos estatísticos, nem o tipo de reticulante, nem a concentração de proteínas incrementaram de maneira expressiva a rigidez dos filmes ($\leq 1,5\text{MPa}/\%$).

Tabela 17: Valores de tensão na ruptura (TR), alongação na ruptura (ER) e módulo de elasticidade (ME) de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glutaraldeído e glioxal.

C_{PROT}	TR (MPa)		ER (%)		ME (MPa/%)	
	GT	GX	GT	GX	GT	GX
2	$3,9 \pm 0,2^{B, bc}$	$5,5 \pm 0,5^{A, a}$	$28,3 \pm 2,8^{B, b}$	$96,3 \pm 2,1^{A, a}$	$1,1 \pm 0,1^{A, ab}$	$1,1 \pm 0,1^{A, b}$
4	$4,7 \pm 0,1^{A, a}$	$5,2 \pm 0,7^{A, a}$	$34,6 \pm 2,8^{B, b}$	$84,6 \pm 3,3^{A, b}$	$1,4 \pm 0,2^{A, a}$	$1,1 \pm 0,2^{A, b}$
6	$3,6 \pm 0,1^{B, c}$	$6,2 \pm 0,4^{A, a}$	$46,0 \pm 1,5^{B, a}$	$86,6 \pm 1,5^{A, ab}$	$1,0 \pm 0,0^{B, b}$	$1,4 \pm 0,1^{A, ab}$
8	$3,8 \pm 0,1^{B, c}$	$5,5 \pm 0,0^{A, a}$	$43,1 \pm 2,3^{B, a}$	$57,9 \pm 3,8^{A, c}$	$1,1 \pm 0,1^{A, ab}$	$1,5 \pm 0,2^{A, a}$
10	$4,3 \pm 0,3^{B, b}$	$5,2 \pm 0,1^{A, a}$	$34,2 \pm 3,1^{B, b}$	$61,9 \pm 7,0^{A, c}$	$1,2 \pm 0,1^{A, ab}$	$1,3 \pm 0,1^{A, ab}$

C_{PROT} : Concentração de proteínas em g/100g de SF; GT: glutaraldeído; GX: glioxal

A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

A diferença de comportamento para os dois reticulantes pode ser atribuída à disponibilidade dos aminoácidos que realizaram ligações com estas substâncias. Sabe-se que, o glutaraldeído apresenta maior afinidade pela lisina e o glioxal pela arginina, outro fator importante é o tipo de ligação formada (RAYAS; HERNANDEZ; NG, 1997; MARQUIÉ et al., 1995; MICARD et al., 2000).

Em filmes elaborados com gelatina suína, a adição de glioxal, não aumentou de forma significativa nenhum dos parâmetros obtidos nos testes de tração (TR e ER), sendo que os valores foram 16 MPa e 38%, respectivamente. Já em filmes com proteínas de trigo reticuladas com glioxal, a TR atingiu valores de 10,5MPa quando adicionado 0,7% de GX, a ER foi de 149,6% e o ME foi igual aproximadamente 1,0MPa/%. Na utilização de isolado proteico de soja como matéria prima, a adição de 0,4g de glutaraldeído/5g de proteínas (8g de GT/100g de proteínas), aumentou em média 55%, tanto a TR, como a ER, em relação à

formulação sem reticulante (PARK; BAE; RHEE, 2000; CARVALHO; GROSSO, 2006; ZHANG et al., 2006).

5.2.6.2. Testes de perfuração

A força na perfuração (FP) e a deformação na perfuração (DP) foram obtidas a partir de informações fornecidas pelas curvas dos testes de perfuração. Exemplos dessas curvas obtidas com os filmes produzidos neste estudo, estão apresentados nas Figuras 41 e 42, onde foi possível observar que se trata de curvas típicas de filmes a base de biopolímeros com baixa concentração de plastificante, sem efeito aparente do tipo de reticulante e nem da concentração de proteínas.

Figura 41: Exemplos de curvas do teste de perfuração para filmes de diferentes concentrações de proteínas de torta de mamona reticuladas com glioxal (GX).

Os testes de perfuração dos filmes elaborados à base de EPL com glutaraldeído (GT) e glioxal (GX) tiveram comportamento semelhante ao observado nos testes de tração. Os filmes com GX apresentaram-se mais resistentes à perfuração do que os filmes com GT. A força na

perfuração (FP) foi, em média, 6N e 8N para glutaraldeído e glioxal respectivamente (Tabela 18).

Figura 42: Exemplos de curvas do teste de perfuração para filmes de diferentes concentrações de proteínas de torta de mamona reticuladas com glutaraldeído (GT).

Tabela 18: Valores de força na perfuração e deformação na perfuração de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glutaraldeído e glioxal.

C _{PROT}	FP (N)		DP(%)	
	GT	GX	GT	GX
2	5,4±0,1 ^{B,b}	7,7±0,4 ^{A,ab}	3,5±0,5 ^{B,a}	4,4±0,1 ^{A,a}
4	5,5±0,2 ^{B,b}	6,8±0,5 ^{A,b}	3,0±0,1 ^{B,a}	4,7±1,1 ^{A,a}
6	5,9±0,1 ^{B,ab}	6,7±0,5 ^{A,b}	3,2±0,1 ^{B,a}	5,1±0,2 ^{A,a}
8	6,0±0,2 ^{B,a}	7,6±0,2 ^{A,ab}	3,0±0,3 ^{B,a}	4,1±0,2 ^{A,a}
10	6,2±0,3 ^{B,a}	8,3±0,3 ^{A,a}	3,7±0,6 ^{B,a}	4,6±0,3 ^{A,a}

C_{PROT}: Concentração de proteínas em g/100g de SF; GT: glutaraldeído; GX: glioxal

A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

No entanto, para essas análises, o efeito da variação do teor de proteína foi diferente do observado nos testes de tração. Pois, tanto para o GT, como para o GX, a força na perfuração apresentou ligeiro aumento nas maiores concentrações. Conforme mencionado

anteriormente, para o glioxal, o maior valor para os testes de tração foi da concentração intermediária (6g de proteínas/100g de SF).

A deformação na perfuração (DP) também foi superior para as amostras elaboradas com glioxal (em média 4%), quando comparada a amostras com glutaraldeído (média 3%). Sendo que a concentração de proteína não apresentou efeito significativo ($p>0,05$) independente do tipo de reticulante. Observando um discreto aumento na formulação de 6g de proteínas/100g de SF com glioxal.

O teste de perfuração não é uma ferramenta muito comum nos estudos com filmes, por isso, não se encontram muitas informações na literatura. Marquié et al. (1995) observaram que, em filmes de proteínas extraídas do caroço de algodão reticuladas com glutaraldeído, os valores de FP foram superiores aos obtidos nesse estudo (7N). Alves et al. (2011) obtiveram valores de FP=11,6N e a DP= 24,7%, em blendas de gelatina e PVA reticuladas com glutaraldeído.

Para dar continuidade nos estudos, escolheu-se uma concentração de proteína e um agente reticulante. Baseado nos resultados obtidos até o presente momento, considerando-se que não houve diferenças para os parâmetros: espessura, microscopia, propriedades óticas e umidade. A escolha foi baseada nas propriedades mecânicas e solubilidade em água.

Avaliando as informações para a concentração de proteínas, percebe-se que a concentração de 6g de proteínas/100g de SF foi a formulação que apresentou os melhores resultados para os testes de tração. Além disso, essa concentração também foi a com menor solubilidade em água, sendo este um parâmetro importante para o emprego na agricultura. E, com relação ao agente reticulante, observou-se que o glioxal teve destaque para essas propriedades.

Assim, foram escolhidos como agente reticulante o glioxal, e concentração de proteínas 6g/100g de SF.

5.3. Estudo do efeito da concentração do glioxal sobre as propriedades físicas dos filmes

O estudo da concentração do glioxal foi realizado comparando-se uma formulação controle, chamada de concentração zero de glioxal e sete concentrações diferentes deste agente reticulante (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0 e 5,0g de glioxal/100g de proteínas). Foi avaliado o efeito das diferentes formulações na espessura, aspecto visual, microestrutura, propriedades óticas, umidade, solubilidade, permeabilidade e propriedades mecânicas (tração e perfuração).

5.3.1. Aspecto visual

Avaliando-se o aspecto visual dos filmes elaborados com EPL com glioxal em diferentes concentrações, não foi possível observar diferenças entre as formulações (Figura 43), bem como dos filmes preparados no estudo precedente.

Figura 43: Filmes elaborados com proteínas reticuladas com glioxal em diferentes concentrações.

5.3.2. Espessura

As espessuras dos filmes elaborados com as diferentes concentrações de glioal não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p>0,05$), o valor médio foi de $0,121\pm0,001$ mm (Tabela 19). Como, neste caso, não houve variação da concentração proteica, constatou-se, portanto, que a reticulação não influenciou na espessura dos filmes.

Além disso, a adição do glioal, independentemente da concentração, não alterou o aspecto visual da solução filmogênica, diferente do observado por Carvalho e Grosso (2004) em soluções de gelatina reticuladas com glioal, onde houve nítido aumento da viscosidade com o aumento da concentração de reticulante.

Tabela 19: Resultados para espessura dos filmes produzidos com proteínas modificadas com diferentes concentrações de glioal (GX).

C_{GLIOXAL}	Espessura (mm)
0	$0,122\pm0,002^a$
0,2	$0,121\pm0,002^a$
0,4	$0,122\pm0,002^a$
0,6	$0,121\pm0,003^a$
0,8	$0,122\pm0,004^a$
1,0	$0,121\pm0,003^a$
2,0	$0,118\pm0,002^a$
5,0	$0,120\pm0,003^a$

C_{GLIOXAL} : Concentração de glioal em g/100g de proteína

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

5.3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura dos filmes elaborados com EPL com diferentes concentrações de glioal foi estudada nas superfícies em contato com o ar e com a placa (Figuras 44 e 45). Além disso, foi analisado o corte transversal (Figura 46), utilizando-se a técnica da

criofratura. Para as análises das superfícies, assim como no estudo anterior, o aumento foi de 1000 vezes, já para estrutura interna (criofratura), o aumento foi de 2000 vezes.

Figura 44: Micrografias das superfícies em contato com o ar dos filmes de proteínas reticuladas com glioxal em diferentes concentrações diferentes. Aumento de 1000x.
(a) 0% GX; (b) 0,2% GX; (c) 0,4% GX; (d) 0,6% GX; (e) 0,8% GX; (f) 1,0% GX; (g) 2,0% GX; (h) 5,0% GX.

Observou-se a presença das mesmas partículas na face em contato com o ar, independente da formulação. As mesmas frações foram observadas na face em contato com a placa, e, como observado anteriormente, estas apareceram em menor quantidade. Dessa forma, sugeriu-se que, também nesse caso, a desidratação dos filmes provocou um fenômeno

de elutriação que promoveu a migração dessas partículas para a face em contato com o ar de secagem.

Tampouco, observou-se a formação de aglomareos relacionados com o aumento da concentração do agente reticulante, como para filmes proteínas de soja reticuladas com genipina (GONZÁLEZ; STRUMIA; IGARZABAL, 2011).

Figura 45: Micrografias das superfícies em contato com a placa dos filmes de proteínas reticuladas com glioxal em diferentes concentrações diferentes. Aumento de 1000x.

(a) 0% GX; (b) 0,2% GX; (c) 0,4% GX; (d) 0,6% GX; (e) 0,8% GX; (f) 1,0% GX; (g) 2,0% GX; (h) 5,0% GX.

Figura 46: Micrografias das criofraturas dos filmes EPL reticulado com glicol em diferentes concentrações. Aumento de 2000x.

(a) 0% GX; (b) 0,2% GX; (c) 0,4% GX; (d) 0,6% GX; (e) 0,8% GX; (f) 1,0% GX; (g) 2,0% GX; (h) 5,0% GX.

Carvalho e Grosso (2006), trabalhando com filmes de gelatina reticulados com formaldeído e glicol, observaram que os filmes sem reticulação apresentavam descontinuidades na estrutura que poderiam ser relacionadas ao processo de secagem, entretanto, os filmes com formaldeído apresentaram uma matriz bastante coesa, com perda parcial de orientação, verificando-se um certo grau entrelaçamento com orientação longitudinal.

O filme de gelatina reticulada com glicol, também apresentou coesão na matriz, mas com a presença de aglomerados dentro da rede polimérica, sendo que para este caso o formaldeído originou uma melhor estrutura (CARVALHO; GROSSO, 2006).

5.3.4. Propriedades óticas

5.3.4.1. Cor e Opacidade

As análises de cor e opacidade foram realizadas tanto na superfície do material que permaneceu em contato com o suporte, como na superfície em que ficou em contato com o ar de secagem (Tabelas 20 e 21). Avaliou-se o efeito da concentração de glioxal e se houve diferença significativa entre os lados dos filmes.

Observou-se que não houve diferença significativa ($p>0,05$) para nenhum dos parâmetros avaliados. Os valores médios para os padrões L^* , a^* e b^* foram $17,1\pm2,0$, $29,2\pm0,7$ e $27,2\pm3,2$, respectivamente. Os valores obtidos são bastante próximos aos valores do estudo anterior (Tabelas 10, 11, 12 e 13). Assim, observou-se que nem a concentração de glioxal, nem a superfície de contato apresentam quaisquer efeitos sobre os padrões relacionados às propriedades ópticas.

Os valores de L^* , a^* e b^* obtidos foram semelhantes, com isso, não é possível atribuir a coloração (ΔE^*) a um parâmetro, ao contrário do obtido para filmes de proteínas de soja reticuladas com glutaraldeído, onde, com o aumento da concentração do agente reticulante obteve-se diminuição nos parâmetros L^* e a^* e aumento dos valores de b^* , predominando a cor amarela (RAYAS; HERNANDEZ; NG, 1997; PARK; BAE; RHEE, 2000). Nesse estudo, a variação da concentração do glioxal não implicou em diferença significativa ($p>0,05$) para a diferença de cor total (ΔE^*), o valor médio ficou a cerca de $43,5\pm3,2$ (Tabela 21).

Tabela 20: Valores dos parâmetros L*, a* e b* para as superfícies em contato com a placa e com o ar de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glicoxal.

C _{GLIOXAL}	L*		a*		b*	
	PL	AR	PL	AR	PL	AR
0	21,5±4,4 ^{Aa}	21,0±5,9 ^{Aa}	30,2±0,7 ^{Aa}	30,0±1,0 ^{Aa}	33,8±6,6 ^{Aa}	33,7±9,2 ^{Aa}
0,2	18,2±3,8 ^{Aa}	17,4±3,2 ^{Aa}	29,4±3,0 ^{Aa}	29,5±1,9 ^{Aa}	28,4±7,6 ^{Aa}	27,5±5,1 ^{Aa}
0,4	15,8±1,2 ^{Aa}	14,0±0,8 ^{Aa}	28,1±1,5 ^{Aa}	28,4±1,1 ^{Aa}	24,6±2,2 ^{Aa}	23,0±1,6 ^{Aa}
0,6	15,1±1,2 ^{Aa}	16,9±1,6 ^{Aa}	28,2±1,1 ^{Aa}	29,4±1,1 ^{Aa}	24,1±1,7 ^{Aa}	27,2±2,8 ^{Aa}
0,8	17,0±3,2 ^{Aa}	17,2±2,9 ^{Aa}	29,1±1,3 ^{Aa}	29,8±1,1 ^{Aa}	27,1±4,5 ^{Aa}	28,3±4,8 ^{Aa}
1,0	17,6±1,7 ^{Aa}	18,5±3,3 ^{Aa}	29,0±0,5 ^{Aa}	29,5±0,9 ^{Aa}	27,5±3,5 ^{Aa}	29,6±6,6 ^{Aa}
2,0	16,1±1,4 ^{Aa}	15,8±1,5 ^{Aa}	28,7±1,6 ^{Aa}	29,3±0,8 ^{Aa}	25,7±2,0 ^{Aa}	25,9±2,2 ^{Aa}
5,0	15,2±3,8 ^{Aa}	15,7±3,1 ^{Aa}	30,1±2,1 ^{Aa}	28,8±2,8 ^{Aa}	24,5±5,9 ^{Aa}	24,0±6,0 ^{Aa}

C_{GLIOXAL}: Concentração de glicoxal em g/100g de proteína; PL: superfície em contato com a placa; AR: superfície em contato com o ar de secagem.

A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

Alves et al (2011) estudaram a reticulação de blendas de gelatina/PVA com glutaraldeído, esses autores observaram, assim como Carvalho e Grosso (2006) em filmes de gelatina reticulada com formaldeído e glicoxal, o desenvolvimento de uma coloração amarelada com o aumento da concentração dos agentes reticulantes. Por outro lado, Micard et al. (2000) não observaram o desenvolvimento da coloração amarela nos filmes de proteínas de trigo reticuladas com formaldeído, e não foi possível relacionar a ocorrência da reação de reticulação com os parâmetros de cor como nos trabalhos mencionados para gelatina.

A opacidade dos filmes (15,9±3,3) também não variou de acordo com o teor de glicoxal adicionado, nem com a superfície estudada. Os valores obtidos são semelhantes aos filmes de gelatina reticulada com formaldeído e com glicoxal, e também nesses casos, este parâmetro não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) (CARVALHO; GROSSO, 2006).

Tabela 21: Valores dos parâmetros DE e opacidade para as superfícies em contato com a placa e com o ar de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glicoxal.

$C_{GLIOXAL}$	ΔE^*		Opacidade	
	PL	AR	PL	AR
0	50,3±6,9 ^{Aa}	50,0±9,4 ^{Aa}	12,3±3,1 ^{Aa}	11,1±3,8 ^{Aa}
0,2	44,8±8,4 ^{Aa}	44,0±5,7 ^{Aa}	17,4±6,7 ^{Aa}	16,3±1,8 ^{Aa}
0,4	40,6±2,7 ^{Aa}	39,2±2,0 ^{Aa}	18,5±1,2 ^{Aa}	17,2±4,8 ^{Aa}
0,6	40,0±2,1 ^{Aa}	43,5±3,1 ^{Aa}	19,3±2,1 ^{Aa}	15,7±1,5 ^{Aa}
0,8	43,3±4,9 ^{Aa}	44,7±4,9 ^{Aa}	15,8±1,0 ^{Aa}	11,9±3,2 ^{Aa}
1,0	43,7±3,1 ^{Aa}	45,8±6,2 ^{Aa}	15,3±3,6 ^{Aa}	12,6±5,6 ^{Aa}
2,0	41,8±2,7 ^{Aa}	42,2±2,4 ^{Aa}	15,9±2,3 ^{Aa}	13,2±1,2 ^{Aa}
5,0	41,8±6,4 ^{Aa}	40,7±6,7 ^{Aa}	17,5±5,7 ^{Aa}	24,1±9,4 ^{Aa}

$C_{GLIOXAL}$: Concentração de glicoxal em g/100g de proteína; PL: superfície em contato com a placa; AR: superfície em contato com o ar de secagem.

A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

5.3.4.2. *Brilho*

Assim como para as análises de cor e opacidade, as amostras foram avaliadas em ambas as faces. Houve uma alta variação para as medidas realizadas com o equipamento ajustado em 20° (Tabela 22). Os valores variaram de 35,7 à 61,8, mas com um desvio padrão superior a 10%, em média.

Entretanto, à 60° o desvio foi menor, então, optou-se por discorrer sobre os resultados obtidos para esse ângulo (Tabela 22). Percebeu-se que a concentração de glicoxal não apresentou efeito significativo ($p>0,05$), para nenhum dos lados (PL= 89,7±1,9GU e AR=77,3±3,3GU).

Tabela 22: Valores de brilho (20° e 60°GU) para as superfícies em contato com a placa e com o ar de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glicoxal.

C _{GLIOXAL}	20°		60°	
	PL (GU)	AR (GU)	PL (GU)	AR (GU)
0	35,7±14,3 ^{Ab}	27,5±8,6 ^{Aa}	88,3±2,5 ^{Aa}	77,0±3,8 ^{Ba}
0,2	43,9±5,7 ^{Aab}	29,4±1,5 ^{Ba}	89,4±3,8 ^{Aa}	75,8±6,6 ^{Ba}
0,4	42,1±9,8 ^{Aab}	36,3±12,0 ^{Aa}	88,8±3,3 ^{Aa}	80,5±5,3 ^{Aa}
0,6	48,4±2,5 ^{Aab}	29,1±4,2 ^{Ba}	91,5±1,0 ^{Aa}	80,0±8,7 ^{Aa}
0,8	41,2±3,2 ^{Aab}	29,5±4,1 ^{Ba}	86,7±2,6 ^{Aa}	79,6±3,0 ^{Ba}
1,0	45,1±6,4 ^{Aab}	29,7±4,8 ^{Ba}	89,6±6,0 ^{Aa}	76,8±4,6 ^{Ba}
2,0	61,8±7,1 ^{Aa}	29,6±3,8 ^{Ba}	93,0±2,0 ^{Aa}	78,2±5,2 ^{Ba}
5,0	52,2±1,5 ^{Aab}	27,9±3,8 ^{Ba}	90,3±3,0 ^{Aa}	70,2±2,5 ^{Ba}

C_{GLIOXAL}: Concentração de glicoxal em g/100g de proteína; PL: superfície em contato com a placa; AR: superfície em contato com o ar de secagem; GU: gloss units.

A,B letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

No entanto, houve diferença ($p < 0,05$), entre a superfície em contato com a placa (PL), e a em contato com o ar (AR). O lado PL foi mais brilhoso que o lado AR, uma vez que os valores foram superiores, aproximadamente 90 e 80GU, respectivamente. Portanto, corroborando com o observado nas micrografias, o processo de secagem influenciou nas características das superfícies dos filmes. Alves et al. (2011) observaram que a incorporação do agente reticulante não provocou nenhum efeito sobre o brilho de blendas de gelatina e PVA reticuladas com glutaraldeído. Moraes et al. (2008) constataram que o brilho não foi uma resposta que variou de acordo com modificações químicas. Sendo relacionada ao polimento da amostra. Assim, pode-se afirmar que quanto maior o valor da resposta para essas medidas, mais polida estava a superfície.

5.3.5. Umidade e Solubilidade em água

A umidade dos filmes não foi afetada pela variação na concentração do agente reticulante (Tabela 23). O valor ficou em torno de 14%, em média, sendo este o valor típico de filmes à base de proteínas (SOBRAL; HABITANTE, 2001; SOBRAL et al., 2001; SOBRAL, 2000; THOMAZINE; CARVALHO; SOBRAL, 2005; VANIN et al., 2005). Ou seja, o aumento na concentração do glicoxal não implicou em modificação nas características higroscópicas dos filmes.

Tabela 23: Valores de umidade e solubilidade em água dos filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glicoxal em diferentes concentrações.

C _{GLIOXAL}	Umidade (%)	Solubilidade (%)
0	16,1±2,8 ^a	81,8±8,4 ^a
0,2	14,4±0,7 ^a	59,5±0,2 ^b
0,4	14,5±0,9 ^a	57,0±0,5 ^b
0,6	14,2±1,6 ^a	54,4±0,2 ^{bc}
0,8	13,3±2,4 ^a	53,2±1,0 ^{bc}
1,0	12,9±0,4 ^a	45,9±0,2 ^{cd}
2,0	14,6±1,7 ^a	43,3±0,9 ^d
5,0	14,4±1,0 ^a	39,7±0,5 ^d

C_{GLIOXAL}: Concentração de glicoxal em g/100g de proteína

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

González, Strumia e Igarzabal (2011), em filmes de proteínas de soja reticuladas com genipina, observaram que a concentração do agente reticulante, também, não provocou alteração significativa na umidade dos filmes (umidade média=27%). Popović et al. (2012) trabalharam com filmes à base de proteínas de torta de abóbora sem reticulação, e obtiveram umidade em torno de 13%. Orliac et al. (2002) estudaram a umidade de filmes de isolado proteico de girassol com formaldeído, glutaraldeído e glicoxal, que tiveram teores de umidade 9,3, 10,1 e 9,4%, respectivamente.

Para os testes de solubilidade em água, os filmes de EPL com glioxal foram cortados em discos de 2cm (Figura 47a). Imediatamente após o contato com a água contraíram-se formando uma espécie de cilindro (Figura 47b), durante os primeiros 10 minutos. Decorrido este tempo, os círculos entumeceram (Figura 47c) e permaneceram íntegros, mesmo após 24 horas de agitação (Figura 47d).

Figura 47: Etapas do teste de solubilidade para filmes de proteínas de torta de mamona.

Diferentemente do observado para a umidade, a concentração do glioxal apresentou efeito estatístico significativo ($p < 0,05$) sobre a solubilidade dos filmes (Tabela 23). Houve uma redução considerável na solubilidade em água (49%), com o aumento da concentração do agente reticulante. Sendo que a solubilidade foi de aproximadamente 82% para a formulação controle e de 40% para a formulação com maior teor de glioxal.

A reticulação com formaldeído em filmes de isolado proteico de soja também induziu a diminuição desta propriedade, cerca de 60% de redução (GHORPADE et al., 1995).

González, Strumia e Igarzabal (2011) observaram que a reação das proteínas de soja com a genipina também foi eficiente na diminuição da solubilidade dos filmes (redução de 53%).

Filmes elaborados com proteínas de algodão, sem a adição de agentes reticulantes (gossipol, formaldeído e glutaraldeído), foram 100% solúveis. No entanto, observou-se um decréscimo considerável na solubilidade dos filmes reticulados com as três substâncias (MARQUIÉ et al., 1995). Entretanto, Alves et al. (2011), observaram que, a adição de glutaraldeído em blendas de PVA/gelatina, não diminuiu de forma expressiva a solubilidade dos filmes.

Em filmes de gelatina, Carvalho e Grosso (2006), obtiveram bons resultados na solubilidade dos filmes com glioxal (cerca de 30% de redução). Mas, diferente do observado neste estudo, o aumento da concentração de glioxal não acarretou diminuição progressiva da solubilidade. Spanneberg et al. (2010) constataram que, para películas de gelatina, existe uma concentração limite para a adição do glioxal (4% de glioxal/100g de SF), após esse valor o aumento da concentração de glioxal implicou em filmes mais solúveis.

Hernández-Muñoz, Villalobos e Chiralt (2004) não constataram redução na solubilidade dos filmes de glutenina reticulada com glioxal, independente da concentração. Contudo, observou-se que, a glutenina, sem adição de reticulantes, apresentou baixa solubilidade em água. Então, nesse caso, a solubilidade foi relacionada com lixiviação do glicerol, ou seja, o rearranjo estrutural que ocorreu devido à adição do glioxal, não foi capaz de reter o glicerol dentro da matriz polimérica.

Assim, observou-se que as proteínas da torta de mamona foram bastante solúveis em água (82%), não podendo ser utilizadas na elaboração de filmes sem adição de agentes que atenuem essa característica. Sendo que, a reticulação com o glioxal apresentou um resultado satisfatório na diminuição da solubilidade dos filmes de EPL de mamona.

5.3.6. Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes não foi afetada significativamente ($p>0,05$) pelo aumento da concentração de glioxal (Tabela 24). A adição do agente reticulante não provocou alterações expressivas nessa propriedade, sendo que, o valor de permeabilidade foi aproximadamente de $0,55\text{g.mm/h.m}^2.\text{kPa}$, para todos os ensaios.

A fim de comprovar se houve efeito da espessura dos filmes, calculou-se a taxa de permeação dos filmes (Tabela 24), que é a permeabilidade dividida pela espessura das amostras utilizadas na realização desses testes. Tampouco, foi observado efeito da concentração de glioxal sobre a taxa de permeação, e o valor médio foi $4,5\text{g/h.m}^2.\text{kPa}$. Portanto, tratou-se de efeito intrínseco.

Tabela 24: Valores de permeabilidade e taxa de permeação dos filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glioxal em diferentes concentrações.

C_{GLIOXAL}	Permeabilidade ($\text{g.mm/h.m}^2.\text{kPa}$)	Taxa de permeação ($\text{g/h.m}^2.\text{kPa}$)
0	$0,52\pm0,03^a$	$4,2\pm0,1^a$
0,2	$0,51\pm0,08^a$	$4,1\pm0,7^a$
0,4	$0,62\pm0,05^a$	$4,7\pm0,5^a$
0,6	$0,56\pm0,03^a$	$4,7\pm0,3^a$
0,8	$0,53\pm0,05^a$	$4,5\pm0,6^a$
1,0	$0,56\pm0,04^a$	$4,7\pm0,3^a$
2,0	$0,59\pm0,06^a$	$4,8\pm0,3^a$
5,0	$0,51\pm0,06^a$	$4,3\pm0,4^a$

C_{GLIOXAL} : Concentração de glioxal em g/100g de proteína

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

Nos filmes elaborados com isolado proteico de soja reticulado com genipina, a PVA, a priori, diminuiu com o aumento da concentração do reticulante, mas observou-se que para concentrações superiores a 1%, ocorre o inverso, ou seja, a PVA aumenta. Isso porque, em

altas concentrações, a genipina, não atingiu o máximo da reticulação, deixando espaços na matriz por onde há permeação de água (GONZÁLEZ; STRUMIA; IGARZABAL, 2011).

Ghorpade et al. (1995) utilizaram o formaldeído como reticulante para produção de filmes de proteínas de soja e obtiveram uma redução inferior a 10% na permeabilidade dos filmes. Micard et al. (2000), com o mesmo reticulante, trabalhando com filmes de proteínas de trigo, alcançaram uma redução de 12% da PVA. Carvalho e Grosso (2004, 2006) estudaram filmes de gelatina reticulados com glioxal, e, obtiveram em média, uma redução de 12% na PVA, quando comparada aos filmes sem agente reticulante.

Hernández-Muñoz, Villalobos e Chiralt (2004) observaram que a PVA dos filmes de glutenina diminuiu em média 30% com de agentes reticulantes. Essa redução foi independente do agente utilizado (formaldeído, glutaraldeído e glioxal). Entretanto, em concentrações superiores à 2%, não houve efeito significativo sobre a PVA dos filmes.

Esperava-se que a reação com um aldeído de baixo peso molecular, como o glioxal, atenuasse a permeabilidade ao vapor de água dos filmes, visto que, o aumento da reticulação da rede polimérica com essas substâncias pode diminuir o volume livre da matriz, diminuindo a taxa de difusão através dos filmes (HERNÁNDEZ-MUÑOZ; VILLALOBOS; CHIRALT, 2004). No entanto, avaliando-se as micrografias obtidas, tendo em vista a presença de partículas nas superfícies de todas as formulações, sugere-se que estas podem ser responsáveis pela permeação da água. Desta forma, o possível efeito da reação de reticulação foi coibido pela heterogeneidade da matriz.

Ainda que os resultados não tenham apresentado variação com o aumento da concentração do reticulante, os filmes de proteínas de mamona foram menos permeáveis que os filmes de isolado proteico de soja reticulado com formaldeído ($PVA=0,79 \times 10^{-9} \text{ g/m.s.Pa} \Leftrightarrow 2,84 \text{ g.mm/h.m}^2.\text{kPa}$) e isolado proteico de soja com genipina ($PVA=1,72 \times 10^{-10} \text{ g.m/Pa.s.m}^2 \Leftrightarrow 0,62 \text{ g.mm/h.m}^2.\text{kPa}$) (GHORPADE et al., 1995; GONZÁLEZ; STRUMIA; IAGRZABAL,

2011). Entretanto, estes filmes apresentaram permeabilidade ao vapor de água superior aos filmes de proteínas de trigo reticuladas com formaldeído ($PVA=6,7 \times 10^{-12} \text{ mol/m.s.Pa} \Leftrightarrow 0,43 \text{ g.mm/h.m}^2.\text{kPa}$), aos filmes de glutenina com glioxal ($3,1 \times 10^{-11} \text{ g.m/m}^2.\text{s.Pa} \Leftrightarrow 0,12 \text{ g.mm/h.m}^2.\text{kPa}$) e aos filmes de gelatina reticulada com glioxal ($0,174 \text{ g.mm/h.m}^2.\text{kPa}$) (CARVALHO; GROSSO, 2004, 2006; HERNÁNDEZ-MUÑOZ; VILLALOBOS; CHIRALT, 2004; MICARD et al., 2000).

5.3.7. Propriedades Mecânicas

5.3.7.1. Testes de tração

Exemplos de curvas típicas obtidos nos ensaios de tração dos filmes de proteínas extraídas da torta de mamona estão apresentados na Figura 48. Percebe-se que até a concentração de 1% as curvas são bastante semelhantes, com uma deformação elástica inicial acompanhada de um aumento na tensão, seguida de uma tensão constante à medida que o filme se deforma até a ruptura. Todavia, a partir de 2g de glioxal/100g de proteínas, existe uma mudança de comportamento, observando-se que desde o início da deformação plástica, a tensão continua aumentando a medida que a amostra se deforma.

O aumento da concentração de glioxal apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) sobre tensão na ruptura (TR) para os filmes de EPL (Tabela 25). O valor da TR para o filme sem o agente reticulante foi de 3,4MPa, enquanto que, para o filme com 5% de glioxal (g/100g de proteínas), a TR foi de 8,9MPa, ou seja, um aumento de 160%.

De maneira geral, o mesmo comportamento foi observado para a elongação na ruptura (ER), sendo que os filmes com altos teores de glioxal apresentaram uma grande deformação antes de seu rompimento.

Figura 48: Exemplos de curvas de tração – efeito de concentração de glicoxal (GX).

Tabela 25: Valores de tensão na ruptura, elongação na ruptura e módulo de elasticidade de filmes de proteínas modificadas com glicoxal em diferentes concentrações.

C_{GLIOXAL}	TR (MPa)	ER (%)	ME (MPa/%)
0	$3,4 \pm 0,3^c$	$59,6 \pm 3,7^{cd}$	$0,8 \pm 0,1^c$
0,2	$4,0 \pm 0,2^c$	$39,0 \pm 5,0^d$	$0,8 \pm 0,0^c$
0,4	$4,4 \pm 0,3^c$	$42,4 \pm 6,2^{cd}$	$0,8 \pm 0,1^c$
0,6	$5,5 \pm 0,2^b$	$60,7 \pm 3,7^{cd}$	$1,3 \pm 0,1^a$
0,8	$5,7 \pm 0,2^b$	$62,2 \pm 15,7^{cd}$	$1,0 \pm 0,1^{abc}$
1,0	$6,4 \pm 0,1^b$	$71,3 \pm 8,0^{bc}$	$1,2 \pm 0,1^{ab}$
2,0	$6,5 \pm 0,4^b$	$93,8 \pm 0,4^{ab}$	$0,9 \pm 0,2^{bc}$
5,0	$8,9 \pm 0,7^a$	$110,2 \pm 2,3^a$	$0,7 \pm 0,2^c$

C_{GLIOXAL} : Concentração de glicoxal em g/100g de proteínas

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

Com relação ao módulo de elasticidade, embora exista efeito estatístico significativo ($p < 0,05$), as variações foram bastante discretas, não existindo diferenças importantes entre os filmes sem agente reticulante e os filmes elaborados com a maior concentração de glicoxal (5g/100g de proteínas).

Orliac et al. (2002) estudaram as propriedades mecânicas de filmes termo moldados, à base de isolado proteico de girassol, e obtiveram resultados de TR de 5,2MPa e ER de 40%,

utilizando glioxal como agente reticulante. Ghorpade et al. (1995) chegaram à um aumento de 228% na TR em relação a formulação controle de filmes de proteínas de sojas reticuladas com formaldeído. Park, Bae e Rhee (2000) utilizaram o glutaraldeído como reticulante de proteínas de soja, o acréscimo no teor de GT, provocou aumento tanto na TR, como na ER, que foram 14,89MPa e 71,25% respectivamente. Entretanto, Vaz et al. (2005), observaram que a adição de glioxal causou diminuição da tensão e alongação na ruptura e no módulo elástico de filmes extrusados à base de proteínas de soja.

A conduta de agentes reticulantes atuando como plastificantes, em altas concentrações, foi observada para a genipina em filmes de proteínas de soja. Nesse caso, os parâmetros relacionados ao teste de tração aumentaram até a concentração de 1%. Após esse valor, um pequeno acréscimo implicou na diminuição na TR, ER e ME (GONZÁLEZ; STRUMIA; IGARZABAL, 2011).

Zhang et al. (2006), estudando filmes de proteínas de trigo reticuladas com glioxal, obtiveram um aumento de 198% para TR e 134% a ER, e sem qualquer alteração para o ME. Micard et al (2000) observaram que, filmes de proteínas de trigo reticuladas com formaldeído, tiveram um incremento de aproximadamente 300% tanto a TR, como o ME. Por outro lado, esse reagente causou uma diminuição na ER (62%).

Carvalho e Grosso (2006) estudaram o efeito da concentração de formaldeído (FM) e glioxal (GX) em filmes de gelatina, e observaram que o aumento na TR foi mais expressivo para o FM (em média, 52%), que para o GX (em média, 20%). Com relação à ER, tanto os filmes com formaldeído, como os filmes com glioxal, apresentaram uma discreta diminuição na ER (cerca de 3%).

Hernández-Muñoz, Villalobos e Chiralt (2004), quando compararam o efeito de três agentes reticulantes sobre a TR e a ER de filmes de glutenina, constataram que a adição dessas substâncias implicou em aumento da TR em 133, 54 e 33%, respectivamente para

formaldeído, glutaraldeído e glioxal. Enquanto que, esses mesmos compostos não apresentaram efeito na ER.

Na maioria dos estudos, os tratamentos com formaldeído apresentam os melhores resultados, isso ocorre devido à sua baixa especificidade, ou seja, ele é capaz de reagir com grupo amina da lisina e ainda com os resíduos laterais da cistina, tirosina, histidina, triptofano e arginina, contudo, sua alta toxicidade, o colocou em desuso (HERNÁNDEZ-MUÑOZ; VILLALOBOS; CHIRALT, 2004).

5.3.7.2. Testes de perfuração

Exemplos de curvas obtidas nos testes de perfuração, para os ensaios referentes à esse estudo, encontram-se na Figura 49. Tratam-se, assim como no estudo precedente, de curvas típicas de biopolímeros com baixo teor de plastificante, sendo que as curvas são bastante semelhantes.

Figura 49: Exemplos de curvas de perfuração – efeito de concentração de glioxal (GX).

O desempenho dos filmes nos testes de perfuração foi semelhante ao observado nos testes de tração. A força na perfuração (FP) aumentou com o aumento da concentração do glicolal (Tabela 26). A deformação (DP) também apresentou comportamento semelhante.

Os maiores valores de FP e DP foram para a maior concentração de glicolal (5g de GX/100g de SF), 11,6 N e 5,2%, respectivamente. Em relação à formulação controle houve um aumento de 127% na FP e 63% na DP. Os valores de FP foram semelhantes aos encontrados para blendas de gelatina/PVA reticuladas com glutaraldeído (FP=11,6N), mas essas películas foram mais deformáveis que os filmes de proteínas de torta de mamona (DP=24,7N) (ALVES et al., 2011).

Tabela 26: Valores de força na perfuração e deformação na perfuração de filmes de proteínas liofilizadas modificadas com glicolal em diferentes concentrações.

C_{GLIOXAL}	FP (N)	DP (%)
0	5,1±0,2 ^d	3,2±0,1 ^b
0,2	5,6±0,5 ^{cd}	3,4±0,5 ^{ab}
0,4	6,1±0,4 ^{cd}	3,6±0,6 ^{ab}
0,6	6,8±0,8 ^c	4,4±0,9 ^{ab}
0,8	6,8±0,6 ^c	4,5±1,0 ^{ab}
1,0	6,8±0,1 ^c	5,2±0,9 ^a
2,0	8,9±0,5 ^b	4,3±0,3 ^{ab}
5,0	11,6±0,5 ^a	5,2±0,1 ^a

C_{GLIOXAL} : Concentração de glicolal em g/100g de proteínas

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa para o mesmo parâmetro.

Em filmes elaborados com proteínas extraídas do caroço de algodão reticuladas com glicolal, a FP foi igual a 6N. Em outro estudo, com as proteínas oriundas do farelo desengordurado do algodão reticuladas com glutaraldeído e formaldeído, a FP foi equivalente à 7N e 3,5N, respectivamente (MARQUIÉ et al., 1995; MARQUIÉ et al., 1997).

Como já mencionado anteriormente, não são muito comuns estudos contemplando propriedades mecânicas sob o ponto de vista dos testes de perfuração. A maioria dos trabalhos

aborda somente estas propriedades a partir dos resultados obtidos para os testes de tração. Entretanto, devido a boa reprodutibilidade e a coerência das informações fornecidas por esses ensaios, esses se tornam boas ferramentas na determinação das propriedades mecânicas.

A partir dos estudos realizados foram escolhidas as concentrações dos reagentes para elaboração do filme com as melhores propriedades. Como a variação da concentração de reticulante não causou efeitos sobre a espessura, as propriedades óticas, microscopia (MEV), umidade e tampouco sobre a permeabilidade ao vapor de água(PVA), mais uma vez as características determinantes foram solubilidade em água e propriedades mecânicas.

O teor de glioxal que aliou boas propriedades mecânicas à baixa solubilidade em água foi de 5g/100g de proteínas. Assim, a formulação escolhido como aquela que promoveu filmes com as melhores características foi a elaborada com as seguintes concentrações: 6g de proteínas/100g de SF, 5g de glioxal/100g de proteínas e 25g de glicerol/100g de proteínas.

5.4. Caracterização dos filmes produzidos com a melhor formulação

Além das análises realizadas no estudo anterior, nesse tópico constam outros ensaios que forneceram informações primordiais sobre o filme elaborados com os reagentes e concentrações estabelecidas nos estudos precedentes (Figura 50). Assim, foi realizada uma compilação das características já obtidas (Tabela 27).

Tabela 27: Caracterizações dos filmes elaborados com a melhor formulação.

Propriedades	Valores
Espessura (mm)	0,120±0,003
ΔE^*	PL=41,8±6,4; AR=40,7±6,7
Opacidade	PL=17,5±5,7; AR=24,1±9,4
Brilho (60°)	PL=90,3±3,0; AR=70,2±2,5
Umidade (%)	14,4±1,0
Solubilidade em água (%)	39,7±0,5
PVA (g.mm/h.m ² .kPa)	0,51±0,06
Tensão na ruptura (MPa)	8,9±0,7
Elongação na ruptura (%)	110,2±2,3
Módulo de elasticidade (MPa/%)	0,7±0,2
Força na perfuração (N)	11,6±0,5
Deformação (%)	5,2±0,1

PL: superfície em contato com a placa; AR: superfície em contato com o ar. PVA=Permeabilidade ao vapor de água

Figura 50: Esquema das concentrações dos reagentes para obtenção do filme referente à melhor formulação.

5.4.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias das superfícies e da criofratura dos filmes do EPL com glioxal encontram-se na seção 5.3.3 (Figuras 44, 45 e 46). Nesse tópico, analisou-se a seção transversal de uma amostra do teste de tração após a ruptura.

Figura 51: Micrografias da ruptura do teste de tração do filme da torta de mamona. (a) 1000x, (b) 4000x.

Observa-se que a estrutura é bastante irregular (Figura 51a), apresentando algumas cavidades (Figura 51b). As mesmas partículas encontradas na superfície dos filmes são percebidas na estrutura interna, diferente do visto na criofratura. Essas deformidades vistas nas micrografias do teste de tração podem ter ocorrido em decorrência da grande elongação

dos filmes antes do rompimento, provocando uma reestruturação no alinhamento das cadeias poliméricas (CALLISTER Jr., 2008)

5.4.2. Hidrofobicidade (Determinação do ângulo de contato)

A hidrofobicidade está relacionada com a tensão de superfície de um sólido é uma característica das propriedades de superfície e das interações interfaciais, tais como adsorção de umedecimento, ou adesão (KARBOWIAK; DEBEAUFORT; VOILLEY, 2006; THIESSEN; MAN, 1999, YASUDA, 2004). De acordo com Zisman (1964), a definição básica de ângulo de contato é o ângulo que se forma entre a superfície do sólido e uma tangente desenhada na superfície da gota, que passa através do ponto de triplo atmosfera-líquido-sólido (Figura 52).

Figura 52: Ângulo de contato entre a gota e a superfície do sólido.
Adaptado de Zisman (1964).

O ângulo de contato não é uma medida direta. É um valor que estabelece uma relação sobre a molhabilidade da superfície pelo líquido. A energia interfacial, ou tensão interfacial de um sólido com o ar ambiente, é a energia de superfície do sólido, e quanto menor for a diferença entre a energia de superfície de um sólido e de um líquido, maior é a molhabilidade da superfície pelo líquido (Figura 53) (YASUDA, 2004).

Figura 53: O efeito de uma gota de água em equilíbrio com uma superfície de alta energia e uma superfície de baixa energia (variação do ângulo e do volume das gotas). Adaptado de Yasuda (2004).

A determinação do ângulo de contato (θ) para filmes de EPL com glioxal foi realizada pelo método da gota, tanto na superfície em contato com o ar, como na em contato com a placa. A gota aplicada sobre o filme foi fotografada (Figura 54) durante aproximadamente 16s, e a medida do ângulo de contato foi aquela imediatamente após a estabilização da gota (Tabela 28).

Tabela 28: Valores de ângulo de contato (θ) para superfícies placa (θ_{PL}) e ar (θ_{AR}) e seus respectivos tempos.

Tempo (s)	θ_{PL} (°)	θ_{AR} (°)
0	$65,7 \pm 2,8$	$54,8 \pm 6,2$
0,5760	$59,4 \pm 1,5$	$42,2 \pm 2,3$
0,9120	$58,6 \pm 2,3$	$41,7 \pm 1,8$
10,9680	$53,9 \pm 1,5$	$39,6 \pm 3,2$
15,9780	$53,3 \pm 1,7$	$38,5 \pm 4,4$

O valor do ângulo de contato determina o grau de hidrofobicidade ou hidrofiliicidade de um sólido, sendo que, valores elevados de ângulo implicam em superfícies hidrofóbicas e valores baixos, por consequência, implicam em superfícies hidrofílicas. A maioria dos trabalhos utiliza a definição estabelecida por Vogler (1998), onde para $\theta > 65^\circ$, considera-se o

material hidrofóbico e para $\theta < 65^\circ$, considera-se o material hidrofílico (KARBOWIAK; DEBEAUFORT; VOILLEY, 2006; VOGLER, 1998).

A partir dessas informações e das respostas obtidas nos testes (Tabela 28), assume-se que os filmes de EPL com glixal podem ser considerados hidrofílicos. A superfície em contato com o ar é mais hidrofílica que a em contato com a placa.

Figura 54: Imagens do formato das gotas capturadas para superfície em contato com a placa e ar. PL - (a) $t=0$; (b) $t=5,9540s$; (c) $t=15,9700s$; AR - (d) $t=0$; (e) $t=5,9540s$; (f) $t=15,9700s$.

Ayhlhon-Meixueiro, Vaca-Garcia e Silvestre (2000) avaliaram o ângulo de contato em filmes elaborados com proteínas extraídas da torta de girassol, sem agente reticulante, com 60% de glicerol apresentaram um valor médio de $\theta=29,2^\circ$. Orliac et al. (2002) observaram que filmes de proteínas extraídas da torta de girassol com formaldeído, apresentaram $\theta=17,9^\circ$ e $42,0^\circ$, para filmes sem e com formaldeído, respectivamente. Confirmando que a formação de novas interações aumenta a hidrofobicidade das películas.

Mesmo com poucas informações na literatura, o conhecimento do ângulo de contato é na verdade, de grande importância para a formulação e processamento de novos materiais, pois, fornece informações sobre as possíveis interações com outros componentes, como no caso de tintas para impressão, ou de microencapsulação (KARBOWIAK; DEBEAUFORT; VOILLEY, 2006).

5.4.3. Isoterma de sorção

A isoterma obtida com o filme à bases das proteínas de torta de mamona reticuladas com glioxal apresentou a forma sigmoidal (Figura 55), que é a curva mais comum em alimentos. Em baixas atividades de água ($A_w \sim 0,70$), o teor de umidade aumentou discretamente. A partir desse valor de A_w o filme possui um alto ganho de água, isso devido a interações solvente-solvente (CARVALHO; GROSSO, 2004; HERNÁNDEZ-MUÑOZ; VILLALOBOS; CHIRALT, 2004; SOBRAL; HABITANTE, 2001). Além disso, o ajuste foi bastante satisfatório ao modelo de GAB ($R^2=0,999$).

Figura 55: Isoterma de sorção do filme produzido com proteínas reticuladas com glioxal (6g de proteína/100g de SF; 5g de glioxal/100g de proteínas; 25g de glicerol/100g de proteínas).

— : ajuste da equação; X – dados experimentais;

Os resultados obtidos para os parâmetros do modelo de GAB mostraram que os filmes elaborados nesse estudo possuem umidade da monocamada (X_m) inferior a de filmes de gelatina elaborados com o mesmo agente reticulante. Enquanto que, esses mesmos filmes tem a X_m superior à filmes de glutenina. Essas diferenças podem ser justificadas pela afinidade pela água. A glutenina possui baixa afinidade pela água, ao passo que a gelatina apresenta uma afinidade superior às proteínas extraídas da torta de mamona (Tabela 29) (CARVALHO; GROSSO, 2004; HERNÁNDEZ; VILLALOBOS; CHIRALT, 2004).

Tabela 29: Coeficientes para as isotermas de sorção dos filmes de proteínas da torta de mamona, gelatina e glutenina, todas reticuladas com glioxal.

Coeficientes	Filme de proteínas da torta de mamona com glioxal	Filmes de gelatina com glioxal ⁽¹⁾	Filmes de glutenina com glioxal ⁽²⁾
C_{GAB}	9,31	20,90	43,5
k_{GAB}	0,91	0,95	0,80
X_m	8,46	11,84	5,8
R^2	0,999	0,9992	-

⁽¹⁾Carvalho e Grosso (2004); ⁽²⁾Hernández, Villalobos e Chiralt (2004).

5.4.4. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Os filmes de EPL com glioxal foram analisados por calorimetria diferencial de varredura para se caracterizar o filme com relação à sua temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e entalpia de fusão (ΔH_m). Foram obtidas duas curvas (Figura 56), referentes à primeira e a segunda varredura.

Figura 56: Curvas de DSC do filme de proteína de torta de mamona: — primeira varredura. --- segunda varredura.

As temperaturas de transição vítrea na primeira varredura (T_{g1}) e segunda varredura (T_{g2}) foram respectivamente iguais a $-48,9 \pm 2,4^\circ\text{C}$ e $-49,6 \pm 1,5^\circ\text{C}$. A T_m foi equivalente à $91,1 \pm 1,6^\circ\text{C}$, sendo que esta só esteve presente na primeira varredura. A entalpia de fusão (ΔH_m), que aparece área do pico endotérmico na primeira varredura, foi de $4,4\text{J/g}$.

Estudos com filmes envolvendo reações de reticulação indicam que essa reação modifica as propriedades térmicas dessas películas, pois, as novas ligações formadas aumentam a estabilidade da matriz polimérica, e por consequência, diminuem a mobilidade das moléculas atenuando a T_g (HERNÁNDEZ-MUÑOZ; VILLALOBOS; CHIRALT, 2004; NUTHONG; BENJAKUL; PRODOPAN, 2009).

No entanto, Salgado et al. (2010) observaram, para filmes de isolado proteico de soja sem adição de agente reticulante, que a T_g apresentada nessa região (-48°C) é referente a fração de rica em plastificante, não podendo ser atribuída a reação de reticulação.

Entretanto, em filmes de gelatina reticulados com glioxal, a T_m apresentada pelos autores foi próxima à obtida nesse estudo ($T_m=87,1\pm1,9^\circ\text{C}$), com a ressalva que esta temperatura foi consideravelmente superior a T_m para a formulação controle, indicando que houve a reação de reticulação (BIGI et al., 2001; CARVALHO; GROSSO, 2004; NUTHONG; BENJAKUL; PRODOPAN, 2009).

Outro fator que está correlacionado a ocorrência das ligações cruzadas (reticulação), é a diminuição da entalpia de fusão (ΔH_m). Em películas de gelatina reticuladas com glutaraldeído (GT), esse comportamento foi observado, onde o ΔH_m das amostras sem GT foi de 26,0 J/g e os filmes reticulados com GT apresentaram ΔH_m equivalente a 9 J/g. Ainda em filmes de gelatina, a reticulação com o glioxal provocou o mesmo efeito, a ΔH_m diminuiu de $20,5\pm0,3$ J/g para $12,6\pm0,2$ J/g (BIGI et al., 2001; CARVALHO E GROSSO, 2004).

Segundo vários autores, a justificativa para esse comportamento é que as ligações de hidrogênio precisam consumir energia para serem rompidas (quebra endotérmica), já as ligações covalentes liberam energia em sua ruptura (quebra exotérmica). De tal modo, em decorrência da reticulação, existe uma diminuição das ligações de hidrogênio e um aumento das ligações covalentes e assim, uma diminuição da ΔH_m que está relacionada a quebra endotérmica (BIGI et al., 2001; CARVALHO; GROSSO, 2004; KOPP; BONNET; RENOU, 1989; NUTHONG; BENJAKUL; PRODOPAN, 2009).

Contudo, alguns autores realizaram análises em um intervalo de temperatura mais amplo, e com isso, conseguiram identificar um ponto acima de 160°C referente a temperatura de transição vítrea do glioxal (HERNÁNDEZ-MUÑOZ; VILLALOBOS; CHIRALT, 2004; NUTHONG; BENJAKUL; PRODOPAN, 2009).

5.4.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) são bastante úteis para confirmação da ocorrência da reação de reticulação. Sabe-se que cada tipo de ligação tem uma frequência natural de vibração, e, um mesmo tipo de ligação, em substâncias diferentes, encontra-se em ambientes diferenciados. Assim, não há duas moléculas de estrutura diferente que possuam exatamente o mesmo padrão de absorção no infravermelhos, ou espectro de infravermelhos (GONZÁLEZ; STRUMIA; IGARZABAL, 2011; PAVIA; LAMPMAM; KRIZ, 2001). Isso posto, a partir da análise das bandas do espectro de FTIR do filme de EPL com glioxal (Figura 57), avaliou-se o comportamento em termos de ligação química dessa formulação.

Figura 57: Espectro infravermelho do filme de proteínas de mamona (formulação otimizada).

Em geral as bandas situadas em 3273, 1634 e 1539 cm^{-1} , correspondem a amidas terciárias (amida III) e água livre, amidas secundárias (amida II) e amidas primárias respectivamente. A amida I surge a partir de alongamento das ligações $\text{C}=\text{O}$ de amida em proteínas, a amida II surge a partir de vibração de flexão de grupos $\text{N}-\text{H}$ e alongamentos de

grupos de C – N. Ao mesmo tempo, que a amida III está relacionada às vibrações no plano dos grupos C – N e N – H da amida ligada ou vibrações de grupos CH₂ da glicina (BERGO; SOBRAL, 2007; GONZÁLEZ; STRUMIA; IGARZABAL, 2011; NUTHONG; BENJAKUL; PRODOPAN, 2009; PAVIA; LAMPMAM; KRIZ, 2001).

A banda próxima à 2930cm⁻¹ representa o alongamento da ligação C – H e está relacionada a presença de aldeídos (glioxal). Já a absorção em 1443 e 1395cm⁻¹ indicam as ligações CH₂ e CH₃, respectivamente. E, a banda em 1314cm⁻¹ sugere a presença de amins enquanto que em 1236cm⁻¹ tem-se o alongamento das ligações C – N relativo à amidas terciárias (PAVIA; LAMPMAM; KRIZ, 2001; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2000).

De acordo com Bergo e Sobral (2007) os picos ao redor de 1042cm⁻¹ são característicos da presença de glicerol, sendo que, a intensidade varia de acordo com o teor dessa substância na amostra. No entanto, como a matéria prima, torta de mamona, é de um produto rico em impurezas que são arrastadas durante todo o processo de elaboração dos filmes, o espectro gerado é de difícil interpretação.

Além disso, a fim de comprovar o grau de reticulação, o ideal seria a realização desta análise com a amostra sem reticulação, como realizado em estudos envolvendo filmes de glutenina com glioxal e proteínas de soja com genipina (GONZÁLEZ; STRUMIA; IGARZABAL, 2011; HERNÁNDEZ-MUÑOZ; VILLALOBOS; CHIRALT, 2004).

Mas, ainda assim, foi possível com esta análise, observar a presença de bandas que indicaram a ocorrência de novas ligações em função da reticulação. Como por exemplo, a presença de picos na região entre 3500 – 3000cm⁻¹, 2930, 1634, 1539 e 1236cm⁻¹ (GONZÁLEZ; STRUMIA; IGARZABAL, 2011).

5.4.6. Biodegradabilidade (*Indoor*)

A biodegradabilidade foi avaliada durante 11 semanas. Os filmes foram colocados em malhas plásticas para facilitar a identificação e sua retirada da terra (Figura 58a e 58b). A cada semana, três amostras de cada replicata foram retiradas e lavadas com auxílio de uma pipeta de Pasteur (Figura 58c e 58d).

Os filmes elaborados com EPL e glioxal não apresentaram degradação acentuada ao longo do tempo (Figura 59), sendo que, até a décima semana não houve alteração visual no filme (Figura 60a, 60b e 60c). A única diferença perceptível foi que os filmes se tornavam mais secos com o passar das semanas.

Figura 58: Filmes em vários estágios do teste de biodegradabilidade.

Entretanto, na décima primeira semana os filmes apresentaram uma alteração na coloração, sendo que em alguns casos não foi possível retirar as amostras da malha plástica

(Figura 60d). Essa alteração sugeriu uma possível formação de fungos (Figura 61), podendo-se considerar que a degradação iniciou após a 10ª semana.

Figura 59: Gráfico de acompanhamento da biodegradabilidade (*indoor*) do filme de EPL.

O estudo desta propriedade, para filmes de proteínas de soja reticuladas com genipina, sugeriu que a biodegradabilidade está fortemente ligada a reticulação, ou seja, quanto maior foi a concentração de agente reticulante, menor foi a perda de massa por degradação. Os filmes sem adição de reticulante foram os mais sensíveis, desaparecendo totalmente no décimo quarto dia (GONZÁLEZ; STRUMIA; IGARZABAL, 2011). Martucci e Ruseckaite (2009) observaram para filmes de multicamadas de gelatina, que após o 14º dia, os filmes já ofereciam dificuldade para serem retirados da terra, diferente do ocorrido com os filmes à base de proteínas de mamona, havendo problemas na retirada à partir da 11ª semana (Figura 60).

Figura 60: Filmes em algumas semanas do teste de biodegradabilidade. (a) amostra - 2ª semana; (b) amostra - 6ª semana; (c) amostra - 10ª semana; (d) amostra - 11ª semana.

Figura 61: Filmes na 11ª semana do ensaio de biodegradabilidade (*indoor*).

A partir desses resultados, considerou-se que os filmes de proteínas de mamona reticuladas com glicol possuem estabilidade estimada em 10 semanas, em termos de biodegradabilidade, sendo que a partir desta dá-se início ao processo de degradação por microrganismos. Contudo, existem algumas condições, como as variações de umidade do ambiente, índice pluviométrico e presença de nematoides característicos do solo que não podem ser simuladas nos ensaios de biodegradabilidade em laboratório. A fim de confirmar

esse comportamento, ensaios de biodegradabilidade devem ser conduzidos no ambiente em que ela será empregada.

6. Conclusões

Os resultados obtidos nesta dissertação permitem concluir que, tanto a concentração das proteínas da torta de mamona, como o tipo de reticulante (glutaraldeído e glioxal), não influenciam o aspecto visual, a microestrutura, as propriedades óticas (cor, opacidade e brilho) e nem a umidade, influenciando, entretanto as propriedades mecânicas (tração e perfuração) e a solubilidade em água dos filmes. A concentração de proteínas que produziu filmes com melhores resultados com relação às propriedades mecânicas (tração e perfuração), aliado à menor solubilidade em água, foi 6g de proteínas/100g de solução filmogênica (SF). O agente reticulante que proporcionou menor solubilidade em água e melhores propriedades mecânicas foi o glioxal.

Por outro lado, a variação da concentração de glioxal não influenciou a microestrutura, as propriedades óticas, umidade e permeabilidade ao vapor de água. Contudo, as propriedades mecânicas e a solubilidade em água dos filmes foram bastante sensíveis às variações da concentração do glioxal, sendo que o menor valor de solubilidade em água, associado às melhores propriedades mecânicas, foram obtidos na concentração de 5g de glioxal/100g de SF.

Assim, a caracterização dos filmes elaborados com a formulação que proporcionou melhores propriedades mecânicas e menor solubilidade, nos estudos anteriores, mostrou que existem diferenças de textura nas superfícies em contato com o ar e em contato com a placa. Essas diferenças foram observadas tanto para os ensaios de brilho, como nos de hidrofobicidade, e foi confirmada pela microscopia eletrônica de varredura. O processo de secagem deve ter causado a elutriação de algum componente, provocando o surgimento de certa rugosidade na superfície de secagem. Essa heterogeneidade na superfície implicou em maior brilho e maior hidrofobicidade na superfície que estava em contato com a placa.

Os testes de biodegradabilidade mostraram que os filmes elaborados com as proteínas extraídas da torta de mamona possuem certa resistência à degradação. Observou-se que a biodegradabilidade começa a partir da 11ª semana.

Assim, pode-se concluir que as proteínas extraídas da torta de mamona apresentam boas propriedades filmogênicas. Além disso, as soluções filmogênicas elaboradas com glioxal foram capazes de formar filmes com aspecto homogêneo, e com boas propriedades funcionais.

7. Perspectivas para trabalhos futuros

A fim de comparar o material elaborado ao longo desse trabalho com os materiais usados atualmente nas culturas agrícolas, seria interessante realizar as mesmas análises em diferentes marcas comerciais.

Outro fator importante seria a realização dos estudos de biodegradabilidade no campo, a fim de avaliar também o efeito das intempéries climáticas na degradação dos filmes.

Com relação à reação de reticulação, para melhor compreensão das modificações estruturais que ocorrem, seria interessante a realização de algumas análises para a formulação controle (sem o glioxal), como por exemplo, biodegradabilidade, isoterma, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e análises térmicas.

De maneira geral, embora as reações de reticulação tenham melhorado consideravelmente algumas propriedades desses materiais, ainda serão necessários outros estudos que viabilizem a produção desse material para utilização na agricultura, como por exemplo, a adição de fibras como reforço, ou reação com outros agentes reticulantes.

8. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, C.H.M. et al. Caracterização dos co-produtos de processamento de biodiesel de mamona para geração de energia térmica e elétrica. In: **I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2006**. Distrito Federal. Anais do I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel. p.68-72, 2006.

ALVES, P.M.A. et al. Development of films based on blends of gelatin and poly(vinyl alcohol) cross linked with glutaraldehyde. **Food Hydrocolloids**, Oxford, Inglaterra, v.25, p.1751-1757, 2011.

AMORIM NETO, M.S.; ARAÚJO, A.E.; BELTRÃO, N.E.M. Cap. 3 Clima e Solo. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2001.

ANANDAN, S. et al. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. **Animal Feed Science and Technology**, v. 120, p. 159-168, 2005.

ANP, AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO. Resolução Nº 2 de 29/01/2008 da Agência Nacional do Petróleo (ANP). Diário Oficial da União, de 30 de janeiro 2008.

AOAC, ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16. ed. Arlington: AOAC, 1995.

ARVANITOYANNIS, I.S. Chapter 11. Formation and Properties of collagen and gelatin films and coatings. In: GENNADIOS, A. (Ed.), **Protein-based films and coatings**, DOI: 10.1201/9781420031980.ch11, CRC Press, p.275-304, 2002.

ASCHERI, J.L.R. et al. Destoxificação de torta de mamona por extrusão termoplástica: estudo preliminar. In: **II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2007**. Distrito Federal. Anais do II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2007.

ASTERPLAS. Imagens de sacos para mudas. Disponível em: <<http://www.sacolasplasticas.net/Saco%20de%20Muda.html>>. Acesso em: 24 de janeiro de 2012.

AYHLLON-MEIXUEIRO, F.; VACA-GARCIA, C.; SILVESTRE, F. Biodegradable films from isolate of sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, Pa., USA, v. 48, p. 3032-3036, 2000.

AYRANCI, E., ÇETIN, E. The effect of protein isolate of *Pistacia terebinthus* L. on moisture transfer properties of cellulose-based edible films. **Lebensmittel – Wissenschaft- und -Technologie**, London, GB, v.28, n.2, p.241-244, 1995.

BAMDAD, F., GOLI, A.H.; KADIVAR, M. Preparation and characterization of proteinous film from lentil (*Lens culinaris*): Edible film from lentil (*Lens culinaris*). **Food Research International**, Barking, Inglaterra, GB, v. 39, p.106-111, 2006.

BARBIN, D.F.; NATSCH, A.; MÜLLER, K. Improvement of functional properties of rapeseed protein concentrates produced via alcoholic process by thermal and mechanical treatments. **Journal of food processing and preservation**, Westport, Conn., USA, v. 35, p.369-375, 2011.

BARBOSA, F.A. et al. Desempenho e consumo de matéria seca de bovinos sob suplementação protéico-energética, durante a época de transição água-seca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte - MG, Brasil. v.59, p.160-167, 2007.

BATALHA, M.O. (Cord.). **Gestão Agroindustrial**. GEPAI. 1. ed. v.1, São Paulo:Atlas, 690 p., 2001.

BELTRÃO, N.E.M. **Torta de mamona (*Ricinus communis* L.): fertilizante e alimento**. Comunicado Técnico n. 177 da Embrapa de 2003. ISSN 0102-0099. Disponível em: <http://www.cnpa.embrapa.br/plataforma_mamona/publicacoes/comunicacoes/04.PDF>. Acesso em 02 de setembro de 2008.

BENESI, F.J. **Influência do farelo de mamona (*Ricinus comunis* L.) destoxicado sobre o proteinograma sanguíneo e desempenho de suínos**. 63p.Dissertação de Mestrado, UFMG, Belo Horizonte, 1979.

BEPPU, M.M. et al. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. **Journal Membrane Science**, v. 301 p. 126-130, 2007.

BEPPU, M.M.; ARRUDA, E.J.; SANTANA, C.C. Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana. **Polímeros**. v. 9, n. 4, p. 163-169, 1999.

BERGO, P.; SOBRAL, P.J.A. Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatina films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, Inglaterra, v. 21, p. 1285-1289, 2007.

BIGI, A.; et al. Mechanical and thermal properties of gelatina at differebt degrees of glutaraldehyde crosslinking. **Biomaterials**, Surrey, Inglaterra, GB, v.22, p.763-768, 2001.

BOURTOOM, T. Edible protein films: properties enhancement. **International Food Research Journal**, Selangor, Malaysia. v.16, n.1, p.1-9, 2009.

BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 de janeiro de 2005. p.8. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/lei11097_13jan2005.pdf>. Acesso em: 17 de setembro de 2008.

BRIASSOULIS, D. The effect of tensile stress and the agrochemical Vapam on the ageing of low density polyethylene (LPDE) agricultural films. Part I. Mechanical behavior. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, Inglaterra, v.88, p. 489-503, 2005.

BUFFO, R.A.; WELLER, C.L.; GENNADIOS, A. Films from laboratory-extracted sorghum kafirin. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, Minn., USA , v. 74, n. 4, p. 473-475, 1997.

CALLISTER Jr, W.D. **Ciências e engenharia de materiais: uma introdução**. Tradução Sérgio Murilo Stamile Soares, 7ª ed, 705p. Rio de Janeiro, LTC, 2008.

CANGEMI, J.M.; SANTOS, A.M.; CLARO NETO, S. A Revolução Verde da Mamona. **Química Nova na Escola**, Sao Paulo, SP, v. 32, n.1, p. 3-8, 2010.

CARVALHO, A.V. et al. Caracterização de concentrado e isolado proteico de sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, Schum). **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, SP, v. 12, n.1, p.01-08, 2009.

CARVALHO, R.A.; GROSSO, C.R.F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase glyoxal and formaldehyde. **Food Hydrocolloids**, Oxford, Inglaterra, v. 18, n. 5, p. 717-726, 2004.

CARVALHO, R.A.; GROSSO, C.R.F. Properties of chemically modified gelatin films. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, SP, v. 23, n.1, p.45-53, 2006.

CERQUEIRA, M.A. et al. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films – A comparative study. **Food Hydrocolloids**. Oxford, UK, v. 27, p.175-184, 2012.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. **Progress in Polymers Science**, U.K v. 23, p.1273-1335, 1998.

CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. **Protéines alimentaires**: Biochimie, Propriétés fonctionnelles, Valeur nutritionnelle e Modifications chimiques. Paris : LAVOISIER TEC & DOC, 1985.

CHO, S.; RHEE, C. Mechanical properties and water vapor permeability of edible films made fractioned soy protein with ultrafiltration. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, London, GB, v.37, p. 833-839, 2004.

CHOI, W.S.; HAN, J.H. Physical and mechanical properties of pea-protein-based edible films. **Journal of Food Science**, Chicago, USA, v.66, p.319-322, 2001.

COSTA Jr, E.S.; MANSUR, H.S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, Sao Paulo, SP, v. 31, n. 6, p. 1460-1466, 2008.

COSTA, F.X. et al. Composição da torta de mamona. In: **I Congresso Brasileiro de Mamona: energia e sustentabilidade**. 2004. Campina Grande/PB. CD-ROM, 2004. Anais do I Congresso Brasileiro de Mamona: energia e sustentabilidade.

COSTA, H.M. et al. Efeito do óleo de mamona em composições de borracha natural contendo sílica. **Polímeros**, São Carlos – SP, Brasil. v.14, n. 1, p.46-50, 2004.

CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, Pa., USA. v. 45, p. 622 –626, 1997.

DENAVI, G. et al. Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. **Journal of Food Engineering**, Essex, Inglaterra, GB, v.90, n. 3, p. 341-349, 2009.

FIRATLIGIL-DURMUS, E.; EVRANUZ, O. Response surface methodology for protein extraction optimization of red pepper seed (*Capsicum frutescens*). **Lebensmittel – Wissenschaft- und -Technologie**, London, GB, v. 43, p. 226-231, 2010.

FREIRE, R.M.M. Cap. 13 Ricinoquímica. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2001.

GALIETTA, G. et al. Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. **Journal of Dairy Science**, Champaign, Ill., USA, v. 81, p. 3123-3130, 1998.

GAO, C. et al. Effect of preparation conditions on protein secondary structure and biofilm formation of kafirin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, Pa., USA, v. 53, p. 306-312, 2005.

GAO, C. et al. Plasticization of a protein-based film by glycerol: A spectroscopic, mechanical and thermal study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, Pa., USA, v. 54, p. 4611-4616, 2006.

GHORPADE, V.M. et al. Chemically modified soy protein films. **Transactions of the ASAE (American Society of Agricultural Engineers)**, St. Joseph, USA, v. 38, n. 6, p. 1805-1808, 1995.

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

GONZÁLEZ, A.; STRUMIA, M.C.; IZARZABAL, C.I.A. Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: Synthesis, characterization and biodegradation. **Journal of Food Engineering**, Essex, Inglaterra, GB, v.106, p.331-338, 2011.

GUEGUEN, J. et al. Influence of plasticizers and treatments on the properties of films from pea proteins. **Industrial Crops and Products**, v. 7, p. 149-157, 1998.

GUPTA, K.C.; JABRAIL, F.H. Glutaraldehyde and glyoxal cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of centchroman. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, NL, v. 341, p. 744-756, 2006.

HAN, J.H. Chapter 19. Protein-based edible films and coatings carrying antimicrobial agents. In: GENNADIOS, A. (Ed.), **Protein-based films and coatings**. DOI:10.1201/9781420031980.ch19, CRC Press, p. 485-499, 2002.

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; VILLALOBOS, R.; CHIRALT, A. Effect of cross-linking using aldehydes on properties of glutenin-rich films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, Inglaterra, v. 18, p. 403 – 411, 2004.

HOLFELDER, M.G.A. et al. Ricinine in phloem sap of *Ricinus communis*. **Phytochemistry**, New York, USA, v.47, n.8, p.1461-1463. 1998.

HUANG, Y.; YU, H.; XIAO, C. Effects of Ca^{2+} crosslinking on structure and properties of waterborne polyurethane-carboxymethylated guar gum films. **Carbohydrate Polymers**, Barking, Inglaterra. v.66, p.500–513, 2006.

HUNTERLAB. Manual do equipamento Hunter Lab. Imagem do sólido de cores. Disponível em: <http://www.hunterlab.com/appnotes/an02_01.pdf>. Acessado em: 15 de março de 2012.

JANGCHUD, A.; CHINNAN, M. S. Properties of peanut protein film: sorption isotherm and plasticizer effect. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, London, GB, v. 32, n. 2, p. 89-84, 1999.

JAOAC, **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n.6, p.912-916, nov-dec, 1989.

KAPANEN, A. et al. Performance and environmental impact of biodegradable films in agriculture: a field study on protect cultivation. **Journal of polymers and the environment**, v. 16, p. 109-122, 2008.

KARBOWIAK, T.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Importance of surface tension characterization for food, pharmaceutical and packaging products: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, USA, v. 46, p. 391-407, 2006.

KOPP, J.; BONNET, M.; RENOU, J.P. Effect of collagen crosslinking on collagen–water interaction. **Matrix**, Stuttgart, DE, v. 9, n. 6, p.443–450, 1989.

KROCHTA, J.M. Chapter 1. Proteins as Raw Materials for Films and Coatings: Definitions, Current Status, and Opportunities. In: GENNADIOS, A. (Ed), **Protein-Based Films and Coatings**. DOI: 10.1201/9781420031980.ch1, CRC Press, p.1-41, 2002.

LEITE, A.C. et al. Isolamento do alcalóide ricinina das folhas de *Ricinus Communis* (*Euphorbiaceae*) através de cromatografias em contracorrente. **Química Nova**, São Paulo, SP, v. 28, n. 6, p. 983-985, 2005.

LESTARI, D.; MULDER, W.J.; SANDERS, J.P.M. *Jatropha* seed protein functional properties for technical applications. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, NL, v. 53, p. 297-304, 2011.

LI, F.; LAROCK, R.C. Chapter 23. Synthesis, Properties, and Potential Applications of Novel Thermosetting Biopolymers from Soybean and Other Natural Oils. In: MOHANTY, A.K. , MISRA, M.; DRZAL, L.T. (Ed). **Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites**. DOI: 10.1201/9780203508206.ch23, CRC Press, 2005.

LIMA, E.P. Estudo da estrutura e função da ricina e de tecnologia para uso da torta de mamona como alimento animal. In: **II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica**, 2007. João Pessoa, PB. Anais do II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica. Disponível em: <http://www.redenet.edu.br/publicacoes/arquivos/20080922_085931_AGRO-024.pdf>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2012.

LIU, C.C.; TELLEZ-GARAY, A.M.; CASTELL-PEREZ, M.E. Physical and mechanical properties of peanut protein films. **Lebensmittel – Wissenschaft- und -Technologie**, London, GB, v. 37, p.731-738, 2004.

MADAIL, J.C.M.; BELARMINO, L.C.; NEUTZLING, D.M. **Aspectos Econômicos da mamona**. Sistemas de Produção, 11. ISSN 1806-9207, 2007. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mamona/SistemaProducaoMamona/aspectos.htm>>. Acesso em 09 de setembro de 2008.

MARCUZZO, E. et al. Effect of ultrasound treatment on properties of gluten-based film. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 451-457, 2010.

MARQUIÉ, C. Chemical Reactions in Cottonseed Protein Cross-Linking by Formaldehyde, Glutaraldehyde, and Glyoxal for the Formation of Protein Films with Enhanced Mechanical Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, Pa., USA, v. 49, n.10, p.4676-4681, 2001.

MARQUIÉ, C. et al. Biodegradable Packaging Made from Cottonseed Flour: Formation and Improvement by Chemical Treatments with Gossypol, Formaldehyde, and Glutaraldehyde. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, Pa., USA, v. 43, n. 10, p.2762-2767, 1995.

MARQUIÉ, C. et al. HPLC determination of the reactive lysine content of cottonseed protein films to monitor the extent of crosslinking by formaldehyde, glutaraldehyde, and glyoxal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, Pa., USA, v. 45, p. 922-926, 1997.

MARQUIÉ, C.; GUILBERT, S. Chapter 5. Formation and properties of cottonseed protein films and coatings. In: GENNADIOS, A. (Ed.), **Protein-Based Films and Coatings**. DOI: 10.1201/9781420031980.ch5, CRC Press, p. 139-158, 2002.

MARTUCCI, J.F.; RUSECKAITE, R.A. Biodegradation of three-layer laminate films based on gelatin under indoor soil conditions. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, Inglaterra, v. 94, p. 1307-1313, 2009.

MAURI, A.N.; AÑON, M.C. Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, GB, v. 86, p. 1064-1072, 2006.

MAURI, A.N.; AÑON, M.C. Mechanical and physical properties of soy protein films with pH-modified microstructures. **Food Science and Technology International**, London, GB, v. 14, n. 2, p. 119-125, 2008.

MEANS, G. E.; FEENEY, R. E. Modifications to change properties. In: WOOD, J. **Chemical Modification of Proteins**, San Francisco, Ed. Holden-Day Inc., Ch. 3, p. 35-51, 1971.

MEDQUIMICA. Imagens do fruto da mamona (*Ricinus communis*). Da memória afetiva a industrialização da mamona, 2010. Disponível em:<<http://www.portalmedquimica.com.br/textocontexto.php?id=44>>. Acesso em: 03 de fevereiro de 2012.

MENDES, R.A. **A cadeia produtiva do biodiesel da mamona no Ceará**. Série BNB Teses e Dissertações, nº16, Fortaleza, CE, Banco do Nordeste, 2008.

MICARD, V. et al. Properties of Chemically and Physically Treated Wheat Gluten Films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, Pa., USA, v. 48, n. 7, p. 2948-2953, 2000.

MOE, S. T. et al. Alginates. In: STEPHEN, A. M. (Ed.). **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker, p. 245-286, 1995.

MOHANTY, A.K. et al. Chapter 1. Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites: An Introduction. In: MOHANTY, A.K.; MISRA, M.; DRZAL, L.T. (Ed) **Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites**. DOI: 10.1201/9780203508206.ch1, CRC Press, 2005a.

MOHANTY, A.K. et al. Chapter 22. Soy Protein-Based Plastics, Blends, and Composites. In: Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites: An Introduction. In: MOHANTY, A.K.; MISRA, M.; DRZAL, L.T. (Ed) **Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites**. DOI: 10.1201/9780203508206.ch22, Crc Press, 2005b.

MORAES, I.C.F. et al. Influência do grau de hidrólise do poli(vinil álcool) nas propriedades físicas de filmes à base de blendas de gelatina e poli(vinil álcool) plastificados com glicerol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v.28, n.3, p. 738 – 745, 2008.

NEVES, V.A.; LOURENÇO, E.J.; SILVA, M.A. Extração, isolamento e fracionamento da proteína de tremço (*Lupinus albus*) var. Multolupa. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, SP, v. 12, p. 115-130, 2001.

NORDE, W. **Colloids and interfaces in life sciences**. Wageningen, Netherlands, CRC Press, 448p., 2003.

NUTHONG, P.; BENJAKUL, S.; PRODPAN, T. Characterization of porcine plasma protein-based films as affected by pretreatment and cross-linking agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, Inglaterra, GB, v. 44, p. 143-148, 2009.

OGUNNIYI, D.S. Castor oil: A vital industrial raw material. **Bioresource Technology**, Essex, Inglaterra, GB, v. 97, p.1086-1091, 2006.

OLIVEIRA, I.R.W.Z. et al. Imobilização da lacase em micropartículas de quitosana obtidas por spray drying e usadas na construção de biossensores. **Química Nova**, São Paulo, SP, v. 32, n. 5, p. 1195-1201, 2009.

ORLIAC, O. et al. Effects of additives on the mechanical properties, hydrophobicity and water uptake of thermo-moulded films produced from sunflower protein isolate. **Polymer**, London, Inglaterra, v. 43, p. 5417 – 5425, 2002.

ORLIAC, O. et al. Effects of various plasticizers on the mechanical properties, water resistance and aging of thermo-moulded films made from sunflower proteins. **Industrial Crops and Products**, v. 18, p. 91-100, 2003.

PARK, S.K.; BAE, D.H.; RHEE, K.C. Soy Protein Cross-Linked With Glutaraldehyde. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, USA v. 77, n. 8, p. 879-884, 2000.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. 3Ed, Brooks/Cole Thomson Learning, 579p., 2001

PLANT TEC. Estufas agrícolas. Imagens dos tipos de estufas e coberturas de solo. Disponível em: <<http://www.planttec.com.br/>>. Acesso em: 24 de janeiro de 2012.

POLIAGRO. **Principais aplicações do plástico na agricultura**, 2006. Disponível em: <http://www.poliagro.com.br/index.php/Principais_aplicacoes?menuSection%5B%5D=plasticultor&menuSection%5B%5D=Dicas_e_Infos>. Acesso em: 22 de janeiro de 2012.

POPOVIĆ, S. et al. Effect of the addition of pumpkin oil cake to gelatin to produce biodegradable composite films. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, Inglaterra, GB, v. 45, p. 1184-1190, 2010.

POPOVIĆ, S. et al. Evaluation of edible film-forming ability of pumpkin oil cake; effect of pH and temperature. **Food Hydrocolloids**, Oxford, Inglaterra, v. 25, p. 470-476, 2011.

POPOVIĆ, S. et al. Pumpkin oil cake protein isolate films as potential gas barrier coating. **Journal of Food Engineering**, Essex, Inglaterra, GB, v. 110, p. 374-379, 2012.

RAYAS, L.M.; HERNANDEZ, R.J.; NG, P.K.W. Development and characterization of biodegradable/edible wheat protein films. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 1, p. 160-162, 1997.

RHIM, J.W. et al. Soy protein isolate-dialdehyde starch films. **Industrial Crops and Products**, v. 8, p. 195-203, 1998.

RICCI, M.S.F.; NEVES, M.C.P. **Cultivo do Café Orgânico, Sistemas de Produção**, 2 - 2ª Edição, EMBRAPA, Embrapa Agrobiologia, ISSN 1806-2830 Versão Eletrônica Dez./2006. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cafe/CafeOrganico_2ed/mudas.htm>. Acesso em: 22 de janeiro 2012.

ROUILLY, A. et al. Film extrusion of sunflower protein isolate. **Polymer Engineering and Science**, Stanford, Conn., USA, v. 46, p. 1635-1640, 2006.

RUSS, J.C. **Image analysis of food microstructure**. Boca Raton: CRC Press, 2005.

SALGADO, P.R. et al. Biodegradable sunflower protein films naturally activated with antioxidant compounds. **Food Hydrocolloids**, Oxford, Inglaterra, v. 24, p. 525-533, 2010.

SANTOS, R.F. et al. Cap.1 Análise econômica. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2001.

SAVY FILHO, A. **Mamona, Tecnologia Agrícola**. Campinas – SP: EMOPI, 105p., 2005.

SEVERINO, L.S. **O que sabemos sobre a torta de mamona.** Campina Grande, PB: Embrapa Algodão 31p. (Documentos, 134), 2005.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos:** Propriedades – Degradações – Modificações. 1ed. São Paulo, Livraria Varela, 517p. 1996.

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

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos.** 3.ed. Viçosa, UFV, 235p., 2002.

SILVERSTEIN, R.M.;WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 6Ed, LTC (GRUPO GEN), 460p., 2000.

SOBRAL, P.J.A. et al. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, Inglaterra, v. 15, p. 423-432, 2001.

SOBRAL, P.J.A. Influência da espessura sobre certas propriedades de biofilmes à base de proteínas miofibrilares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 6, p. 1251-1259, 2000.

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

SOUZA, A.C.; DITCHFIELD, C.; TADINI, C.C. Chapter 17: Biodegradable Films Based on Biopolymers for Food Industries. In: PASSOS, M.L.; RIBEIRO, C.P. (Ed.), **Innovation in Food Engineering: New Techniques and Products.** CRC Press, p. 511-537, 2010.

SPANNEBERG, R. et al. Model studies on chemical and textural modifications in gelatin films by reaction with glyoxal and glycolaldehyde. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n.6, p. 3580-3585, 2010.

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

THIESSEN, D.B.; MAN, K.F. Ch 31. Surface Tension Measurement. In: WEBSTER, J.G. **The Measurement, Instrumentation and Sensors Handbook**, [CD] [CD-ROM]. 10.1201/9780415876179.ch31, CRC Press, 1999.

THOMAZINE, M.; CARVALHO, R.A.; SOBRAL, P.J.A. Physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol. **Journal of Food Science**, Chicago, USA, v. 70, n.3, p. E172-E176, 2005.

TÖMÖSKÖZI, S. et al. Isolation and study of the functional properties of pea proteins. **Nahrung**, Berlin, DE, v. 45, n. 6, p. 399-401, 2001.

TORRES, J.A. Edible films and coatings from proteins. In: HETTIARACHY, N.S.; ZIEGLER, G.R. (Ed.). **Protein functionality in food systems.** New York: M. Dekker, p.467-507, 1994.

VAN SOEST, P.J., FERREIRA, A. M.; HARTLET, R.D. Chemical properties of fibre in relation to nutritive quality of ammonia treated forages. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, NL, v.10, p.156 – 164, 1984.

VAZ, C.M. et al. Processing and Characterization of Biodegradable Soy Plastics: Effects of Crosslinking with Glyoxal and Thermal Treatment. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, USA, v. 97, p. 604–610, 2005

VICENTINI, N.M.; DUPUY, N.; LEITZELMAN, M.; CEREDA, M.P.; SOBRAL, P.J.A. Prediction of cassava starch edible film properties by chemometric analysis of infrared spectra. **Spectroscopy Letters**, New York, USA, v. 38, n. 6, p. 749-767, 2005.

VIEIRA NETO, A. **Produtor de mamona**. Cadernos tecnológicos, Edições Demócrito Rocha; Fortaleza, CE, Instituto Centro de Ensino Tecnológico, p.56, 2008.

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

VOGLER, E.A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, NL, v. 74, p. 69-117, 1998.

WÄSCHE, A; WURST, S.; BORCHERDING, A.; LUCK, T.; Film forming properties of rape-seed protein after structural modification. **Nahrung**, Berlin, DE, v. 42, p. 269-271, 1998.

WONG, D.M.; JAMESON, S.S. Chapter 5. Homobifunctional cross-linking reagents. In: WONG, D.M.; JAMESON, S.S. **Chemistry of Protein Cross-Linking and Conjugation**, London, CRC Press, p. 81-190, 2011a.

WONG, D.M.; JAMESON, S.S. Chapter 6. Heterobifunctional cross-linkers. In: WONG, D.M.; JAMESON, S.S. **Chemistry of Protein Cross-Linking and Conjugation**, London, CRC Press, p. 191-237, 2011b.

WONG, S. S.; WONG, L-J. C. Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, Woburn, v. 14, n. 11, p. 866-874, 1992.

YASUDA, H. Chapter 26. Contact Angle and Wettability, p. 525–557. In: YASUDA, H. **Luminous Chemical Vapor Deposition and Interface Engineering**. London, DOI: 10.1201/9781420030297.ch26, CRC Press, 2004

ZHANG, X. et al. Chemical modification of wheat protein-based natural polymers: Cross-linking effect on mechanical properties and phase structures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, Pa., USA, v. 54, p. 9858-9865, 2006.

ZISMAN, W.A. Relation of the equilibrium contact angle to liquid and solid constitution. **Advances in Chemistry Series**, Washington, USA, v.43 p. 1-51, 1964.