



VIVIANE MACHADO DE AZEVEDO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITOS
DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE
INCORPORADOS COM AGENTE
ANTIESCURECIMENTO**

LAVRAS – MG

2013

VIVIANE MACHADO DE AZEVEDO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITOS DE ISOLADO
PROTEICO DE SORO DE LEITE INCORPORADOS COM AGENTE
ANTIESCURECIMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de pós-graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dra. Soraia Vilela Borges

Coorientador

Dr. Eber Antônio Alves Medeiros

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Azevedo, Viviane Machado de.

Desenvolvimento de nanocompósitos de isolado proteico de soro de leite incorporados com agente antiescurecimento / Viviane Machado de Azevedo. – Lavras : UFLA, 2013.

133 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Soraia Vilela Borges.

Bibliografia.

1. Filmes ativos e biodegradáveis. 2. Embalagem. 3. Ácido cítrico. 4. Minimamente processados. 5. Montmorilonita. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.092

VIVIANE MACHADO DE AZEVEDO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITOS DE ISOLADO
PROTEICO DE SORO DE LEITE INCORPORADOS COM AGENTE
ANTIESCURECIMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de pós-graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2013.

Dra. Heloísa Helena Elias de Siqueira UFLA

Dr. Eber Antônio Alves Medeiros UFV

Dra. Soraia Vilela Borges

Orientadora

LAVRAS - MG

2013

Aos meus pais, Maria José e Vitor, por todo amor, incentivo e confiança. A minha irmã Liliane, pela amizade e amor que temos uma pela outra e por acreditar em mim. Ao Anselmo, pelo amor, companheirismo, por acreditar em mim e pelo incentivo em todos os momentos de minha vida. Amo vocês!

DEDICO

AGRACEDIMENTOS

A Deus, por guiar todos os meus passos e permitir que eu consiga conquistar mais esta vitória em minha vida.

Aos meus pais, Maria José e Vitor pelo amor, confiança e incentivo por aceitarem que eu escolhesse meu caminho me apoiando e ensinando o melhor da vida. Amo vocês!

A minha irmã Liliane pelo amor e força, por sempre acreditar em mim, uma amiga e companheira de todas as horas.

Ao Anselmo, uma pessoa especial que a vida me apresentou, pelo amor, compreensão, incentivo, pela paciência de me ouvir, auxiliar em todos os momentos, e que crescer juntos é muito melhor do que crescer sozinho.

A minha orientadora, Soraia Vilela Borges pela oportunidade, orientação, confiança, amizade, apoio, dedicação e por sempre me ouvir.

À professora Nilda de Fátima Ferreira pela confiança depositada em todos os integrantes do Laboratório de Embalagens, principalmente por promover um intercâmbio de conhecimentos com alunos de várias Universidades do Brasil.

Ao Laboratório de Embalagens (Labem) da Universidade Federal de Viçosa pelo apoio técnico e científico durante todo o experimento, em especial ao Éber Antonio Alves Medeiros pela confiança, atenção e por me receber no Labem para execução deste projeto. A todos os integrantes do LABEM que me receberam com carinho, tornando meus dias em Viçosa muito bons, em especial Silvania Farias, Rejane Batista e Márcia Antunes principalmente pela companhia nos horários de almoço.

À Gabriella Santos pela amizade e companheirismo, pelas risadas, pelos choros e desesperos e por mostrar que a vida nos ensina a cada dia, amiga de todas as horas, minha irmãzinha de república.

À Joyce Maria Gomes da Costa, uma amiga, irmã, companheira, por estar sempre presente em minha vida em todos os momentos que precisei e por todos os ensinamentos durante meu tempo de graduação.

À Telma uma nova amiga que encontrei no mestrado, sempre carinhosa, atenciosa e companheira.

À Marali Vilela Dias pela amizade, companheirismo, atenção e por me orientar em todas as etapas do meu experimento juntamente com a professora Soraia.

Ao professor João de Deus Souza Carneiro pela atenção, apoio e ensinamentos desde o período de graduação, e em todos os momentos em que precisei durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores, laboratoristas e funcionários do Departamento de Ciência dos Alimentos, pela colaboração, carinho, atenção, conversas e apoio durante a execução das análises, em especial, a Helô, Cleuza e Tina.

À Katia Lumi Fukushima, Ana Leticia Rodrigues Costa e Carla Rafaela de Paula Rodrigues pelos momentos de atenção, companheirismo e ajuda na realização deste trabalho.

Ao professor Mário César Guerreiro do Departamento de Química e Isabel Cristina Nogueira Alves de Melo do Departamento de Ciências Florestais da UFLA pelos ensinamentos com as análises térmicas.

Ao casal Regiane Victória de Barros Fernandes e Diego Alvarenga Botrel pelo carinho e atenção.

A todos os meus amigos que com simples gestos de carinho e amizade estiveram presentes durante o período de mestrado.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pelo ensino gratuito e de qualidade.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa de estudos durante o mestrado auxiliando na realização deste projeto. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro na execução deste projeto. A todos que acreditaram em mim e que de alguma forma contribuíram para minha conquista.

Muito Obrigada!

Valeu a pena!

RESUMO GERAL

Filmes biodegradáveis são preparados com materiais biológicos com função de agir como barreira a elementos externos, protegendo o produto e aumentando sua vida útil. São elaborados a partir de proteínas, polissacarídeos, lipídeos ou da combinação desses compostos. Assim, novas embalagens têm sido desenvolvidas nos últimos anos como resposta às preferências do consumidor por produtos frescos, saborosos e com um tempo de vida prolongado. Diante disso, objetivou-se desenvolver uma embalagem ativa de isolado proteico de soro de leite e nanopartículas montmorilonita (MMT), incorporadas com agente antiescurecimento ácido cítrico. Foram utilizados isolado proteico de soro de leite (IPS) como base para o filme, glicerol como agente plasticizante, nanopartículas de argila montmorilonita sódica (MMT-Na⁺) e agente antiescurecimento ácido cítrico (AC). Os filmes foram desenvolvidos e caracterizados em uma primeira etapa pelas seguintes análises: permeabilidade ao vapor de água (PVA), propriedades mecânicas, propriedades ópticas, calorimetria diferencial de varredura (DSC), análise termogravimétrica (TGA), difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de infravermelho (FTIR). Na segunda etapa os melhores filmes foram caracterizados quanto à permeabilidade ao vapor de água e foram selecionados para avaliar seu efeito ativo (antiescurecimento) em maçãs minimamente processadas. Os resultados indicaram que a utilização do filme com 3 % de argila montmorilonita e 5% de ácido cítrico foi eficaz na redução da permeabilidade ao vapor de água, no escurecimento enzimático e manutenção da qualidade de maçãs minimamente processadas durante armazenamento por 8 dias em a 5 ± 2 °C e $85 \pm 3\%$ UR.

Palavras-chave: Polímeros. Proteínas. Nanotecnologia.

GENERAL ABSTRACT

Biodegradable films are prepared with biological materials which function to act as a barrier to external elements which protect the product and increasing its shelf life. They are made from proteins, polysaccharides, lipids or their combinations. Thus, new packages have been developed in recent years as a response to consumer preferences for fresh, tasty and with a longer service life. Thus, the objective of this study was to develop a package active of whey protein isolate and nanoparticles montmorillonite (MMT), incorporated with citric acid for prevent browning. Were used whey protein isolate (IPS) as a basis for the film, glycerol as a plasticizer, nanoparticles of clay montmorillonite (MMT), antibrowning citric acid (CA). The films were developed and characterized in a first step with the following analyzes: water vapor permeability (WVP), mechanical properties, optical properties, differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA), X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and infrared spectroscopy (FTIR). In the second stage the best films were characterized for water vapor permeability and were selected to evaluate their effect on antibrowning in minimally processed apples. The results showed that the use of the film MMT3AC5 was effective in reducing the permeability to water vapor at enzymatic browning and maintenance of quality of minimally processed apples during storage for 8 days at 5 ± 2 °C e $85 \pm 3\%$ UR.

Keywords: Polymers. Proteins. Nanotechnology.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Embalagens ativas	14
2.2	Polímeros biodegradáveis	16
2.3	Soro de leite	17
2.3.1	Isolado proteico de soro de leite	19
2.4	Nanotecnologia e nanopartículas	22
2.4.1	Montmorilonita	24
2.5	Desenvolvimento de nanobiocompósitos pelo método <i>casting</i>	29
2.6	Processamento mínimo e escurecimento enzimático	31
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
	REFERÊNCIAS	36
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	50
	ARTIGO 1 Efeito do ácido cítrico/montmorilonita nas propriedades estruturais, térmicas e mecânicas de nanocompósitos de proteínas do soro de leite	50
	ARTIGO 2 caracterização morfológica, estrutural, óptica e de barreira de filmes de isolado proteico de soro de leite	83
	ARTIGO 3 Efeito de filmes ativos de isolado proteico de soro de leite na conservação de maçãs minimamente processadas	106

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Polímero biodegradável tem sido alvo de estudo em busca de soluções favoráveis ao meio ambiente. Porém, tecnologias atualmente aplicadas a esses polímeros requerem melhorias em suas propriedades. Um dos primeiros filmes plásticos biodegradáveis utilizados foi o celofane (obtido a partir do xantato de celulose), material flexível, transparente e com boas propriedades mecânicas, porém, sensível à umidade (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

Dentre os materiais pesquisados para elaboração de filmes biodegradáveis, o soro de leite bovino tem apresentado destaque por se tratar de um subproduto da indústria do queijo, apresentando-se como uma nova aplicação com intuito de agregar valor aos resíduos dos laticínios. Possui alto valor nutritivo e devidamente processado, seja como concentrado ou isolado proteico, constitui-se como bom ingrediente na fabricação de vários alimentos industrializados. Além disso, a produção de filmes de proteínas de soro de leite pode representar uma aplicação significativa para agregar valor a um resíduo descartável, sem valor comercial, com vantagem na formação de filmes transparentes, flexíveis e sem odor e sabor (YOSHIDA; ANTUNES, 2009).

No entanto, a fim de tornar biopolímeros capazes de competir com os polímeros tradicionais como o polietileno ou polipropileno, ainda há necessidade de melhorar suas propriedades, incluindo a estabilidade térmica, propriedades mecânicas e propriedades de barreira (WANG et al., 2005). Assim, a nanotecnologia tem recebido grande atenção, visando à sua aplicação na área de embalagens para alimentos, uma vez que embalagens constituídas a partir de materiais poliolefinicos ou biodegradáveis, incorporadas com nanocompostos, apresentam propriedades mecânicas, ópticas, antimicrobianas e de barreira

melhorada. O desenvolvimento de novos materiais, novos produtos e processos baseados na incorporação de nanocompostos na matriz polimérica é visto como a mais importante das nanotecnologias na área de alimentos (BAO; TJONG, 2008; BOUWMEESTER et al., 2009; CHO et al., 2009; VARTIAINEN et al., 2010). Várias nanopartículas inorgânicas têm sido reconhecidas como aditivos para melhorar o desempenho do polímero (SORRENTINO; GORRASI; VITTORIA, 2007). Dentre elas destaca-se a nanoargila montmorilonita, a qual apresenta elevada razão de aspecto, boa capacidade de delaminação, partículas resistentes a solventes, às temperaturas empregadas em polimerização e às temperaturas e atrito do processo de extrusão. Em seu estado natural tende a ser hidrofílica e apresenta baixo custo (AVELLA et al., 2005; CHOULIARA et al., 2007; ŠIMON; CHAUDHRY; BAKO, 2008; SOTHORNVIT; RHIM; HONG, 2009).

A demanda por vegetais minimamente processados tem aumentado devido à sua conveniência, frescor e benefícios à saúde. Porém, manter a cor representa aspecto crítico, pois a maioria deles é susceptível ao escurecimento enzimático.

O uso de agentes antiescurecimento, como ácido ascórbico, cisteína, ácido cítrico e alguns ácidos contendo amino-enxofre têm sido utilizados como substitutos do sulfito, a fim de prevenir o escurecimento enzimático, sozinhos ou combinação com algum agente de firmeza ou agentes antimicrobianos (QI et al., 2011). Poucos estudos têm demonstrado que a utilização de ácido cítrico pode evitar escurecimento enzimático de frutos, melhorando assim a aparência do produto, sem alterar a sua condição de minimamente processado (ANDRÉS; GIANNUZZI; ZARITZKY, 2002; CHIUMARELLI et al., 2011; MODA et al., 2005). Assim, filmes de polímeros naturais incorporados com compostos têm despertado interesse, pois, além de reduzir o impacto sobre o meio ambiente, proporciona, de maneira saudável e eficaz, qualidade aos alimentos. O princípio

de atuação desse tipo de embalagem é a adição de substâncias ao filme que são liberadas de maneira controlada e, por isso, estão presentes em menores quantidades no alimento (GÜÇBILMEZ; YEMENICIOFLU; ARSLANOFLU, 2007).

Nesse contexto, objetivou-se com este trabalho desenvolver uma embalagem ativa com ação antiescurecimento de isolado proteico de soro de leite e nanopartículas de argila montmorilonita sódica (MMT-Na⁺). Os objetivos específicos deste estudo foram: caracterizar a embalagem ativa quanto às propriedades mecânicas, ópticas, de barreira e estruturais (artigo 1 e 2). Aplicar a embalagem ativa em fruta minimamente processada e avaliar a influência do filme na inibição do escurecimento e manutenção da qualidade do fruto (artigo 3).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Embalagens ativas

Embalagens de alimentos são tradicionalmente utilizadas para permitir a comercialização do produto e fornecer proteção passiva contra agentes ambientais que afetam a vida útil, assegurando a qualidade do produto. Durante muito tempo, as embalagens adquiriram a função de comunicação do produto com o consumidor, levando a área de *marketing* a desenvolver embalagens que permitissem aumentar o interesse do consumidor pelo produto. Várias pesquisas apontam a importância da embalagem na decisão de compra dos consumidores, visto que a maioria das pessoas associa embalagem à qualidade do produto em si (MESTRINER, 2005; PEREIRA DE ABREU et al., 2007).

Embora as embalagens tradicionais tenham contribuído grandemente com os primeiros desenvolvimentos do sistema de distribuição de alimentos, elas não são suficientes para atender às novas exigências dos consumidores por produtos mais próximos ao natural, contendo menos conservantes e que sejam seguros. Assim, novas tecnologias de embalagens vêm sendo desenvolvidas em resposta a essa demanda (DAINELLI et al., 2008; YAM; TAKHISTOV; MILT, 2005).

Dentre essas tecnologias, destacam-se as embalagens ativas, que visam interagir com o produto alimentício, modificando, de maneira desejável, características sensoriais, nutricionais e de segurança microbiológica do alimento, prolongando assim, sua vida útil e mantendo sua qualidade. Esses sistemas possuem funções como adsorção e liberação (por exemplo, eliminadores de oxigênio, captadores de etileno, absorvedores de líquidos e umidade, sabor ou odor e absorventes liberadores, agentes antimicrobianos, etc.).

São diversas as aplicações das embalagens ativas, dependendo da exigência do produto embalado: redução do nível de umidade (em casos de alto grau de umidade relativa entre o alimento e ambiente); controle dos níveis de etileno para inibir o amadurecimento e senescência das frutas; liberação de aditivos para prevenir o crescimento de micro-organismos como bolores; controle das trocas gasosas com o ambiente, no caso de alimentos frescos; controle de O₂, no caso de alimentos oxidáveis, entre outros (MORAES, 2006; PONCE; BUENO; LUGÃO, 2009).

Essa técnica consiste na incorporação e/ou imobilização de certos aditivos à embalagem em vez da incorporação direta no produto, por meio da liberação controlada, durante a comercialização, aumentando a qualidade do alimento. Alguns sistemas de embalagens ativas já foram desenvolvidos e encontram aplicação em produtos disponíveis no mercado (KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006; GÜÇBILMEZ; YEMENICIOFLU; ARSLANOFLU, 2007). Embalagens com atmosfera modificada é um sistema de embalagens ativas que vêm sendo utilizados em frutas e hortaliças para manter a qualidade e assegurar o tempo de armazenamento. A atmosfera no interior de uma embalagem selada que contém um produto que respira, muda com o tempo, devido ao consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono que ocorre como um resultado do processo de respiração, até uma concentração de equilíbrio desses gases dentro da atmosfera da embalagem. Assim, concentrações de gases são injetadas dentro da embalagem em função da taxa de respiração e peso do produto na embalagem, e características de permeabilidade da embalagem para esses gases, a fim de melhorar a atmosfera da embalagem e aumentar a vida útil desses vegetais (JIANG et al., 2010; WILSON, 2008; XING et al., 2010).

Embalagens ativas com suas propriedades melhoradas têm surgido com os avanços da nanotecnologia e melhoria de nanomateriais. Essas embalagens

proporcionam grandes benefícios para a indústria de alimentos com o objetivo de melhorar o frescor, vida útil, e permitir o monitoramento para controlar as condições de armazenamento do local de produção até o consumo pelo consumidor final (PEREIRA DE ABREU; CRUZ; PASEIRO LOSADA, 2012).

2.2 Polímeros biodegradáveis

De acordo com a *American Society Standard Testing and Materials - ASTM – D883-00*, norma que padroniza as terminologias relativas aos plásticos, polímero degradável “é um plástico projetado a submeter-se a mudanças significativas em sua estrutura química sob circunstâncias ambientais específicas tendo por resultado perda de algumas propriedades”. Segundo a mesma norma, plástico biodegradável “é um plástico degradável em que a degradação resulta da ação de micro-organismos naturais tais como fungos, bactérias e algas” (AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS - ASTM, 2000).

Os polímeros biodegradáveis podem ser classificados de acordo com a sua fonte: polímeros diretamente extraídos ou removidos de biomassa, por exemplo, polissacarídeos, proteínas, polipeptídeos e polinucleotídeos; polímeros produzidos por meio de sínteses químicas usando monômeros de origem natural ou misturas de monômeros obtidos de biomassa e petróleo; polímeros produzidos por micro-organismos ou bactérias geneticamente modificadas, tais como polihidroxibutirato (PHB), celulose, entre outros (SORRENTINO; GORRASI; VITTORIA, 2007).

O interesse em polímeros biodegradáveis tem crescido muito nos últimos anos e várias pesquisas relacionadas a esse assunto vem sendo desenvolvidas. Atualmente, existem vários materiais já descritos na literatura que podem ser produzidos, pelo menos em parte, a partir de matérias-primas

renováveis e que são biodegradáveis, ou parcialmente biodegradáveis. Assim pode-se citar alguns polímeros biodegradáveis como polímeros de amido, polilactatos (PLA), polihidroxicanoatos (PHAs), poliésteres alifáticos aromáticos (PAA), poliuretanas (PURs) e *nylon* (PRADELLA et al., 2006).

Visando a necessidade em substituir os materiais poliméricos convencionais por materiais que sejam mais compatíveis com a preservação ambiental e desenvolvimento sustentável, os polímeros biodegradáveis são uma alternativa importante, principalmente aqueles desenvolvidos a partir de recursos renováveis (CRIPPA, 2006).

2.3 Soro de leite

O soro do leite é um subproduto resultante da fabricação de queijos, por coagulação da caseína, obtido por adição de ácido ou de enzima constituído de água, proteínas de elevado valor biológico, lactose e sais minerais. Possui alto valor nutricional, conferido pela presença de proteínas com elevado teor de aminoácidos essenciais, destacando-se no conteúdo em sulfurados (CAPITANI, 2005; NEVES, 2001; ZADOW, 1997). Pode ser definido como a fração aquosa do leite que é separada da caseína durante a produção de queijos, correspondendo a cerca de 90% do volume do leite, com aproximadamente 20% das proteínas solúveis do leite, quase todo o açúcar do leite (lactose) e cerca de 50% de todos os nutrientes consumidos normalmente no leite permanecem no soro (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994). Quando concentrado, implica na obtenção de vários ingredientes proteicos de alta funcionalidade e valor nutricional (SILVA; BOLINI, 2006).

É um líquido opaco, amarelo-esverdeado causado pela presença de riboflavina (vitamina B2), que pode ser obtido em laboratório ou na indústria por três processos principais: coagulação enzimática (enzima quimosina),

resultando no coágulo de caseínas, matéria-prima para a produção de queijos e no soro doce; por precipitação ácida no pH isoelétrico (pI), resultando na caseína isoelétrica, que é transformada em caseinatos e no soro ácido; e por separação física das micelas de caseína por microfiltração, obtendo-se um concentrado de micelas e as proteínas do soro, na forma de concentrado ou isolado proteico. No Brasil, a produção de soro é constituída quase que exclusivamente de soro doce, rico em lactose (DE WIT, 2001; PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012; SGARBIERI, 2004).

O soro de leite tem sido descartado, diretamente no meio ambiente e representa um problema em termos de poluição ambiental. Devido à sua elevada carga orgânica (lactose responsável por aproximadamente 90%) e grande volume gerado, deve possuir um adequado tratamento antes de ser descartado, visando aplicações que lhe agregariam maior valor comercial (ANTUNES, 2003; FLORENTINO, 2004; GHALY; KAMAL, 2004; RIVAS; PRAZERES; CARVALHO, 2011). Normalmente, os processos biológicos e físico-químicos são utilizados para tratar esse efluente da indústria de lácteos (KUSHWAHA; SRIVASTAVA; MALL, 2010).

A proteína do leite é composta de 80% de caseína e 20% de proteínas de soro. Estas são obtidas a partir do soro de queijo e separadas da lactose por ultrafiltração, sendo evaporadas e liofilizadas. As proteínas do soro apresentam uma estrutura globular contendo algumas pontes de dissulfeto, que conferem certo grau de estabilidade estrutural sendo formadas por cinco frações: α -Lactoalbumina (α -La), β -Lactoglobulina (β -Lg), albumina sérica bovina (BSA), imunoglobulinas (Ig) e peptona-protease, sendo a β -Lg o componente de maior concentração, representando 50 a 60% das proteínas. Comercialmente, são produzidas proteínas de soro concentradas (CPS) com 80% de proteína e proteínas isoladas de soro (IPS) com um conteúdo de proteína maior que 90%

(CHEN, 1995; SORTHORNVIT; KROCHTA, 2001; VILLADIEGO et al., 2005).

2.3.1 Isolado proteico de soro de leite

Proteínas extraídas da porção aquosa do leite, também chamadas de *whey protein*, geradas no processo de fabricação do queijo, são estudadas em razão da qualidade nutricional, alto teor de aminoácidos essenciais, cálcio e peptídeos que oferecem (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006; LÖNNERDAL, 2003). O soro de leite, quando concentrado, apresenta ingredientes proteicos de alta funcionalidade e valor nutricional (SMITHERS, 2008; ZADOW, 1997). Pesquisadores vêm usando as proteínas do leite, como caseína, e do soro, na elaboração de filmes comestíveis e biodegradáveis. Essa é uma nova aplicação dos ingredientes derivados do leite, fornecendo uma alternativa à indústria de produtos lácteos, agregando, assim, valor aos seus resíduos (VILLADIEGO et al., 2005).

As proteínas do soro de leite têm sido utilizadas devido às suas propriedades funcionais, como a gelatinização, emulsificação, solubilidade, formação de espuma, viscosidade, valor nutricional, sendo uma excelente fonte de aminoácidos essenciais. Os ingredientes do soro de leite são encontrados sob diferentes formas, e após o processamento do queijo ou caseína, o soro de leite contém 93% de água e apenas 0,6% de proteína. Assim, o soro de leite é concentrado por ultrafiltração e diafiltração e classificado conforme sua composição, geralmente relacionada ao teor de proteína, conforme Tabela 1 (HUFFMAN, 1996; SMITHERS, 2008; YOSHIDA; ANTUNES, 2009).

Tabela 1 Classificação de ingredientes de soro de leite

Tipo	Teor de proteína (%)	Teor de lactose (%)	Cinzas (%)	Teor de gordura (%)
Soro em pó	13	76	10	1
WPC 35*	34-35	53	8	4
WPC50	53	35	7	5
WPC 80	80	7	4-7	4-7
WPI**	90	1	3	1

Fonte: Huffman (1996)

* WPC, *Whey protein concentrated* (concentrado proteico de soro de leite)

** WPI, *Whey protein isolated* (isolado proteico de soro de leite)

O concentrado proteico de soro de leite (CPS 80) e o isolado proteico de soro de leite (IPS) apresentam maior potencial de aplicação quanto às propriedades funcionais e são obtidos por concentração através de ultrafiltração utilizando uma membrana com porosidade que permite a separação da lactose, sais e minerais (permeado) das proteínas e gorduras (retentado) seguida de secagem por atomização, concentrando até 35-50% de proteína. Para a obtenção de um concentrado com maior teor de proteína o processo de diafiltração é aplicado. Esse processo consiste na adição de água no retentado, seguida por uma nova ultrafiltração, sendo o produto seco por atomização atingindo 80% de proteínas e reduzindo o teor de lactose do produto. Para a obtenção do isolado proteico de soro de leite (IPS), aplica-se mais um processo: a purificação por troca iônica aumentando o teor de proteína e reduzindo o teor de lactose e sais minerais (BRYANT; MCCLEMENTS, 1998; PÉREZ-GAGO; KROCHTA, 2002; YOSHIDA; ANTUNES, 2009). A diferença entre o CPS e o IPS na formação de filmes está relacionada com a maior quantidade de impurezas (tais como lactose) presentes no CPS, que poderia gerar descontinuidades na matriz de proteína e como consequência aumentar a permeabilidade a gases e diminuir propriedades mecânicas (KHWALDIA et al., 2004; OSÉS et al., 2009; RAMOS et al., 2012).

Os filmes proteicos podem ser utilizados como um complemento à embalagem sintética, prolongando a vida útil e garantindo maior qualidade ao produto final, além de apresentar um potencial econômico, pois sua matéria-prima é de baixo custo e biodegradável (YOSHIDA; ANTUNES, 2009).

Diversas aplicações para as proteínas do leite têm sido relatadas, mas nada foi muito investigado. Filmes à base de proteínas do soro de leite têm sido estudados devido às suas propriedades de formação de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis e por apresentarem boa resistência mecânica e apresentam excelentes barreiras ao oxigênio, lipídeos e aromas. Porém, como outros filmes à base de proteínas, devido à sua natureza hidrofílica, apresentam baixa barreira à umidade (CHICK; USTUNOL, 1998; KIM; USTUNOL, 2001; MILLER; KROCHTA, 1997; OSÉS et al., 2009; PÉREZ-GAGO; KROCHTA, 2002). Suas propriedades de barreira à umidade podem ser melhoradas com a incorporação de substâncias hidrofóbicas, como os lipídeos (KIM; USTUNOL, 2001). A inclusão de plasticizantes auxilia na melhoria da fragilidade dos filmes, oferecendo flexibilidade e aumentando sua permeabilidade ao vapor de água (OSÉS et al., 2009; RAMOS et al., 2012; SHAW et al., 2002).

Kim e Ustunol (2001) obtiveram bons resultados com filmes à base de isolado proteico de soro de leite, ressaltando a formação de filmes transparentes, o que favoreceu sua aplicação. Filmes obtidos a partir de proteínas de soro de leite caracterizam-se pela transparência, flexibilidade, ausência de odor e sabor, favorecendo sua aceitabilidade para consumo.

Pesquisadores afirmam que os filmes à base de proteínas de soro de leite não apresentam aroma e sabor, possuem flexibilidade e, dependendo da formulação, variam de transparente a translúcidos. Isso favorece a aplicação em tecnologia de alimentos (KIM; USTUNOL, 2001; SABATO et al., 2001).

2.4 Nanotecnologia e nanopartículas

A nanotecnologia abrange a ciência, engenharia e tecnologia na escala *nano*, além de envolver o projeto, a produção, a caracterização e a aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas controlando a forma e o tamanho nessa escala. Um nanômetro equivale a um milionésimo de um milímetro ou a um bilionésimo de um metro. O prefixo “*nano*” tem origem grega e significa anão. (KUMAR et al., 2009).

A incorporação de cargas (partículas) inorgânicas em polímeros origina materiais com maior resistência mecânica, maior estabilidade térmica, estrutural e propriedades ópticas, magnéticas ou elétricas superiores (BRADLEY; CASTLE; CHAUDHRY, 2011; MORAIS et al., 2003; OU; YU, 1998). Com a evolução da tecnologia nos processos de fabricação de novos materiais, houve o surgimento de diferentes tipos de nanocargas empregadas na área de polímeros, as quais proporcionam características únicas à matriz em função de seu grau de dispersão, orientação na matriz, adesão interfacial matriz-reforço, sua morfologia controlada e pequeno volume, por consequência grande área superficial (TZONG-MING; CHENG-YANG, 2006).

As nanocargas são classificadas de acordo com o número de dimensões que ela possui na escala nanométrica, conforme Figura 1, correspondendo aos grupos lamelares, no qual uma das três dimensões da partícula de reforço é na escala nanométrica (grafeno e argila montmorilonita); fibrosas, possui duas dimensões nanométricas (nanocristais de celulose e nanotubos de carbono) e isodimensionais ou esféricas, no qual todas as dimensões encontram-se na escala nanométrica (nanopartículas metálicas, negro de fumo e nanocarga de sílica) (BRADLEY; CASTLE; CHAUDHRY, 2011; TIDJANI; WILKIE, 2001).

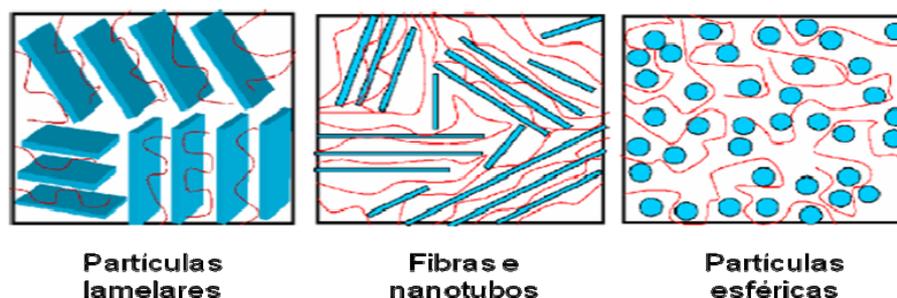


Figura 1 Tipos de Nanopartículas
Fonte: Liberman (2005)

Apesar do potencial da nanotecnologia revolucionar o setor de alimentos desde a produção até processamento, embalagem, transporte e armazenagem, a segurança do consumidor, ambiental, política e ética são assuntos muito discutidos. A principal preocupação é sobre a falta de conhecimento sobre os potenciais efeitos das nanopartículas sobre a saúde humana e meio ambiente. Isso ocorre porque as propriedades físicas, químicas e biológicas dos materiais em tamanho nanométrico podem ser substancialmente diferentes dos convencionais, e seus efeitos e impactos não podem ser previstos a partir do conhecimento existente de materiais convencionais (BRADLEY; CASTLE; CHAUDHRY, 2011; ŠIMON; CHAUDHRY; BAKO, 2008). Outra questão seria o uso de nanomateriais e nanotecnologias em embalagens de alimentos, especialmente a migração de qualquer composto no produto, ter um impacto negativo sobre a segurança ou qualidade do alimento (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA, 2009). Com relação ao impacto ambiental, a preocupação diz respeito à eliminação dos materiais de embalagem e como afetaria a reciclagem desses materiais, ou seja, se comprometeria o desempenho dos sistemas de reciclagem já existentes (BRADLEY; CASTLE; CHAUDHRY, 2011). Com relação à migração desses compostos, mais estudos são necessários para chegar a uma afirmação conclusiva. São poucos os dados disponíveis sobre a possível migração de nanocompostos em alimentos, principalmente em função

da escassez de métodos para a detecção de nanopartículas em matrizes de alimentos (BOUWMEESTER et al., 2009).

2.4.1 Montmorilonita

Matérias-primas formadas pela alteração de silicatos componentes de rochas, constituídas por aluminossilicatos hidratados (argilominerais), com resquícios de feldspato e quartzo são chamados de argilas. Entre os nanomateriais utilizados na preparação de nanocompósitos, 70% do volume utilizado são argilas organofílicas também conhecidas como nanoargilas obtidas a partir de bentonitas. As bentonitas são uma mistura de argilas, geralmente impuras, de grãos muito finos, compostas essencialmente por argilominerais do grupo das esmectitas, sendo mais comum a montmorilonita em concentrações que podem variar de 60 a 95%. Pode ainda conter minerais acessórios como: quartzo, cristobalita, feldspato, pirita, carbonatos, clorita, caulinita, mica e ilita (GONZAGA et al., 2005; SOUZA SANTOS, 1989; VARTIAINEN et al., 2010).

A argila montmorilonita é composta de várias camadas individuais que são mantidas juntas por forças de *Van der Walls* e eletrostáticas, devido a substituições isomórficas nas camadas. Assim a água e outras moléculas polares podem entrar entre as camadas levando à expansão da estrutura da rede. Pertence ao grupo dos filossilicatos (2:1), cujas camadas estruturais (lamelas) são caracterizadas por estruturas constituídas por duas folhas tetraédricas de sílica com uma folha central octaédrica de alumina, que são unidas entre si por átomos de oxigênio, comuns a ambas as folhas (VARTIAINEN et al., 2010). São silicatos em camadas, resultante do arranjo empilhado das camadas de silicato de carga negativa sendo que as plaquetas contém cerca de 1 nm espessura e prolongamento das lamelas de aproximadamente 1000 nm., perfeita estrutura cristalina, com uma proporção elevada (relação entre o comprimento e

espessura) (ŠIMON; CHAUDHRY; BAKO, 2008; SOTHORNVIT; RHIM; HONG, 2009).

Dentre as nanocargas na preparação de nanocompósitos poliméricos, a argila montmorilonita é a mais utilizada, pois apresenta elevada razão de aspecto, boa capacidade de delaminação, partículas resistentes a solventes, às temperaturas empregadas em polimerização e às temperaturas de atrito do processo de extrusão, e em seu estado natural tende a ser hidrofílica. Polímeros nanocompósitos são preparados pela dispersão das nanocargas na matriz polimérica. Devido à presença de cátions de sódio entre os espaços das camadas, a MMT natural é hidrofílica, sendo miscível com material hidrofílico (MAJDZADEH-ARDAKANI; NAZARI, 2010).

No entanto, essas nanopartículas não são facilmente dispersas na maioria dos polímeros devido à sua preferência de empilhamento e aglomeração. Assim, a dispersão de nanoargilas em monocamadas é dificultada ainda mais pela incompatibilidade intrínseca de hidrofílicidade dos silicatos em camadas e plásticos hidrofóbicos. Como os polímeros são organofílicos é necessária a modificação superficial da argila por meio de reações de troca iônica com surfactantes catiônicos, como alquilamônio ou alquilfosfônio, onde ocorre a substituição dos cátions trocáveis, geralmente Na^+ presentes em lacunas existentes entre as camadas estruturais por cátions orgânicos de cadeias longas, o que torna a argila organofílica, além de proporcionar a expansão entre as galerias, facilitando assim a incorporação das cadeias poliméricas (ALEXANDRE; DUBOIS, 2000; GIANNELI et al., 2005; GORASSI et al., 2003). A substituição de cátions inorgânicos nas cavidades ou "galerias" nas estruturas da argila por surfactantes alquilamônio pode compatibilizar a química da superfície da argila e uma matriz polimérica hidrofóbica. Os híbridos resultantes do polímero-silicato em camadas possuem propriedades únicas que são atribuídos às suas características de tamanho nanométrico e elevada área

superficial da argila dispersa (KORNMANN; LINDBERG; BERGLUND, 2001).

Normalmente o uso de pequenas quantidades da nanopartículas nos nanocompósitos na ordem de 3-5%, em massa, gera melhorias equivalentes entre 20-30% nas propriedades físicas em relação a compósitos convencionais. A montmorilonita (MMT), hectorita e saponita são silicatos que têm sido utilizados como materiais reforçantes para polímeros, devido às excelentes propriedades que possuem, tais como: pequenas dimensões dos cristais que proporcionam uma elevada área específica podendo chegar a 80 m²/g, capacidade de inchamento que pode atingir 20 vezes o volume inicial quando colocada em contato com água, capacidade de sorção, resistência à temperatura e solventes, elevada capacidade de troca de cátions entre 80 a 150 meq/100 g de argila, possibilidade de intercalação/esfoliação das camadas do silicato na matriz polimérica e baixo custo. Tais argilominerais por possuírem uma camada estrutural, tipicamente com 1 nm de espessura, quando propriamente esfoliada pode levar a formação de uma matriz polimérica com grande número de partículas finamente dispersas (aproximadamente 1 µm de dimensões laterais) (CHEN; YOON, 2005; LAVORGNA et al., 2010; PARK et al., 2002).

As propriedades dos nanocompósitos são fortemente influenciadas pela forma em que a argila está dispersa no polímero. Existem três formas básicas que definem a estrutura de um nanocompósito: as camadas da argila podem estar no estado aglomerado, caracterizando um microcompósito, semelhante a um compósito convencional; podem ser intercaladas, ou seja, separadas por cadeias poliméricas, porém com ordem estrutural, que faz com que o nanocompósito adquira propriedades superiores às de um compósito convencional e delaminadas, onde as camadas estruturais estão totalmente desorientadas na matriz aumentando as interações polímero-argila, levando a significantes

melhorias nas propriedades físicas e mecânicas (ZHENG et al., 2006). A Figura 2 representa um esquema das estruturas de nanocompósitos.

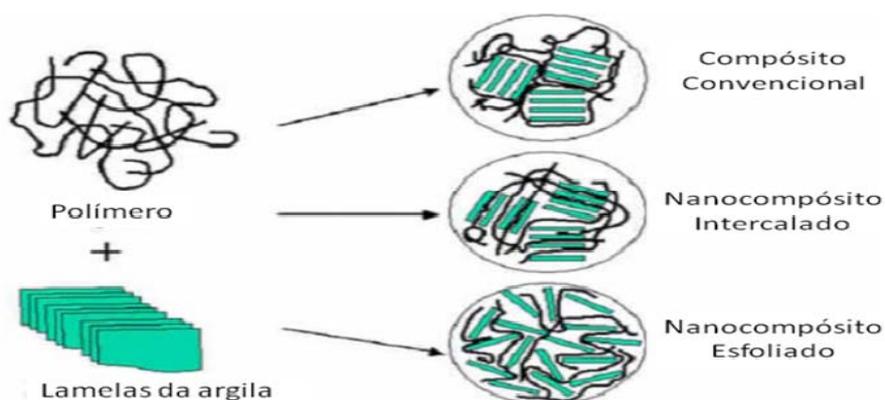


Figura 2 Diferentes níveis de dispersão do silicato através da matriz polimérica
Fonte: Tidjani e Wilkie (2001)

Essas nanopartículas incorporadas melhoram as propriedades de barreira dos materiais de embalagem (BOUWMEESTER et al., 2009) pois devido à sua estrutura única de chapa e proporção elevada, as nanoargilas podem efetivamente aumentar a tortuosidade do caminho de moléculas em difusão. Assim, uma melhora significativa nas propriedades de barreira pode ser alcançada com a adição de quantidades relativamente pequenas de argilas montmorilonita (VARTIAINEN et al., 2010). Entretanto, o teor de argila superando um limite além do qual ocorre a aglomeração de preenchimento, também chamado de limite de solubilidade de enchimento (SANCHEZ-GARCIA; LAGARON, 2010) geralmente resulta em criação de caminhos preferenciais para os permeantes e conseqüentemente difundem mais rapidamente, obtendo assim um desempenho de barreira reduzido (SANCHEZ-GARCIA; LOPEZ-RUBIO; LAGARON, 2010). Além disso, algumas nanoargilas são capazes de dispersar radiação ultravioleta devido à reflexão e

absorção reduzidas causada pelas nanocamadas de argila altamente dispersas (SANCHEZ-GARCIA; LAGARON, 2010).

Geralmente, a intercalação entre biopolímeros e nanoargila depende da compatibilidade e da polaridade da superfície de ambos os componentes. A ordem no grau de hidrofobicidade de algumas argilas é Cloisite Na⁺ < Cloisite 30B < Cloisite 20. A dispersão incompleta de nanoargila Cloisite 20A por exemplo, em matriz polimérica hidrofílica, foi causado pela incompatibilidade de nanoargila hidrofóbicas com biopolímero hidrofílico sendo necessário o tratamento ultrassom para melhorar a dispersão (SOTHORNVIT; RHIM; HONG, 2009).

A esfoliação completa das nanoargilas em plaquetas individuais muitas vezes não é alcançada e, portanto, uma morfologia mista constituída por partículas de tamanho reduzido juntamente com estruturas intercaladas e esfoliadas são obtidos. O método de *casting* não conduz à morfologia completamente esfoliada, uma vez que alcançar sistemas totalmente esfoliados é raramente obtido independentemente do método de processamento, mas ainda assim tem-se interesse em nanobiocompósitos com propriedades melhoradas, (SANCHEZ-GARCIA; LOPEZ-RUBIO; LAGARON, 2010).

Recentemente, constatou-se que nanocompósitos de quitosana e MMT organicamente modificados, tais como Cloisite 30B, exibiu atividade antimicrobiana contra bactérias *gram*-positivas. A ação antimicrobiana veio do sal de amônio quaternário da nanoargila organicamente modificada (SOTHORNVIT; RHIM; HONG, 2009)

Outros trabalhos realizados incluem compósitos poliméricos com nanoargila para melhorar a barreira a gás (SANCHEZ-GARCIA; GIMENEZ; LAGARON, 2007) e propriedade mecânica (LAVORGNA et al., 2010). Compósitos de polímeros e nanoargila estão entre os primeiros nanocompósitos

a emergir no mercado como materiais embalagens (ŠIMON; CHAUDHRY; BAKO, 2008).

2.5 Desenvolvimento de nanobiocompósitos pelo método *casting*

Os métodos de produção de filmes são divididos em “processos úmidos” ou *casting* e “processos secos” que utilizam o comportamento termoplástico apresentado por algumas proteínas e polissacarídeos em baixos níveis de umidade, incluindo as técnicas de extrusão, moldagem por compressão, injeção e sopro (LIU; KERRY; KERRY, 2006; VERBEEK; VAN DEN BERG, 2010).

A técnica denominada *casting* utilizada na produção de filmes, apresenta baixo custo e consiste em uma solução que é despejada sobre um suporte de área conhecida e deixada em repouso até que haja a evaporação do solvente e conseqüentemente desidratação do material, ocorrendo a formação do filme, sendo uma técnica mais usada em pequena escala e para pesquisa (ANDREUCETTI, 2010).

O controle da espessura dos filmes produzidos por *casting* é uma etapa que exige atenção e é, ainda, um parâmetro pouco estudado. De acordo com Mali, Grossmann e Yamashita (2010) e Sobral (2000) esse parâmetro influencia largamente as propriedades mecânicas, principalmente a força na perfuração e a permeabilidade ao vapor de água de filmes hidrofílicos. Quanto maiores as espessuras, mais resistentes à perfuração são os filmes e menor a permeabilidade ao vapor de água.

Polissacarídeos, proteínas e lípidos têm sido utilizados como materiais para a elaboração de filmes biodegradáveis. As propriedades funcionais de nanobiocompósitos dependem da sua composição e desenvolvimento do filme. Assim, o conhecimento de como cada componente interage com o outro (fisicamente ou quimicamente) facilita o desenvolvimento de filmes com

propriedades de barreira, estruturais e mecânicas, específicas (OSÉS et al., 2009).

Estudos sobre filmes baseados em hidrocoloides com incorporação de lípidos com o objetivo de aumentar sua hidrofobicidade, para melhorar a sua permeabilidade ao vapor de água têm sido realizados (MORILLON et al., 2002, RYU et al., 2005). Existem poucos estudos sobre filmes elaborados com diferentes tipos de proteínas, ou a mistura das mesmas ou diferentes tipos de carboidratos ou a combinação de carboidratos e proteínas (PARK et al., 2001; POL et al., 2002; RYU et al., 2005).

Isolado proteico de soro de leite (IPS) é um material à base de proteínas que vem sendo estudado na formação de filmes por apresentar excelente barreira ao oxigênio em baixa ou intermediária umidade relativa. Porém, em ambientes com alta umidade relativa apresentam elevada permeabilidade ao vapor de água (PVA), devido à sua natureza hidrofílica (PÉREZ-GAGO; KROCHTA, 2002). A adição de plasticizantes torna-se necessário devido à fragilidade de filmes à base de IPS, fornecendo flexibilidade e aumentando a sua PVA (SHAW et al., 2002).

Devido à grande necessidade de desenvolvimento de novos materiais em contato com alimentos, com propriedades melhoradas, propriedades mecânicas, térmicas e de barreira, e ao fato dos polímeros não apresentarem o comportamento ou as propriedades necessárias para determinadas funções, novos materiais começaram a ser estudados (BRADLEY; CASTLE; CHAUDHRY, 2011; CHAUDHRY et al., 2008; TIDJANI; WILKIE, 2001).

As nanocargas ou nanopartículas podem ser compostos orgânicos ou inorgânicos, tais como: argilas, nanotubos de carbono, sílica, carbonato de cálcio, alumina, óxido de zinco entre outros. Todos esses aditivos são caracterizados por possuir ao menos uma das suas dimensões na escala

nanométrica (BRADLEY; CASTLE; CHAUDHRY, 2011; LIBERMAN, 2005; SMOLANDER; CHAUDHRY, 2010).

2.6 Processamento mínimo e escurecimento enzimático

O processamento mínimo de alimentos oferece praticidade ao consumidor, pois em virtude do pré-preparo proporcionado pela desinfecção e cortes diferenciados, dispensam essas etapas de processamento no cotidiano e serviços institucionais. Sendo assim, o usuário reduz o tempo de preparo de alimentos, com conseqüente redução de custos (SOARES; FONSECA, 2008). A adoção da tecnologia de processamento mínimo de vegetais resulta em produtos de valor agregado pela conveniência, segurança e manutenção da qualidade sensorial e nutricional nas frutas e hortaliças (CENCI, 2011).

O processamento mínimo torna os produtos vegetais mais perecíveis devido às operações de descascamento e corte. Assim, deve-se considerar a segurança do vegetal como ponto importante a fim de minimizar ao máximo o risco de contaminação microbiológica, pois, mesmo após a colheita continuam realizando inúmeras reações metabólicas para manter a integridade dos tecidos. Os processos de pré-lavagem, processamento (corte, fatiamento), sanitização, enxágue, centrifugação e embalagem são fundamentais para a preservação das características sensoriais do produto em questão. Esses procedimentos, quando mal executados, ativam reações enzimáticas, ocasionando o início de reações deteriorativas (CENCI, 2011; DURIGAN, 2004).

O escurecimento enzimático, modificações na coloração original e amaciamento, constitui-se fatores limitantes na comercialização de frutas minimamente processadas. Durante o fatiamento de vegetais minimamente processados, o rompimento das células é responsável pela perda de líquidos intracelulares, afetando a cor, *flavor*, e textura desses produtos. Assim, a cor

torna-se parâmetro crítico de qualidade de maçãs minimamente processadas, limiando a vida útil desse produto consideravelmente (OLIVAS; MATTINSON; CANOVAS, 2006).

A comercialização de maçãs minimamente processadas é altamente influenciada pelas alterações que ocorrem na cor dessa fruta, resultante de reações enzimáticas, de compostos fenólicos e da difusão do oxigênio atmosférico nos tecidos do fruto (PEREZ-GAGO; SERRA; RIO, 2006). O escurecimento envolve a ação de polifenoloxidasas que consistem na hidroxilação de monofenóis a ortodifenóis e a oxidação de ortodifenóis a ortoquinonas. As ortoquinonas são compostos altamente reativos, cuja polimerização ocorre de forma não enzimática, promovendo a formação de pigmentos marrons, negros ou vermelhos, conhecidos como melaninas (SOARES; FONSECA, 2008).

A polifenoloxidase (PPO) pode ser inativada através do calor, exclusão de um ou ambos os substratos (O_2 e fenóis), redução do pH, reações de inativação da enzima, ou adição de componentes que diminuem a atividade enzimática da PPO ou formação de melanina (ALZAMORA; TAPIA; LOPÉZ-MALO, 2000). A eficácia de um agente antiescurecimento depende fatores tais como a cultivar, concentração, sinergia com outros antioxidantes, pH, sistemas de aplicação, dentre outros (CABEZAS-SERRANO et al., 2009; DOĞAN et al., 2005; TODARO et al., 2010).

A avaliação do escurecimento enzimático baseia-se na medição de reflectância (L^* , a^* , b^*), na superfície de frutos e vegetais recém-cortados durante a armazenagem (em estudos *in vivo*) (GARCIA; BARRETT, 2002; GHIDELLI et al., 2013).

Em minutos, reações enzimáticas, levando ao aparecimento de cor de rosa, cinzento ou castanho, podem aparecer, se os tecidos não são tratados com inibidores (CACACE; DELAQUIS; MAZZA, 2002; ROCCULI et al., 2007).

Vários inibidores químicos de escurecimento em diferentes concentrações e combinações têm sido estudados para essa finalidade. Entre eles, o ácido cítrico (AC), ácido ascórbico (AA) e L-cisteína (LC), em concentrações variando de 0,5 a 2%. O ácido ascórbico, um agente redutor, é a alternativa mais frequentemente estudada em substituição ao sulfito para inibir o escurecimento enzimático. O ácido ascórbico possui a capacidade de reduzir as quinonas de volta para os compostos fenólicos, antes da reação de formação de pigmentos (LAURILA; KERVINEN; AHVENAINEN, 1998; MCEVILY; IYENGAR, 1992; ROCCULI et al., 2007). O agente acidulante mais amplamente usado na indústria de alimentos para a prevenção do escurecimento é o ácido cítrico. Agentes quelantes e complexantes tais como o ácido cítrico, hexametáfosfato (HMP) e ciclodextrina (CD) (GHIDELLI et al., 2013; PILIZOTA; SAPERS, 2004), ou compostos que inibem diretamente as polifenoloxidasas, como cloreto de 4-hexilresorcinol (Hexyl) e cálcio (CaCl_2) possuem seu efeito inibitório sobre a polifenoloxidase (PPO), reduzindo o pH e atuando como agente quelante do cobre (ARIAS et al., 2007; GHIDELLI et al., 2013; LUO; BARBOSA-CÁNOVAS, 1997; MONSALVE-GONZALEZ et al., 1993).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado no estudo dos efeitos da nanoargila montmorilonita sódica (MMT) e do ácido cítrico (AC) no desenvolvimento de filmes biodegradáveis de isolado proteico de soro de leite observou-se que a adição de MMT isoladamente aumentou a estabilidade térmica dos nanocompósitos. Porém a combinação com AC reduziu a estabilidade térmica, sendo que o filme com 3% de MMT e 5% de AC apresentou a menor redução quando comparado aos demais filmes.

O módulo de elasticidade (ME), resistência à tração (RT), alongamento (AL) e resistência à punctura aumentaram com um teor de MMT crescente de 0 a 3% em peso, com conseqüente redução da deformação na punctura. A combinação de MMT e AC apresentou diminuição na RT e ME e aumento no AL tornando os filmes menos rígidos, mais fracos e mais extensos devido ao efeito de plasticização. Assim, os filmes com 1% de MMT combinado com 5 e 10% de AC e 3% de MMT combinado com 5% de AC apresentaram as melhores propriedades mecânicas.

A adição de ácido cítrico e montmorilonia provocaram pequenas alterações das propriedades ópticas sem afetar a aparência dos filmes. A microscopia eletrônica de varredura apresentou possíveis resultados de dispersão para os filmes com 1% de MMT; 5 e 10% AC. Os picos de espectroscopia no infravermelho apresentaram uma interação entre ácido cítrico, montmorilonita e IPS. O filme com 3% de MMT e 5% de ácido cítrico apresentou a menor permeabilidade ao vapor de água com interação de MMT e AC.

A partir da análise de permeabilidade ao vapor de água, escolheu-se a melhor combinação entre MMT e AC para avaliar a possível atividade antiescurecimento presente no filme devido à adição de ácido cítrico. Verificou-se que o escurecimento enzimático das rodela de maçãs foi reduzido para todos os filmes durante o armazenamento. Porém, os filmes contendo ácido cítrico

mantiveram as menores oscilações de cor, reduzindo a perda de qualidade associada à manutenção da acidez, sólidos solúveis, atividade de água e redução da polifenoloxidase e peroxidase, prolongando a vida útil de maçãs 'Gala'.

Assim, sugere-se a aplicação de filmes contendo argila montmorilonita e ácido cítrico a fim de diminuir a perda da qualidade e aumentar a vida útil de minimamente processados. Com a interação entre MMT e AC, foi possível a obtenção de nanocompósitos homogêneos com boas propriedades térmicas, mecânicas e estruturais para aplicação como materiais de embalagem.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, M.; DUBOIS, P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. **Materials Science and Engineering**, Lausanne, v. 28, p. 1-63, 2000.

ALZAMORA, S. M.; TAPIA, M. S.; LOPÉZ-MALO, A. **Minimally processed fruits and vegetables, fundamental aspects and applications**. Gaithersburg: Aspen, 2000. 360 p.

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard terminology relating to plastics: ASTM D883-00**. Philadelphia, 2000.

ANDRÉS, C. S.; GIANNUZZI, L.; ZARITZKY, N. E. Quality parameters of packaged refrigerated apple cubes in orange juice. **LWT Food Science and Technology**, Zürich, v. 35, p. 670–679, 2002.

ANDREUCETTI, C. **Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis a base de gelatina, plasticizantes hidrofóbicos e surfactantes Naturais**. 2010. 244 p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro do leite bovino**. Barueri: Manole, 2003.

ARIAS, E. et al. Browning prevention by ascorbic acid and 4-hexylresorcinol: different mechanisms of action on polyphenol oxidase in the presence and in the absence of substrates. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 9, p. 464-470, 2007.

AVELLA, M. et al. Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. **Food Chemistry**, London, n. 93, p. 467–474, 2005.

BAO, S. P.; TJONG, S. C. Mechanical behaviors of polypropylene/carbon nanotube nanocomposites: the effects of loading rate and temperature. **Materials Science and Engineering A**, Lausanne, v. 485, n. 1/2, p. 508-516, 2008.

BOUWMEESTER, H. et al. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Duluth, v. 53, n. 1, p. 52-62, 2009.

BRADLEY, E. L.; CASTLE, L.; CHAUDHRY, Q. Applications of nanomaterials in food packaging with a consideration of opportunities for developing countries. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 22, p. 604-610, 2011.

BRYANT, C. M.; MC CLEMENTS, D. J. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatures whey. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 9, n. 4, p. 143-151, 1998.

CABEZAS-SERRANO, A. B. et al. Screening quality and browning susceptibility of five artichoke cultivars for fresh-cut processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 89, p. 2588-2594, 2009.

CACACE, J. E.; DELAQUIS, P. J.; MAZZA, G. Effect of chemical inhibitors and storage temperature on the quality of fresh-cut potatoes. **Journal of Food Quality**, Wastport, v. 25, p. 181-195, 2002.

CAPITANI, C. D. et al. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1123-1128, 2005.

CENCI, S. A. **Processamento mínimo de frutas e hortaliças: tecnologia, qualidade e sistema de embalagem**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2011. cap. 1, p. 9-17.

CHAUDHRY, Q. et al. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 25, p. 241-258, 2008.

CHEN, G.; YOON, J. S. Nanocomposites of poly[(butylene succinate)- co-(butylene adipate)] (PBSA) and twice-functionalized organoclay. **Polymer International**, London, v. 54, p. 939-45, 2005.

CHEN, H. Functional Properties and applications of edible films made of milk proteins. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 78, n. 11, p. 2563-83, 1995.

CHICK, J.; USTUNOL, Z. Mechanical and barrier properties of lactic acid and rennet precipitated casein based edible films. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 63, n. 6, p. 1024-1027, 1998.

CHIUMARELLI, M. et al. Fresh cut 'Tommy Atkins' mango pre-treated with citric acid and coated with cassava (*Manihot esculenta* Crantz) starch or sodium alginate. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 381-387, 2011.

CHO, J. et al. Characterisation of carbon nanotube films deposited by electrophoretic deposition. **Carbon**, Elmsford, v. 47, n. 1, p. 58-67, 2009.

CHOULIARA, E. et al. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4°C. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 6, p. 607-617, 2007.

CRIPPA, A. **Estudo do desempenho de filmes multicamadas em embalagens termoformadas**. 2006. 151 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

DAINELLI, D. et al. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 19, p. 103-112, 2008 .

DE WIT, J. N. **Lecturer's handbook on whey and whey products**. Brussels: European whey products Association, 2001.

DOĞAN, S. et al. Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 776-785, 2005.

DURIGAN, J. F. **Processamento mínimo de frutas e hortaliças**. Fortaleza: Instituto Frutal, 2004. 69 p.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY .The potential risks arising from nanoscience and nanotechnologies on food and feed safety. **The European Food Safety Authority Journal**, Parma, v. 958, p. 1-39, 2009. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/958.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2013.

FLORENTINO, E. R. Aproveitamento do soro de queijo na produção de etanol visando minimizar seu impacto ambiental. In. SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 11., 2004, Natal. **Anais...** Natal: Sibelusa, 2004. 1 CD ROM.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de queijos**: manual técnico para produção industrial de queijos. São Paulo: Dipemar, 1994. 118 p.

GARCIA, E. L.; BARRETT, D. M. Preservative treatments for fresh-cut fruits and vegetables. In: LAMIKANRA, O. (Ed.). **Fresh-cut fruits and vegetables**: science, technology, and market. Boca Raton: CRC, 2002. p. 267-303.

GHALY, A. E.; KAMAL, M. A. Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. **Water Research**, New York, v. 38, p. 631-644, 2004.

GHIDELLI, C. et al. Antibrowning effect of antioxidants on extract, precipitate, and fresh-cut tissue of artichokes. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 51, n. 2, p. 462-468, 2013.

GIANNELI, W. et al. Effect of matrix features on polypropylene layered silicate nanocomposites. **Polymer Journal**, Singapore, v. 46, p. 7037-7046, 2005.

GONZAGA, A. C. et al. Preparação de argila organofílica para uso como carga nanométrica. In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Campinas, SP. **Anais...Campinas: Unicamp**, 2005. 1 CD ROM.

GORASSI, G. et al. Vapor barrier of polycaprolactone montmorillonite nanocomposites: effect of clay dispersion. **Polymer Journal**, Singapore, v. 44, p. 2271-2279, 2003.

GÜÇBILMEZ, C. M.; YEMENICIOFLU, A.; ARSLANOFLU, A. Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein Wlms incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. **Food Research International**, Barking, v. 40, p. 80-91, 2007.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.

HUFFMAN, L. M. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technology**, Chicago, v. 50, n. 2, p. 49-52, 1996.

JIANG, T. J. et al. Structure and composition changes in the cell wall in relation to texture of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) stored in modified atmosphere packaging. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, p. 742-749, 2010.

KERRY, J. P.; O'GRADY, M. N.; HOGAN, S. A. Past, current and potential utilization of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. **Meat Science**, Barking, v. 74, p. 113-130, 2006.

KHWALDIA, K. et al. Milk proteins for edible films and coatings. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 44, p. 239–251, 2004.

KIM, S. J.; USTUNOL, Z. Sensory attributes of whey protein isolate and candellila wax emulsion edible films. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 66, n. 6, p. 909-911, 2001.

KORNMANN, X.; LINDBERG, H.; BERGLUND, L. A. Synthesis of epoxy–clay nanocomposites: influence of the nature of the clay on structure. **Polymer Journal**, Singapore, v. 42, p. 1303–1310, 2001.

KUMAR, A. P. et al. Nanoscale particles for polymer degradation and stabilization—Trends and future perspectives. **Progress in Polymer Science**, Elmsford, v. 34, p. 479–515, 2009.

KUSHWAHA, J. P.; SRIVASTAVA, V. C.; MALL, I. D. Treatment of dairy wastewater by inorganic coagulants: parametric and disposal studies. **Water Research**, New York, v. 44, n. 20, p. 5867-5874, 2010.

LAURILA, E.; KERVINEN, R.; AHVENAINEN, R. The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. **Postharvest News and Information**, Wallingford, v. 4, p. 53–66, 1998.

LAVORGNA, M. et al. Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 82, p. 291–298, 2010.

LIBERMAN, S. **Nanocompósitos poliméricos**: novos mercados para a indústria do plástico. São Paulo: Braskem, 2005. Disponível em: <http://www.braskem.com.br/upload/portal_braskem/pt/produtos_e_servicos/palestras_tecnicas/Nanocomp%C3%B3sitos%20Polim%C3%A9ricos.pdf>. Acesso em: 6 set. 2011.

LIU, L.; KERRY, J. F.; KERRY, J. P. Effect of food ingredients and selected lipids on the physical properties of extruded edible films/casings. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 41, p. 295-302, 2006.

LÖNNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 6, p. 1537-43, 2003.

LUO, Y.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Enzymatic browning and its inhibition in new apple cultivars slices using 4-hexylresorcinol in combination with ascorbic acid. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 3, p. 195-201, 1997.

MAJZADEH-ARDAKANI, K.; NAZARI, B. Improving the mechanical properties of thermoplastic starch/poly(vinyl alcohol)/clay nanocomposites. **Composites Science and Technology**, Barking, v. 70, p. 1557–1563, 2010.

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

MCEVILY, A. J.; IYENGAR, R. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 32, p. 253–273, 1992.

MESTRINER, F. **Design de embalagens**. 2. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2005.

MILLER, K. S.; KROCHTA, J. M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: a review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 8, n. 6, p. 228-237, 1997.

MODA, E. M. et al. Use of hydrogen peroxide and citric acid for conservation of fresh *Pleurotus sajor-caju* mushrooms. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, p. 291–296, 2005.

MONSALVE-GONZALEZ, A. et al. Control of browning during storage of apple slices preserved by combined methods. 4-hexylresorcinol as anti-browning agent. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 58, n. 4, p. 797-800, 1993.

MORAES, R. BrasilPack 2006: feira cresce e expõe flexografia. **Plástico Moderno**, São Paulo, v. 377, mar. 2006. Disponível em: <<http://www.plastico.com.br/revista/pm377/brasilpack1.html>>. Acesso em: 12 nov. 2012.

MORAIS, P. C. et al. Study of magnetic susceptibility of magnetite nanoparticles. **Chemistry of Materials**, Washington, v. 15, p. 3, 2003.

MORILLON, V. et al. Factors affecting the moisture permeability of lipid based edible films: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 42, n. 1, p. 67–89, 2002.

NEVES, B. S. Aproveitamento de subprodutos da indústria de laticínios. In: EMBRAPA GADO DE LEITE. **Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil**: qualidade e segurança alimentar. Juiz de Fora: UFJF, 2001. p. 97-108.

OLIVAS, G. I.; MATTINSON, D. S.; CÁNOVAS, G.V. Alginate coatings of minimally processed ‘Gala’ apples. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 25, p. 89-96, 2007.

OSÉS, J. et al. Development and characterization of composite edible films based on whey protein isolate and mesquite gum. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 92, p. 56–62, 2009.

OU, F. Y.; YU, Z. Z. A new conception on the toughness of nylon 6/silica nanocomposite prepared via in situ polymerization. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, New York, v. 36, p. 789–795, 1998.

PARK, H. M. et al. Preparation and properties of biodegradable thermoplastic starch/clay hybrids. **Macromolecular Materials and Engineering**, Weinheim, v. 287, p. 553, 2002.

PARK, S. Y. et al. Biopolymer composite films based on k-carrageenan and chitosan. **Materials Research Bulletin**, New York, v. 36, p. 511–519, 2001.

PEREIRA DE ABREU, D. A.; CRUZ, J. M.; PASEIRO LOSADA, P. Active and intelligent packaging for the food industry. **Food Reviews International**, New York, v. 2, n. 2, p. 146-187, 2012.

PEREIRA DE ABREU, D. A. et al. Development of new polyolefin films with nanoclays for application in food packaging. **European Polymer Journal**, New York, v. 43, p. 2229–2243, 2007.

PÉREZ-GAGO, M. B.; KROCHTA, J. M. Formation and properties of whey protein films and coatings. In: GENNADIOS, A. (Ed.). **Protein-based films and coatings**. Boca Raton: CRC, 2002. p. 159–180.

PEREZ-GAGO, M. B.; SERRA, M.; RIO, M. A. Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrated-based edible coatings. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, n. 39, p. 84-92, 2006.

PILIZOTA, V.; SAPERS, G. M. Novel browning inhibitor formulation for fresh-cut apples. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 69, n. 4, p. 140-143, 2004.

POL, H. et al. Soy protein isolate/corn zein laminated films transport and mechanical properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 1, p. 212–217, 2002.

PONCE, P.; BUENO, V. B.; LUGÃO, A. B. Filmes biodegradáveis produzidos com poli (caprolactona) (pcl) e nanopartículas de prata: embalagens ativas para maçã. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 10., 2009, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: [s. n.], 2009.

PRADELLA, J. G. C. et al. **Biopolímeros e intermediários químicos**. 2006. p. 118. (Relatório Técnico nº 84 396-205). Disponível em: <Erro! A referência de hiperlink não é válida.>. Acesso em: 6 jan. 2013.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: a review. **Journal of Environmental Management**, London, v. 110, p. 48-68, 2012.

QI, H. et al. Extending shelf-life of fresh-cut 'Fuji' apples with chitosan-coatings. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 12, p. 62–66, 2011.

RAMOS, O. L. et al. Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. **Food Research International**, Barking, v. 45, p. 351–361, 2012.

RIVAS, J.; PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F. Aerobic biodegradation of precoagulated cheese whey wastewater. **Journal Agricultural Food Chemistry**, London, v. 59, n. 6, p. 2511-2517, 2011.

ROCCULI, P. et al. Effects of the application of anti-browning substances on the metabolic activity and sugar composition of fresh-cut potatoes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 43, p. 151–157, 2007.

RYU, S.Y. et al. Relationship between moisture barrier properties and sorption characteristics of edible composite films. **Food Science and Biotechnology**, New York, v. 14, n.1, p. 68–72, 2005.

SABATO, S. F. et al. Mechanical and barrier properties of cross-linked soy and whey protein based films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 3, p. 1397-1403, 2001.

SANCHEZ-GARCIA, M. D.; GIMENEZ, E.; LAGARON, J. M. Novel PET nanocomposites of interest in food packaging applications and comparative barrier performance with biopolyester nanocomposites. **Journal of Plastic Film and Sheeting**, Rochester, v. 23, p. 133, 2007.

SANCHEZ-GARCIA, M. D.; LAGARON, J. M. Novel clay based nanobiocomposites of biopolyesters with synergistic barrier to UV light. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 118, n. 1, p. 188-199, 2010.

SANCHEZ-GARCIA, M. D.; LOPEZ-RUBIO, A. L.; LAGARON, J. M. Natural micro and nanobiocomposites with enhanced barrier properties and novel functionalities for food biopackaging applications. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 21, p. 528-536, 2010.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SHAW, N. B. et al. Physical properties of IPS films plasticized with glycerol, xylitol, or sorbitol. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 1, p. 164-167, 2002.

SILVA, K.; BOLINI, H. M. A. Avaliação sensorial de sorvete formulado com produto de soro ácido de leite bovino. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 86-93, 2006.

ŠIMON, P.; CHAUDHRY, Q.; BAKO, Š. Migration of engineered nanoparticles from polymer packaging to food – a physicochemical view. **Journal of Food and Nutrition Research**, Bratislava, v. 47, n. 3, p. 105-113, 2008.

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins - from 'gutter-to-gold'. **International Dairy Journal**, Barking, v. 18, p. 695– 704, 2008.

SMOLANDER, M.; CHAUDHRY, Q. Nanotechnologies in food packaging. In: CHAUDHRY, Q.; CASTLE, L.; WATKINS, R. (Ed.). **RSC Nanoscience; nanotechnology series, nanotechnologies in food**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010. v. 14, cap. 6, p. 86-101.

SOARES, A. G.; FONSECA, M. J. O. Alimentos minimamente processados e filmes comestíveis. In: ROSENTHAL, A. (Ed). **Tecnologia de alimentos e inovação: tendências e perspectivas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. cap. 9. p. 117-131.

SOBRAL, P. J. A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 6, p. 1-14, 2000.

SORRENTINO, A.; GORRASI, G.; VITTORIA, V. Potential perspectives of bionanocomposites for food packaging applications. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 18, p. 84–95, 2007.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizer effect on mechanical properties of β -Lactoglobulin films. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 50, p. 149-55, 2001.

SOTHORNVIT, R.; RHIM, J. W.; HONG, S. I. Effect of nano-clay type on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/clay composite films. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 91, p. 468–473, 2009.

SOUZA SANTOS, P. **Ciência e tecnologia de argilas**. 2. ed. São Paulo: E. Blucher, 1989. v. 1, 408 p.

TIDJANI, A.; WILKIE, C. A. Photo-oxidation of polymeric-inorganic nanocomposites: chemical, thermal stability and fire retardancy investigations, **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v. 74, p. 33-37, 2001.

TODARO, A. et al. Polyphenol oxidase activity from three sicilian artichoke [*Cynara cardunculus* L. Var. *scolymus* L. (Fiori)] cultivars: studies and technological application on minimally processed production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 482, p. 1714-1718, 2010.

TZONG-MING, W. U.; CHENG-YANG W. U. Biodegradable poly(lactic acid)/chitosan-modified montmorillonite nanocomposites: preparation and characterization. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v. 91, p. 2198-2204, 2006.

VARTIAINEN, J. et al. Biohybrid barrier films from fluidized pectin and nanoclay. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 82, p. 989–996, 2010.

VERBEEK, C. J. R.; VAN DEN BERG, L. E. Extrusion processing and properties of protein-based thermoplastics. **Macromolecular Materials and Engineering**, Weinheim, v. 29, n. 5, p. 10-21, 2010.

VILLADIEGO, A. M. D. et al. Filmes e revestimentos comestíveis na conservação de produtos alimentícios. **Revista Ceres**, Lavras, v. 52, n. 300, p. 221-244, 2005.

WANG, S. F. et al. Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: Preparation and characterization. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v. 90, p. 123–131, 2005.

WILSON, C. L. **Intelligent and active packaging for fruits and vegetables**. Boca Raton: CRC, 2008. 315 p.

XING, Y. et al. Effects of chitosan-based coating and modified atmosphere packaging (MAP) on browning and shelf life of fresh-cut lotus root (*Nelumbo nucifera* Gaerth). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 684–689, 2010.

YAM, K. L.; TAKHISTOV, P. T.; MILT, Z. J. Intelligent packaging: concepts and applications. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, p. R1-R10, 2005.

YOSHIDA, C. M. P.; ANTUNES, A. J. Aplicação de filmes protéicos à base de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, p. 420-430, 2009.

ZADOW, J. G. **Modern dairy technology: advances in milk processing**. London: Elsevier, 1997. v. 2.

ZHENG, X. et al. Flammability of styrenic polymer clay nanocomposites based on a methyl methacrylate oligomerically modified clay. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v. 91, p. 289-297, 2006.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

EFEITO DO ÁCIDO CÍTRICO/MONTMORILONITA NAS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS, TÉRMICAS E MECÂNICAS DE NANOCOMPÓSITOS DE PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE

RESUMO

A utilização de nanocompósitos para liberação de substâncias ativas é uma das interessantes alternativas para preservação de alimentos de forma gradual e segura. Foram estudados os efeitos do teor de montmorilonita (MMT) e ácido cítrico (AC) sobre as propriedades térmicas, estruturais e mecânicas dos nanocompósitos de isolado proteico de soro de leite (IPS) pelo método *casting*. Houve interação significativa entre MMT e ácido cítrico ($p < 0,05$). A análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varredura revelou que a adição de MMT isoladamente aumentou a estabilidade térmica dos nanocompósitos, porém a combinação com AC reduziu, sendo que o filme com 3% de MMT e 5% de AC apresentou a menor redução quando comparado aos demais filmes. O módulo de elasticidade, resistência à tração, alongamento e resistência à punctura aumentaram com um teor de MMT crescente de 0 a 3% em peso, com consequente redução da deformação na punctura. A combinação de MMT e AC apresentou diminuição na RT e ME e aumento no alongamento tornando os filmes menos rígidos, mais fracos e mais extensos devido ao efeito de plasticização. A melhoria dessas propriedades pode ser atribuída à boa dispersão / esfoliação de MMT na matriz de IPS conforme visto nos difratogramas de raios X com concentrações de até 1% de MMT. Assim, com a interação entre MMT e AC, foi possível a obtenção de nanocompósitos homogêneos com boas propriedades térmicas, mecânicas e estruturais para aplicação como materiais de embalagem.

Palavras-chave: Dispersão. Isolado proteico de soro de leite. Caracterização.

1 INTRODUÇÃO

As embalagens sintéticas geram problemas ambientais provocados pela dificuldade de reciclagem e decomposição. A poluição ambiental provocada pelo descarte dessas embalagens como sacos, copos e garrafas de plástico à base de polímeros sintéticos tornou-se um fator de risco ao ambiente nos últimos anos.

A aplicação de polímeros biodegradáveis, derivados de fontes renováveis, em substituição aos polímeros sintéticos tornou-se um caminho promissor no desenvolvimento de novas embalagens a fim de solucionar problemas de poluição ambiental causados por resíduos de polímero sintéticos (TUNÇ; DUMAN, 2010; WANG et al., 2005; ZHANG et al., 2007).

Por ser um resíduo dos laticínios, o interesse pelo soro de leite na elaboração de filmes comestíveis e biodegradáveis, recentemente despertou interesse como uma forma de agregar valor a esse resíduo e contribuir para redução do impacto ambiental.

O isolado proteico de soro de leite, (IPS) é a forma mais pura das proteínas do soro (MULVIHILL; ENNIS, 2003). Filmes à base de isolado proteico de soro de leite (IPS) têm sido estudados devido às suas propriedades de formação de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis e por apresentarem boa resistência mecânica e excelentes barreiras ao oxigênio, lipídeos e aromas. Porém, como outros filmes à base de proteínas, devido sua natureza hidrofílica, apresentam baixa barreira à umidade que podem ser melhoradas com a incorporação de substâncias hidrofóbicas, como os lipídeos (KIM; USTUNOL, 2001; MCHUGH; AUJARD; KROCHTA, 1994; RAMOS et al., 2012).

Embalagens biodegradáveis provenientes de materiais naturais apresentam baixa propriedade de barreira, mecânicas e térmicas. Filmes de nanocompósitos à base de silicatos em camadas podem melhorar essas

propriedades do material de embalagem (KACZMAREK; PODGORSKI, 2007; TUNÇ; DUMAN, 2010; WANG et al., 2007). A montmorilonita sódica (MMT- Na^+) é a argila mais utilizada em nanocompósitos de polímeros naturais. Pode ser usada como componente em embalagens para alimentos sendo um material de reforço, natural, não tóxico, quimicamente e termicamente estável (MARTUCCI; VAZQUEZ; RUSECKAITE, 2007; RAO, 2007; TUNÇ; DUMAN, 2010). Devido à sua estrutura lamelar e alta razão de aspecto, as nanoargilas podem efetivamente aumentar a tortuosidade do caminho de moléculas em difusão. Assim, uma melhora significativa nas propriedades de barreira pode ser alcançada com a adição de quantidades relativamente pequenas de argilas montmorilonita (VARTIAINEN et al., 2010). Além disso, por ser hidrofílica, a MMT- Na^+ pode formar suspensões estáveis em água, o que facilita sua dispersão em polímeros solúveis como o isolado proteico de soro de leite.

O ácido cítrico (AC) é um ácido orgânico natural presente em alimentos cítricos. É utilizado como um aditivo alimentar em diversos processos de produção de alimentos pelo seu efeito antibacteriano e acidulante; reforça a ação antioxidante e antiescurecimento de outras substâncias e melhoria de sabores e aromas (PARK et al., 2005). Em filmes de embalagens, o ácido cítrico é adicionado a fim de aumentar o efeito antimicrobiano, a plasticização e dispersão da montmorilonita em nanocompósitos além de melhorias nas propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água (CAGRI; USTUNOL; RYSER, 2004; NING et al., 2009; SHI et al., 2007).

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da adição de ácido cítrico e nanopartículas montmorilonita sódica em filmes de isolado proteico de soro de leite produzidos por *casting*, quanto às propriedades mecânicas, térmicas e estruturais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Isolado proteico de soro de leite (IPS 9400), com 90% de proteína, foi obtido pela *Hilmar Ingredients* (Hilmar, CA, USA). Glicerol pela *Sigma Aldrich* (Brasil), ácido cítrico anidro granulado pela *Cargill* (Uberlândia, MG, Brasil) e argila montmorilonita (Cloisite Na⁺) foi fornecida pela *Southern Clay Products, Inc* (Gonzales, TX, USA).

2.2 Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido em um planejamento fatorial completo, com os seguintes fatores e níveis: montmorilonita sódica (MMT-Na⁺) e ácido cítrico (AC), sendo 0; 1 e 3% e 0; 5 e 10%, respectivamente. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os filmes elaborados de IPS foram codificados conforme Tabela 1.

Tabela 1 Filmes desenvolvidos

Filmes	MMT (g·100g ⁻¹ IPS)	AC (g·100g ⁻¹ IPS)
IPS	0	0
MMT0AC5	0	5
MMT0AC10	0	10
MMT1AC0	1	0
MMT1AC5	1	5
MMT1AC10	1	10
MMT3AC0	3	0
MMT3AC5	3	5
MMT3AC10	3	10

Os resultados das propriedades mecânicas foram avaliados utilizando-se análise de variância (ANOVA), com nível de 5% de significância utilizando-se o *software SPSS Estatistics 17* (SPSS STATISTICS, 2007). Calorimetria diferencial de varredura, análise termogravimétrica e difração de raios X foram submetidos à análise descritiva.

2.3 Desenvolvimento dos filmes

Foram desenvolvidos filmes de isolado proteico de soro de leite (IPS), sendo IPS e glicerol fixados em 6% pv e 40 % pv, respectivamente, baseado em pré-testes. O filme IPS foi preparado dissolvendo-se 6 g (m/v) de IPS com 2,4 g de glicerol (GLY) (baseado no peso de IPS) em 44 mL e 56 mL de água destilada respectivamente, sendo ambos separadamente submetidos à agitação contínua em agitador magnético durante 30 min, em temperatura ambiente. Os demais filmes representados na Tabela 1 foram desenvolvidos conforme filme IPS, sendo a MMT (1 e 3 g/ 100 g de IPS) e o ácido cítrico (5 e 10 g/ 100 g de IPS) dispersos com glicerol. Após agitação, as soluções foram vertidas uma na outra e manteve-se agitação contínua durante 10 min. em temperatura ambiente. Em seguida, o pH foi ajustado para 8 com NaOH 2N e a solução final submetida a homogeneizador ultrassônico (*Sonifier Cell Disruptor Branson - Model 450D*, Manchester, UK) durante 10 min. com potência de 80 W/25 °C. Posteriormente, as soluções foram aquecidas a 90 °C por 30 min. em banho-maria, resfriada à temperatura ambiente e vertidas em placas de vidro. O controle de espessura foi efetuado por volume aplicado no suporte, correspondendo a 110 mL. Em seguida, os filmes com dimensões 18 x 30 cm, foram secos em temperatura ambiente durante 48 h garantindo evaporação lenta do solvente e formação do filme.

2.4 Acondicionamento dos filmes e espessura

Todos os filmes foram acondicionados em temperatura controlada, 23 ± 2 °C e umidade relativa $50 \pm 5\%$ UR por 48 h antes das análises, conforme método D618-00 (AMERICAN SOCIETY STANDAD TESTING AND MATERIALS - ASTM, 2000). A espessura média dos filmes foi medida por meio da leitura em dez pontos distintos, tomados aleatoriamente em cada corpo de prova, utilizando micrômetro digital *Mitutoyo* (precisão 0,01 mm; Mitutoyo Sul Americana, Suzano, SP, Brasil).

2.5 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi realizada em calorímetro DSC modelo TA 60, (*Shimadzu Corporation*, Kyoto, Japão). O limite de detecção do aparelho é de 0,3 W, o peso da amostra foi de 4-6 mg e uma cápsula vazia foi utilizada como referência. As rampas de aquecimento e resfriamento foram fixadas em 10 °C min^{-1} e variaram entre -50 °C e 200 °C. A sequência utilizada foi: aquecimento de 25 a 200 °C para eliminar a história térmica; resfriamento de 200 a -50 °C; e um segundo aquecimento até 200 °C (ASTM, 1999; ASTM, 2003). A partir das curvas de DSC, a temperatura de transição vítrea (T_g) foi avaliada no segundo aquecimento e a temperatura inicial de degradação T_d (desnaturação), temperatura máxima de degradação, T_{max} , foram avaliadas na primeira curva de aquecimento conforme Ryan et al. (2008).

2.6 Análise Termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica dos filmes foi avaliada por análise termogravimétrica em DTA-TG Shimadzu 60 H (*Shimadzu Corporation*, Kyoto,

Japão). As análises foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio a uma taxa de fluxo de 50 mL/min., com aquecimento de 40 °C a 800 °C com uma razão de aquecimento de 10 °C/min. (LAVORGNA et al., 2010).

2.7 Difração de Raios X (DRX)

As análises de difração de raios x nos nanocompósitos foram realizadas em equipamento *Shimadzu XRD-6000* (*Shimadzu*, Tokyo, Japão) usando um cristal de grafite como monocromador com radiação de filtro de Cu- $k_{\alpha 1}$ ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$). As amostras foram fixadas em suporte de alumínio e analisadas com um passo de $0.02^\circ \text{ s}^{-1}$, 2θ de 4° - 60° , velocidade 1° min^{-1} e 30 kV, 30 mA. O espaçamento basal (d) nos compósitos foi calculado pela equação de Bragg, (Equação 1):

$$\text{sen } \theta = \lambda / 2d$$

(1)

Onde: λ corresponde ao comprimento de onda utilizado ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) para gerar a radiação no equipamento; d é a distância que se deseja calcular entre as lamelas da argila; θ (theta) é o ângulo onde se detecta o pico no difratograma.

2.8 Propriedades Mecânicas

As propriedades de tração dos filmes, resistência à tração (RT), alongamento na ruptura (AL) e o módulo de elasticidade (ME), foram medidos conforme método padrão D882-02 (ASTM, 2002), em um analisador de textura (*Stable Microsystems*, modelo TATX2i, Inglaterra) com célula de carga de 1 kN. As amostras de filmes foram cortadas em tiras ($100 \times 25 \text{ mm}$) e a separação inicial entre as garras foi de 50 mm com velocidade de 50 mm/min. A

resistência à tração (RT, MPa) foi calculada dividindo a carga máxima pela área da seção transversal do filme. O alongamento na ruptura (AL) foi calculado pela relação percentual entre o alongamento do corpo de prova e seu comprimento inicial padrão (50 mm), na ruptura. O módulo de elasticidade (ME, MPa) pela inclinação da parte linear do diagrama de tensão-deformação. Foram testados seis corpos de prova para cada filme em três repetições.

O teste de punctura foi realizado utilizando um analisador de textura (*Stable Microsystems*, modelo TATX2i, Inglaterra). Os filmes foram cortados em quadrados de 9 cm² de área e fixados em um suporte com orifício central (2,1 cm de diâmetro). Uma sonda esférica de 5,0 mm de diâmetro (sonda A/TG) foi deslocada perpendicularmente à superfície da película a uma velocidade constante de 0,8 mm/s até a sonda passar através do filme (CHEN; LAI, 2008). A resistência à punctura/ espessura (N/mm) foi calculada dividindo o valor da força no ponto de ruptura pela espessura do filme para eliminar o efeito da variação da espessura (PARK; ZHAO, 2004) e a deformação (mm) dos filmes foi determinada no ponto de ruptura. Foram testados seis corpos de prova para cada filme em três repetições.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Aparência dos Filmes

Todos os filmes de isolado proteico de soro de leite apresentaram-se flexíveis, homogêneos, transparentes, com superfícies lisas, sem poros ou fissuras. Os dois lados dos filmes possuíam aparência diferente, o lado do filme voltado para a placa de vidro apresentou-se com aspecto brilhante, enquanto que o outro lado era opaco. Ramos et al. (2012) sugerem que essa diferença na aparência é provavelmente ligada a alguma separação de fases que ocorre na solução durante a secagem. Resultados semelhantes em filmes de proteínas de

soro de leite também foram encontrados por Fernández et al. (2007) e Mchugh Aujard e Krochta (1994).

3.2 Calorimetria Diferencial de Varredura – DSC

Observou-se que a adição de MMT e AC causaram mudanças nas temperaturas iniciais e máxima de degradação. A T_d aumentou com a adição de 0 a 3% de MMT sem o efeito de AC, conforme observou-se nos filmes IPS, MMT1AC0 e MMT3AC0 (Tabela 2). O aumento na temperatura de desnaturação indica que a adição de MMT favorece a redução da mobilidade das cadeias do polímero e melhor estabilidade térmica (AOUADA; MATTOS; LONGO, 2011). A adição de AC nos filmes MMT1AC5 e MMT1AC10, causou uma diminuição na T_d e T_{max} em relação ao filme MMT1AC0. O filme MMT3AC5 obteve a melhor interação de MMT e AC na T_d e não apresentou redução da estabilidade térmica quando comparado com os demais filmes. Isso indica que a MMT auxiliou na melhoria das propriedades térmicas. Já o filme MMT3AC10 apresentou uma diminuição na T_d . Essa redução está relacionada a menor estabilidade térmica dos filmes provocada pela presença do ácido cítrico. Esse fato é atribuído à quebra das ligações de éster entre glicerol e ácido cítrico para temperaturas mais baixas de degradação (STOJANOVIC; KATSIKAS; POPOVIC, 2005). A combinação de 1% de MMT com 5 ou 10% de AC não foi suficiente para aumentar a T_{max} . Porém, os filmes MMT3AC5 e MMT3AC10 apresentaram aumento na T_{max} em relação ao filme MMT3AC0. A combinação de uma maior concentração de MMT com AC pode ter ocasionado esse aumento. Ibanoglu (2005) observou uma temperatura de desnaturação de 74,6 °C de IPS analisando o efeito de hidrocoloides sobre a desnaturação térmica de proteínas. Kokoska et al. (2010) estudaram o efeito de diferentes concentrações de IPS e glicerol e encontraram valores de T_d (60,6 a 72,5 °C) e T_{max} (68,7 a 77,1 °C).

Tabela 2 Calorimetria diferencial de varredura de nanocompósitos de IPS/MMT/AC

Filmes (g·100g ⁻¹)	T _d (°C) ^a	T _{max} (°C)	T _g (°C)
IPS	60,85	75,05	143,46
MMT0AC5	58,95	78,02	149,88
MMT0AC10	59,96	79,01	148,98
MMT1AC0	67,66	72,14	124,05
MMT1AC5	59,82	64,41	145,34
MMT1AC10	62,69	70,25	147,28
MMT3AC0	68,02	70,29	136,50
MMT3AC5	68,13	75,10	138,87
MMT3AC10	60,70	75,14	137,64

^aAbreviações: T_d, temperatura inicial de degradação (desnaturação); T_{max}, temperatura máxima de degradação; T_g, temperatura de transição vítrea

A T_g é uma transição de segunda ordem na qual ocorre o início do movimento da cadeia polimérica com a passagem do estado vítreo (moléculas mais ordenadas) para o estado de “borracha” (maior flexibilidade e menor ordenação) sendo a variação da linha base da curva de calorimetria diferencial de varredura (DSC) (CANEVAROLO JÚNIOR, 2003). Observou-se que a T_g do filme IPS foi de 143,46 °C (Tabela 2). A concentração utilizada de MMT nos filmes MMT1AC0 e MMT3AC0 não foi suficiente para aumentar a T_g ocasionando uma diminuição quando comparada ao filme de IPS. Conforme Souza et al. (2012) a incorporação de nanopartículas pode ser atribuída a quantidade de intercalante dispersos na matriz do polímero, que causa um efeito de plasticização, reduzindo a T_g. Além disso, esses autores citam que a degradação do sal de amônio presente em argilas organofílicas também influencia na estabilidade térmica. Nanocompósitos de resina epóxi com concentrações de 1, 2 e 3% de MMT foram estudados por Yang et al. (2007). Esses autores observaram um aumento na T_g com 1% de MMT e uma

diminuição com 2 e 3% em relação ao polímero epóxi. Como visto anteriormente, o efeito da plasticização do glicerol também diminui a T_g .

A adição de ácido cítrico nos filmes MMT0AC5, MMT0AC10, MMT1AC5 e MMT1AC10 aumentou a T_g diminuindo assim a mobilidade das cadeias. Conforme Djordjevic et al. (2009) e Yang et al. (2006) o ácido cítrico pode formar forte interação intermolecular com as cadeias do polímero o que resulta em menor mobilidade das moléculas, aumentando assim a T_g e melhorando a estabilidade térmica. A T_g do pó de isolado proteico de soro de leite foram reportadas por Adhikari (2009) e Zhou e Labuza (2007) que observaram valores em torno de 75 a 119 °C contendo de 7 a 16% de água e 153 °C, respectivamente.

3.2.2 Análise Termogravimétrica - TGA

A análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) foram realizadas para determinar a estabilidade térmica dos nanocompósitos de IPS/MMT/AC e suas curvas são representadas nas Figuras 1 e 2. Pode-se observar 3 estágios de degradação dos filmes na faixa de 45 °C a 800 °C.

O primeiro estágio de degradação foi observado em aproximadamente 45 a 200 °C para todos os filmes, correspondendo à perda de água e materiais voláteis, antes da T_i (MA; YU; MA, 2005; MARTINEZ-CAMACHO et al., 2010). O segundo estágio foi observado a partir de 200 a 500 °C, correspondendo à decomposição química dos componentes presentes nos filmes.

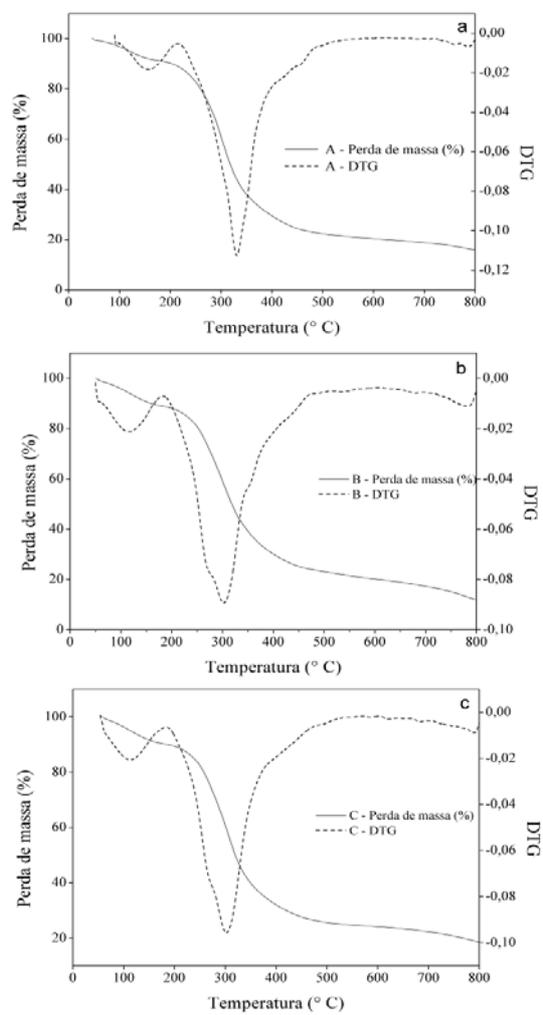


Figura 1 Curvas de TGA e DTG de filmes de IPS. a) A: IPS ; b) B: MMT0AC5; c) C: MMT0AC10

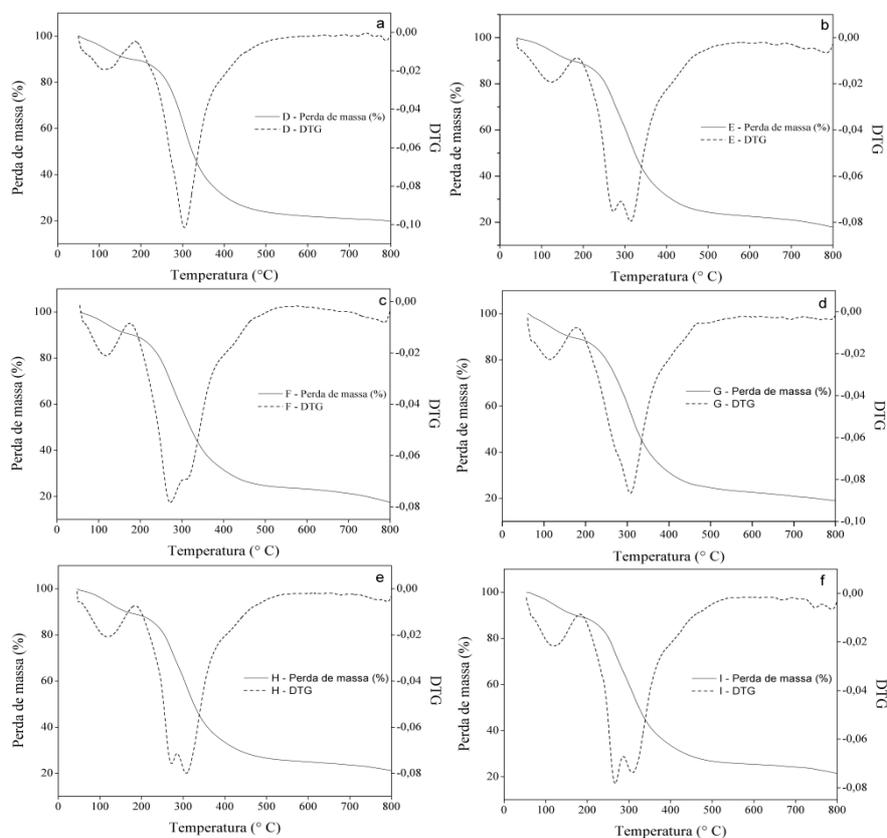


Figura 2 Curvas de TGA e DTG de filmes de IPS incorporados de MMT e AC.

a) D: MMT1AC0; b) E: MMT1AC5; c) F: MMT1AC10; d) G: MMT3AC0;
e) H: MMT3AC5; f) I: MMT3AC5.

O terceiro estágio, temperatura de 500 a 800 °C está associado com a degradação oxidativa de resíduos de carbono formados durante o segundo estágio (Figuras 1 e 2). Em atmosfera de nitrogênio, o material carbonáceo formado no terceiro estágio não é decomposto, porém, sob atmosfera de ar ocorre a oxidação completa e a perda de massa é de 100% (CANEVAROLO JÚNIOR, 2003).

Nas Tabelas 3 e 4 são representados os parâmetros de estabilidade térmica dos componentes em pó dos filmes (IPS, MMTNa⁺ e ácido cítrico) e dos

filmes, respectivamente: T_i (temperatura inicial de decomposição); DTG_{max} (temperatura máxima de decomposição); T_f (temperatura final de decomposição); PM (porcentagem de perda de massa na faixa de decomposição); $Res_{800\text{ }^\circ\text{C}}$ (porcentagem de resíduo a 800 °C).

Na Tabela 4, observou-se a adição de 1 e 3% de MMT nos filmes MMT1AC0 e MMT3AC0 aumentou a T_i e T_f em relação ao filme de IPS, indicando uma melhoria da estabilidade térmica dos filmes. Além disso, observou-se redução na porcentagem de perda de massa (% PM) desses filmes, aumento do resíduo e temperatura no qual ocorre a velocidade máxima de decomposição (DTG_{max}). Quanto menor for o intervalo de variação da porcentagem de perda de massa (% PM), mais estável é o material a decomposição térmica (CANEVAROLO JÚNIOR, 2003). Ning et al. (2009) relataram resultados semelhantes, com melhorias das interações existentes em nanocompósitos de amido termoplástico e $MMTNa^+$. Além disso, esses autores relataram que a estrutura esfoliada de $MMTNa^+$ poderia impedir a evaporação da água (efeito plasticizante). Wang et al. (2009) atribuíram o aumento da estabilidade térmica dos nanocompósitos de amido termoplástico extrusados com a adição de $MMTNa^+$ devido à intercalação e esfoliação que promove uma estrutura ("caminho tortuoso") formada na matriz, dificultando a passagem de gases e líquidos.

Tabela 3 Estabilidade térmica dos componentes em pó dos filmes IPS/MMT/AC obtidos por análise termogravimétrica

	T_i^* (° C)	DTG_{max} (°C)	T_f (° C)	PM (%) ($T_i - T_f$)	$Res_{800\text{ }^\circ\text{C}}$ (%)
IPS	260,5	301,57	351,0	85,2	14,6
Ácido cítrico	202,1	217,5	231,1	93,3	0,7
$MMTNa^+$	584,1	610,1	637,2	3,4	91,9

* T_i (temperatura inicial de decomposição); DTG_{max} (temperatura máxima de decomposição); T_f (temperatura final de decomposição); PM (porcentagem de perda de massa na faixa de decomposição); $Res_{800\text{ }^\circ\text{C}}$ (porcentagem de resíduo a 800°)

Tabela 4 Estabilidade térmica de nanocompósitos de IPS/MMT/AC obtidos por análise termogravimétrica

Filme (g·100g ⁻¹ IPS)	T _i * (° C)	DTG _{max} (°C)	T _f (° C)	(%) PM (T _i -T _f)	Res _{800 °C} (%)
IPS	255,3	301,5	366,3	74,3	16,0
MMT0AC5	249,8	302,5	372,1	75,9	12,3
MMT0AC10	253,1	302,1	357,0	70,8	18,6
MMT1AC0	261,4	304,66	368,9	69,4	19,9
MMT1AC5	246,4	314,1	382,2	70,7	17,9
MMT1AC10	232,5	309,62	377,4	72,3	17,4
MMT3AC0	268,2	307,7	376,3	70,1	19,3
MMT3AC5	266,4	303,1	371,0	68,0	21,2
MMT3AC10	237,5	308,5	368,4	68,0	21,6

*T_i (temperatura inicial de decomposição); DTG_{max} (temperatura máxima de decomposição); T_f (temperatura final de decomposição); PM (porcentagem de perda de massa na faixa de decomposição); Res_{800 °C} (porcentagem de resíduo a 800°).

Todos os filmes que continham ácido cítrico tiveram sua temperatura inicial de decomposição (T_i) reduzida em relação à presença ou ausência de MMT, apresentando baixa estabilidade térmica (Tabela 4). Assim, a adição de ácido cítrico nos filmes resultou em menor estabilidade térmica devido à quebra de ligações de éster conforme citado por Stojanovic, Katsikas e Popovic (2005). Houve pequena variação de temperatura onde ocorre a velocidade máxima de decomposição (DTG_{máx}). Isso pode ser justificado pelo mesmo teor de glicerol e água presentes no filme (MA et al., 2009).

Para os filmes MMT1AC5, MMT1AC10, MMT3AC5 e MMT3AC10, a curva de DTG apresentou uma reação secundária em 272,6; 309,62; 272,2; 308,50 °C (Figura 2b, 2c, 2e, 2f) sugerindo possivelmente a degradação de IPS e/ou ácido cítrico, conforme Tabela 3. Ma et al. (2009) estudaram filmes de amido de arroz e amido de ervilha incorporados com ácido cítrico e relataram uma temperatura de degradação de 285,7 e 294,5 °C, respectivamente.

Ramos et al. (2013) estudaram filmes de IPS e CPS com diferentes concentrações de glicerol. Esses autores observaram perda de massa acentuada

entre 280 e 500 °C. Essa perda está associada com a degradação da proteína e com o plasticizante glicerol, incorporado na matriz do filme. Resultados semelhantes de degradação proteica para outros tipos de filmes de proteína, por exemplo, caseinato de sódio e gelatina foram encontrados por Barreto, Pies e Soldi (2003).

Os resultados de TGA corroboraram com as conclusões tiradas a partir de alguns dados de DSC. Observou-se que o filme MMT3AC5 obteve a melhor combinação entre MMT e AC, com maior temperatura de decomposição e menor variação de perda de massa apresentando-se mais estável a decomposição térmica. Como observado na análise de DSC não foi possível obter um aumento na T_g devido à baixa concentração de MMT. Porém, o filme MMT3AC5 também apresentou aumento na temperatura de degradação indicando maior estabilidade térmica desse filme.

3.2.3 Difração de Raios X – DRX

Para melhor compreensão do efeito da adição da MMT, nas propriedades mecânicas dos filmes, a análise de raios X foi realizada para determinar o espaço entre as lamelas de nanoargila e a matriz polimérica.

A Figura 3 representa os padrões de difração de raios X de isolado proteico de soro de leite (IPS), argila montmorilonita sódica (MMT- Na^+) e ácido cítrico.

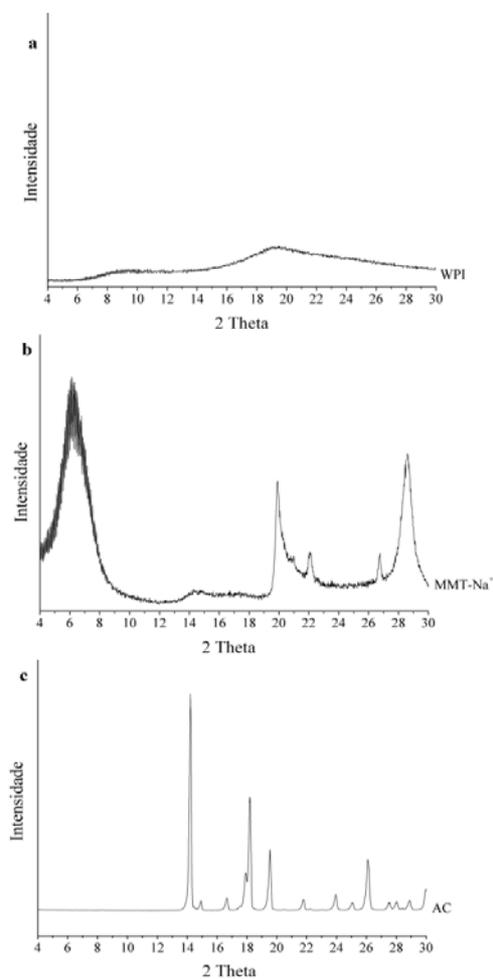


Figura 3 DRX. a) IPS: isolado proteico de soro de leite em pó; b) MMT- Na^+ : argila montmorilonita sódica; c) AC: ácido cítrico em pó.

Observou-se na Figura 3a, ausência de picos que poderiam indicar a presença de cristais de lactose no IPS. Durante o processo de secagem do soro de leite líquido, a lactose presente transforma-se em um estado amorfo (NIJDAM et al., 2007). Assim, a remoção da lactose e consequente secagem do soro de leite líquido durante o processo de concentração a IPS ou CPS torna

esses produtos amorfos. A MMT-Na⁺ apresenta o pico mais acentuado em $2\theta=6,82^\circ$; e espaçamento entre as lamelas de $d_{001}= 12,97 \text{ \AA}$ (Figura 3b). Na literatura, o espaçamento mínimo d_{001} entre as lamelas de argila montmorilonita sódica completamente seca é de cerca de 10 \AA , ou seja, $1,00 \text{ nm}$ (FORNES; PAUL, 2003). O ácido cítrico apresenta cristais e seu pico foi detectado em $2\theta=14,22^\circ$; $d= 6,23$ (Figura 3c).

Na figura 4, a presença de um pico em torno de $2\theta = 17,04^\circ$ e $2\theta = 14,08^\circ$ em todos os filmes pode estar relacionada com a adição de glicerol. Além disso, todos os filmes contendo AC também apresentaram um pico de difração em aproximadamente $2\theta = 14,22^\circ$. Lavorgna et al. (2010) estudaram filmes de quitosana e avaliaram o efeito da presença do plasticizante glicerol encontrando um pico de difração em torno de $2\theta = 20^\circ$.

Com a adição de MMT nos filmes MMT1AC0 e MMT3AC0 os picos de difração deslocam-se para $5,78$ e $5,84^\circ$, ($d_{001} = 15,30$ e $15,14 \text{ \AA}$) respectivamente. Esse fato corresponde a uma possível expansão das lamelas de MMT, com conseqüente intercalação das macromoléculas de IPS nas lamelas de MMT decorrente da combinação entre MMT e glicerol (Figura 4b e 4c). Uma nova região cristalina surgiu nos filmes, com um pico em torno de $2\theta = 11,20^\circ$ (espaçamento $d = 7,91 \text{ \AA}$). O deslocamento dos picos de MMT para ângulos inferiores indica a formação de uma nanoestrutura intercalada, enquanto que o alargamento do pico indica uma estrutura desordenada intercalada ou esfoliada (WANG et al., 2005). Esse resultado pode ser explicado pela facilidade de dispersão da MMT quando adicionadas em pequenas quantidades na matriz do filme. Tunç e Duman (2010) estudaram concentrações de 10 a 60% pv de MMTNa⁺ em filmes de metilcelulose e encontraram uma diminuição nos valores d_{001} . Esses autores relatam que com o aumento da concentração de MMTNa⁺ na solução filmogênica a dispersão torna-se difícil, pois a concentração de outros componentes do filme são constantes. Em estudos com filmes de quitosana e

montmorilonita, Lavorgna et al. (2010) citaram que a ausência de glicerol mantém as lamelas de MMTNa^+ em estruturas ordenadas, assim, a presença do glicerol nos filmes também auxilia na dispersão da argila.

Os filmes MMT1AC5 e MMT1AC10, apresentaram picos de difração em $2\Theta = 5,60^\circ$ e $5,28^\circ$; com espaçamento $d = 15,79$ e $16,75 \text{ \AA}$, respectivamente (Figura 4b). Em relação ao filme MMT1AC0, esses picos, apresentaram maior amplitude, diminuíram, e, possivelmente uma intercalação e/ou esfoliação da MMT pode ter ocorrido devido à baixa concentração de MMT e interação entre AC e MMT. Ning et al. (2009) estudaram o efeito do ácido cítrico e glicerol em nanocompósitos de amido termoplástico e montmorilonita sódica. Esses autores afirmaram que a montmorilonita possui características hidrofílicas e facilidade para se dispersar em água e demonstraram que o glicerol e o ácido cítrico podem aumentar a plasticização e o espaçamento d , favorecendo a intercalação ou esfoliação de nanocompósitos. Zhong, Song e Li (2011) atribuíram a existência de um pico largo às interações intermoleculares entre os componentes, limitando os movimentos das cadeias do polímero impedindo o processo de cristalização. Além disso, a solução filmogênica foi submetida a agitador ultrassônico com possibilidade de dispersão das lamelas de MMT.

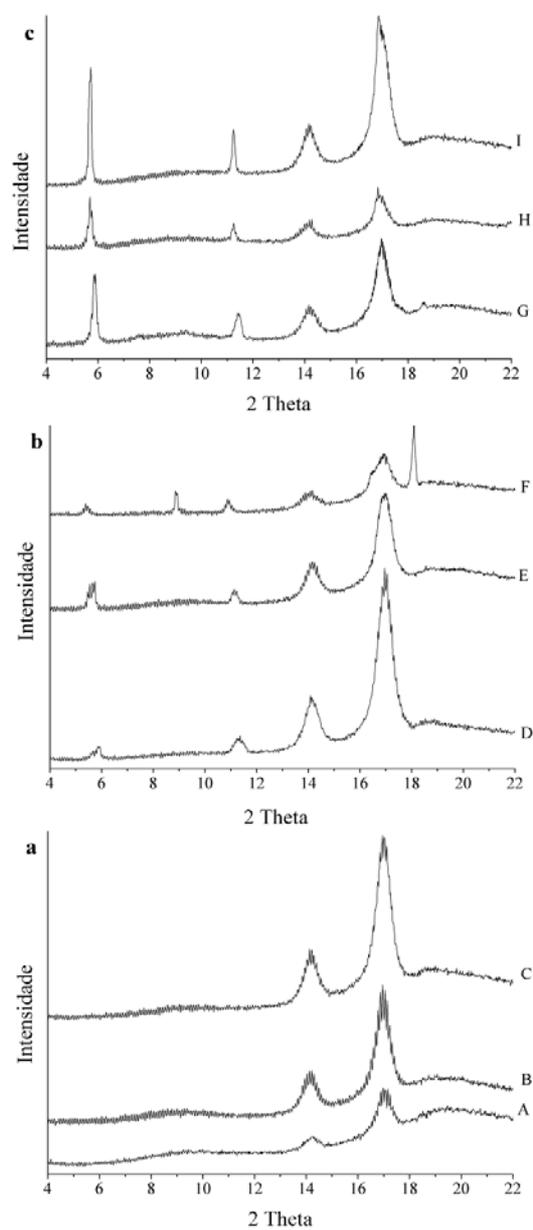


Figura 4 DRX de nanocompósitos de IPS e MMT-Na⁺. a) A: IPS; B: MMT0AC5; C: MMT0AC10; b) D: MMT1AC0; E: MMT1AC5; F: MMT1AC10; c) G: MMT3AC0; H: MMT3AC5; I: MMT3AC10.

O aumento na concentração de MMT nos filmes MMT3AC5 e MMT3AC10 apresentou picos estreitos em $2\theta = 5,72^\circ$ e $5,60^\circ$ com espaçamento $d = 15,46$ e $15,79 \text{ \AA}$, respectivamente (Figura 4c). Esses picos indicaram a não esfoliação da MMT, com possibilidade de intercalção e presença de estruturas cristalinas no filme devido à adição de ácido cítrico e aumento da concentração de MMT, dificultando assim a dispersão. Esse resultado também pode ter sido influenciado pelo tempo em que a solução filmogênica foi submetida a agitador ultrassônico, não sendo suficiente para dispersar uma maior concentração de MMT.

Ma et al. (2009) estudaram a adição de ácido cítrico em filmes de amido de ervilha preparados por extrusão, os difratogramas apresentaram um pico cristalino estreito, advindo da presença de cristais de ácido cítrico. Aouda et al. (2011) estudaram o efeito de diferentes concentrações de MMTNa^+ , em filmes de amido. Esses autores relataram uma esfoliação nas lamelas de argila com concentrações de 1 e 2%, e não obtiveram um grau de esfoliação eficiente a partir de 3% de MMTNa^+ na matriz do amido e afirmam que os picos de difração podem ser causados pelo teor elevado de argila o que poderia levar a formação de agregados de MMT. Segundo Chivrac et al. (2008) o grau de agregação da argila dependerá da intensidade do pico (alto ou baixo).

Resultados mais precisos quanto à possível intercalção ou esfoliação da argila montmorilonita podem ser concluídos com microscopia eletrônica de transmissão (MET).

3.2.4 Propriedades Mecânicas

A interação dos fatores MMT e AC foi significativa ($p < 0,05$) para RT, ME, AL, RP, DP. A Tabela 5 representou o desdobramento da interação dos parâmetros de tração e punctura, respectivamente.

Resistência à tração (RT), alongamento (AL) e módulo de elasticidade (ME) são parâmetros mais frequentemente utilizados para descrever as propriedades mecânicas de filmes. A RT é a força de tensão máxima que um filme pode sustentar. O alongamento mostra a capacidade que o filme possui de esticar antes do rompimento. Módulo de Young ou módulo de elasticidade é a razão entre a tensão de tração e a deformação, na região linear da curva tensão-deformação (conhecida como região elástica), sendo uma medida da rigidez do filme (ASTM, 2008).

Os filmes MMT1AC0 e MMT3AC0 apresentaram melhorias em relação ao filme IPS nas propriedades de tração, com aumento da RT, ME e AL. Esse aumento pode estar relacionado com uma possível intercalação e, ou esfoliação da MMT na matriz do IPS e menor movimento das cadeias poliméricas. Assim, os filmes apresentaram uma menor elasticidade (maior rigidez), maior força na tração e maior estiramento (Tabela 5). Gutiérrez et al. (2012) estudaram filmes de carboximetilcelulose (CMC) com adição de 10 g MMT/100 g CMC e relataram melhorias na resistência à tração de 54% e o módulo de elasticidade de 122%, respectivamente, quando comparado com o filme controle. Neste trabalho, a adição de 1 g MMT/100g IPS e 3 g MMT/100g IPS apresentaram um aumento de 35,65 e 71,45% no ME, respectivamente e aumento de 24,80 e 49,31% na RT, respectivamente quando comparados ao filme sem argila. Essa melhoria do ME e RT pode ser atribuída ao reforço devido à elevada razão de aspecto e área de superfície das camadas de silicato, a uma boa dispersão das camadas de argila na matriz de IPS, e fortes interações entre eles.

A adição de ácido cítrico em combinação com o glicerol e MMT apresentou um efeito de plasticização nos filmes com diminuição na RT e ME tornando os filmes menos rígidos e mais fracos. Também se observou efeito de plasticização com o aumento da extensibilidade no AL com até 1% MMT combinado com ácido cítrico e glicerol e redução com 3% MMT causado pela

presença da argila e conseqüente diminuição do efeito plasticizante e capacidade do filme para esticar (Tabela 5). A formação de filmes à base de proteínas em geral, requer a incorporação de uma quantidade mínima de plasticizante a fim de reduzir sua fragilidade. Os plasticizantes enfraquecem as forças intermoleculares entre as cadeias adjacentes do polímero, assim, ocorre um aumento da extensibilidade e flexibilidade do filme, com uma diminuição no módulo de elasticidade, resistência à tração (ALVES et al., 2007; SOBRAL et al., 2001). O glicerol é um plasticizante com alto ponto de ebulição, solúvel em água, polar e miscível em proteínas, sendo adequado para o uso com polímeros solúveis em água (KOKOSZKA et al., 2010). A presença de água em filmes hidrofílicos também possui efeito plasticizante, em condições de baixa umidade, os filmes tornam-se mais quebradiços devido à diminuição de água residual no interior do filme (COUPLAND et al., 2000). CHABRAT et al. (2012) encontraram diminuição no ME e RT e aumento no AL com a adição de ácido cítrico em filmes de ácido polilático. Esses autores relataram que não poderia existir uma competição entre glicerol e ácido cítrico na plastificação, pois a resistência diminuiu muito com o aumento da adição de ácido cítrico.

A força de punctura (resistência à punctura) é a força máxima necessária para penetrar através de um material. É a medida da dureza do filme sob a tensão aplicada perpendicularmente à sua superfície. A deformação no teste de punctura é a medida da elasticidade do filme sob tensão verticalmente aplicada. Ambos os valores de resistência à tração e à punctura podem ser utilizados como medida da dureza dos filmes (PARK; ZHAO, 2004).

Tabela 5 Tração (ME, RT e E) e punctura (RP e DR) de filmes de IPS/MMTNa⁺/AC

MMTNa ⁺ (g·100g ⁻¹)	AC (g·100g ⁻¹)	Módulo de Elasticidade (ME) (MPa)	Resistência à tração (RT) (Mpa)	Alongamento (AL) (%)	Resistência à punctura / Espessura (RP) (N/mm)	Deformação na punctura (DP) (mm)
0	0	106,53 ± 0,30 a	3,63 ± 0,40 a	60,46 ± 8,37 a	113,65 ± 4,25 c	4,65 ± 0,38 b
	5	102,95 ± 6,02 a	3,85 ± 0,81 a	89,80 ± 2,71 b	97,78 ± 9,43 b	4,78 ± 0,36 b
	10	101,33 ± 9,38 a	3,95 ± 0,56 a	78,67 ± 10,62 c	92,23 ± 6,60 a	4,04 ± 0,38 a
1	0	144,51 ± 8,36 b	4,53 ± 0,04 b	74,92 ± 9,28 a	115,50 ± 11,06 c	4,17 ± 0,59 a
	5	120,0 ± 11,73 b	2,88 ± 0,90 a	93,15 ± 7,81 b	84,73 ± 11,58 b	4,62 ± 0,39 b
	10	80,37 ± 0,0 a	3,14 ± 0,02 a	87,24 ± 5,80 b	74,81 ± 10,12 a	4,94 ± 0,36 b
3	0	182,64 ± 0,0 b	5,42 ± 0,19 c	101,86 ± 2,37 b	122,43 ± 8,59 c	3,90 ± 0,36 a
	5	62,08 ± 0,0 a	2,95 ± 0,06 a	56,46 ± 5,92 a	99,45 ± 7,91 b	4,88 ± 0,70 b
	10	90,10 ± 6,07 a	3,91 ± 0,08 b	62,58 ± 10,06 a	94,76 ± 7,45 a	4,07 ± 0,37 a

* Médias observadas na coluna com mesma letra não diferem estatisticamente (p<0,05)

Observou-se aumento da RP e menor DR dos filmes MMT1AC0 e MMT3AC0 quando comparado aos demais filmes. Isso indica menor deformação dos filmes e uma maior força seria necessária para perfuração. A adição de ácido cítrico causou uma diminuição da RP e aumento da DR (Tabela 5). A combinação do efeito plasticizante do glicerol com o ácido cítrico podem ter aumentado a mobilidade das cadeias do polímero resultando em filmes menos resistentes e mais elásticos. A redução da força de punctura e o aumento na deformação são influenciados pelo efeito da concentração de plasticizantes como o glicerol (MARAN et al., 2013). Pelos difratogramas de raios X, observou-se que a adição de AC aumentou a cristalinidade do filme MMT3AC10. A presença de cristais resultou em um filme menos resistente e com menor deformação na ruptura (menor elasticidade). O filme MMT3AC5 também apresentou cristalinidade pela análise de raios X, porém, a combinação de 3% de MMT com uma menor concentração de AC (5%) tornou o filme mais resistente e mais elástico quando comparado aos filmes MMT1AC5, MMT1AC10 e MMT3AC10.

4 CONCLUSÃO

O efeito da combinação de MMT e AC apresentaram melhorias das propriedades mecânicas, térmicas e estruturais dos filmes de isolado proteico de soro de leite. O filme MMT3AC5 apresentou-se mais estável com aumento da temperatura inicial de decomposição e menor perda de massa quando comparado aos demais filmes.

Os filmes MMT1AC0 e MMT3AC0 apresentaram aumento do módulo de elasticidade e resistência à tração, quando comparados ao filme sem argila. Os filmes MMT1AC5, MMT1AC10 e MMT3AC5 apresentaram melhores propriedades mecânicas com diminuição na resistência à tração e módulo de elasticidade, tornando os filmes mais elásticos, porém mais frágeis.

Observou-se aumento da extensibilidade no alongamento com até 1% montmorilonita combinado com ácido cítrico e uma redução com 3% MMT devido à presença da argila e consequente diminuição do efeito plasticizante e capacidade do filme para esticar. O filme MMT3AC5 apresentou-se mais elástico e com maior resistência à punção.

Os difratogramas de raios X apresentaram possivelmente uma intercalação e, ou esfoliação da MMT para os filmes MMT1AC5 e MMT1AC10.

Como reportado na literatura, o ácido cítrico é utilizado como aditivo alimentar, pelo seu efeito antibacteriano, antioxidante (antiescurecimento) e melhoria de sabores e aromas. Assim, a utilização do filme MMT3AC5 como carreador de substâncias ativas seria uma alternativa promissora para o desenvolvimento de filmes ativos visando aplicações na forma de embalagens para alimentos.

REFERÊNCIAS

ADHIKARI, B. et al. Effect of addition of proteins on the production of amorphous sucrose powder through spray drying. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 94, p. 144–153, 2009.

ALVES, V. D. et al. Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 78, p. 941–946, 2007.

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard practice for conditioning plastics for testing. ASTM D618-00**. Philadelphia, 2000.

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for enthalpies of fusion and crystallization of polymers by differential scanning calorimetry (DSC). ASTM D 3417**. Philadelphia, 1999.

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for tensile properties of plastics. ASTM D 638-08**. Philadelphia, 2008.

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. ASTM D 882-02**. Philadelphia, 2002.

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for transition temperatures of polymers by differential scanning calorimetry. ASTM D3418-03**. Philadelphia, 2003.

AOUADA, F. A.; MATTOS, L. H. C.; LONGO, E. New strategies in the preparation of exfoliated thermoplastic starch–montmorillonite nanocomposites. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 34, p. 1502–1508, 2011.

BARRETO, P. L. M.; PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v. 79, p. 147-152, 2003.

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E. T. Antimicrobial edible films and coatings. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, p. 833–848, 2004.

CANEVAROLO JÚNIOR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2003. 488 p.

CHABRAT, E. et al. Influence of citric acid and water on thermoplastic wheat flour/poly(lactic acid) blends: Thermal, mechanical and morphological properties. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 37, p. 238–246, 2012.

CHEN, C. H.; LAI, L. S. Mechanical and water vapor barrier properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsoo leaf gum films in the presence of plasticizer. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 22, p. 1584-1595, 2008.

CHIVRAC, F. et al. New approach to elaborate exfoliated starch-based nanobiocomposites. **Biomacromolecules**, Washington, v. 9, p. 896–900, 2008.

COUPLAND, J. N. et al. Modeling the effect of glycerol on the moisture sorption behaviour of whey protein edible films. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 43, p. 25–30, 2000.

DJORDJEVIC, I. et al. Synthesis and characterization of novel citric acid-based polyester elastomers. **Polymer**, Singapore, v. 50, n. 7, p. 1682–1691, 2009.

FERNÁNDEZ, L. et al. Effect of the unsaturation degree and concentration of fatty acids on the properties of IPS-based edible films. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 224, p. 415–420, 2007.

FORNES, T. D.; PAUL, D. R. Modeling properties of nylon 6/clay nanocomposites using composite theories. **Polymer**, Singapore, v. 44, p. 4993–5013, 2003.

GUTIERREZ, M. Q. et al. Carboxymethylcellulose–montmorillonite nanocomposite films activated with murta (*Ugni molinae* Turcz) leaves extract. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 87, p. 1495–1502, 2012.

IBANOGLU, E. Effect of hydrocolloids on the thermal denaturation of proteins. **Food Chemistry**, London, v. 90, p. 621–626, 2005.

KACZMAREK, H.; PODGORSKI, A. The effect of UV-irradiation on poly(vinyl alcohol) composites with montmorillonite. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, Amsterdam, v. 191, p. 209–215, 2007.

KIM, S. J.; USTUNOL, Z. Sensory attributes of whey protein isolate and candellila wax emulsion edible films. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 66, n. 6, p. 909–911, 2001.

KOKOSZKA, S. et al. Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films. **International Dairy Journal**, Barking, v. 20, p. 53–60, 2010.

LAVORGNA, M. et al. Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 82, p. 291–298, 2010.

MARAN, L. P. et al. Development of model for mechanical properties of tapioca starch based edible films. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 42, p. 159–168, 2013.

MARTÍNEZ-CAMACHO, A. P. et al. Chitosan composite films: thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 82, p. 305-315, 2010.

MARTUCCI, J. F.; VAZQUEZ, A.; RUSECKAITE, R. A. Nanocomposites based on gelatin and montmorillonite: morphological and thermal studies. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Dordrecht, v. 89, p. 117-122, 2007.

MA, X. et al. Properties of biodegradable citric acid-modified granular starch/thermoplastic pea starch composites. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 75, p. 1-8, 2009.

MA, X. F.; YU, J. G.; MA, Y. B. Urea and formamide as a mixed plasticizer for thermoplastic wheat flour. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 60, p. 111-116, 2005.

MCHUGH, T. H.; AUJARD, J. F.; KROCHTA, J. M. Plasticized whey protein edible films: Water vapor permeability properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, p. 416-423, 1994.

MULVIHILL, D. M.; ENNIS, M. P. Functional milk proteins: production and utilisation. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Ed.). **Advanced Dairy Chemistry**. New York: Kluwer, 2003. p. 1128-1176. v. 1, Part B.

NIJDAM, J. et al. An x-ray diffraction analysis of crystallised whey and whey-permeate powders. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 342, p. 2354-2364, 2007.

NING, W. et al. Effect of citric acid and processing on the performance of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 76, p. 68-73, 2009.

PARK, H. R. et al. Properties of starch/pva blend films containing citric acid as additive. **Journal of Polymers and the Environment**, Heidelberg, v. 13, p. 4, 2005.

PARK, S. I.; ZHAO, Y. Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 1933-1939, 2004.

RAMOS, O. L. et al. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 30, p. 110-122, 2013.

RAMOS, O. L. et al. Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. **Food Research International**, Barking, v. 45, p. 351–361, 2012.

RAO, Y. Q. Gelatin-clay nanocomposites of improved properties. **Polymer Journal**, Singapore, v. 48, p. 5369–5375, 2007.

RYAN, M. et al. Thermal stability of soy protein isolate and hydrolysate ingredients. **Food Chemistry**, London, v.108, p. 503–510, 2008.

SHI, R. et al. Characterization of citric acid/glycerol co-plasticized thermoplastic starch prepared by melt blending. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 69, p. 748–755, 2007.

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

SOUZA, D. H. S. Borges, S.V.; Dias, M.L.; Andrade, C.T. Structural evaluation and thermal properties of poly(lactic acid) and different synthetic micas nanocomposites. **Polymer Composites**, Brookfiel, v. 33, n. 4, p. 555-561, 2012.

SPSS STATISTICS 17.0: user's guide. Chicago, 2007.

STOJANOVIC, Z.; KATSIKAS, L.; POPOVIC, I. Thermal stability of starch benzoate. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v. 87, p. 177–182, 2005.

TUNÇ, S.; DUMAN, O. Preparation and characterization of biodegradable methyl cellulose/montmorillonite nanocomposite films. **Applied Clay Science**, Amsterdam, v. 48, p. 414–424, 2010.

VARTIAINEN, J. et al. Biohybrid barrier films from fluidized pectin and nanoclay. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 82, p. 989–996, 2010.

WANG, K. et al. Preparation, microstructure and thermal mechanical properties of epoxy/crude clay nanocomposites. **Composites Applied Science and Manufacturing**, Amsterdam, v. 38, p. 192–197, 2007.

WANG, S. F. et al. Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: preparation and characterization. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v. 90, p. 123–131, 2005.

WANG, X. et al. Impact of pre-processing of montmorillonite on the properties of melt-extruded thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposites. **Starch – Starke**, Hoboken, v. 61, p. 489–494, 2009.

YANG, J. P. et al. Cryogenic mechanical behaviors of MMT/epoxy nanocomposites. **Composites Science and Technology**, Barking, v. 67, p. 2934–2940, 2007.

ZHANG, Q. X. et al. Preparation and crystalline morphology of biodegradable starch/clay nanocomposites. **Polymer Journal**, Singapore, v. 48, p. 7193–7200, 2007.

ZHONG, Y.; SONG, X.; LI, Y. Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch–chitosan composite films as a function of acid solvent types. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 84, p. 335–342, 2011.

ZHOU, P.; LABUZA, T. P. Effect of water content on glass transition and protein aggregation of whey protein powders during short-term storage. **Food Biophysics**, Switzerland, v. 2, p. 108–116, 2007.

ARTIGO 2

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, ESTRUTURAL, ÓPTICA E DE BARREIRA DE FILMES DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE

RESUMO

Filmes de nanocompósitos de isolado proteico de soro de leite (IPS)/montmorilonita sódica (MMTNa⁺)/ácido cítrico (AC) foram preparados pelo método *casting*. O efeito do teor de argila e do ácido cítrico foi estudado quanto às propriedades de barreira ao vapor de água, ópticas, morfológicas e estruturais. O filme com 3% de MMT e 5% de ácido cítrico sofreu interação significativa entre MMT e AC apresentando menor PVA. A adição de AC e MMT provocou pequenas alterações das propriedades ópticas sem afetar a aparência com filmes mais opacos em relação ao IPS. A microscopia eletrônica de varredura apresentou possíveis resultados de dispersão para os filmes com 1% de MMT, 5 e 10% de AC. Os picos de espectroscopia no infravermelho apresentaram uma interação entre ácido cítrico, montmorilonita e IPS.

Palavras-chave: Filmes biodegradáveis. Nanoargilas. Ácido cítrico.

1 INTRODUÇÃO

Existe um crescente interesse da sociedade pela redução do impacto ambiental causado pelo excesso de embalagens de alimentos descartadas após sua utilização. Esse fato, poderia se unir ao interesse dos consumidores que buscam maior qualidade e vida útil dos produtos com aumento em novas pesquisas sobre desenvolvimento de embalagens ativas. Assim, pesquisas sobre biopolímeros baseado em materiais de embalagens estão sendo cada vez mais exploradas (JUVONEN et al., 2011; VERBEEK; VAN DEN BERG, 2010). Biopolímeros, como polissacarídeos, proteínas, lipídios e suas misturas são considerados promissores como matrizes em sistemas de embalagens ativas devido à sua biodegradabilidade, sustentabilidade e abundância (SOTHORNVIT et al., 2010). Outra tendência em pesquisas sobre embalagens ativas visa ao estudo das interações entre os materiais da embalagem e os alimentos, a fim de avaliar a migração controlada de substâncias ativas (ARRIETA et al., 2013; PELTZER; WAGNER; GIMENEZ, 2009). As proteínas, por exemplo, são adequadas para a preparação de filmes pela sua elevada plasticidade, elasticidade (PEREDA; ARANGUREN; MARCOVICH, 2008; PEREDA et al., 2011) e seus filmes podem carrear aditivos alimentares como antioxidantes, antimicrobianos, corantes, saborizantes entre outros (SALMIERI; LACROIX, 2006).

Um aditivo que pode ser adicionado às embalagens ativas visando sua liberação controlada com objetivo de inibir reações deteriorativas nos alimentos, como o escurecimento enzimático é o ácido cítrico. O ácido cítrico não é um agente antioxidante, é um ácido orgânico, naturalmente encontrado nos vegetais que age como quelante do cobre e atua em sinergia com ácido ascórbico, eritórbito e seus sais neutros. Apresenta efeito inibitório sobre as enzimas

polifenoloxidasas inibindo escurecimento enzimático (DEL AGUILA et al., 2008).

Pesquisas têm sido realizadas avaliando o efeito da interação entre ácido cítrico e argila montmorilonita nas propriedades estruturais, mecânicas, morfológicas e de barreira de filmes biodegradáveis.

O ácido cítrico pode aumentar a plastificação, dispersão da argila montmorilonita em nanocompósitos de amido e melhorar a permeabilidade ao vapor de água (NING et al., 2009). A argila montmorilonita possui camadas de silicato que combinadas com polímeros fornecem reforço nas propriedades mecânicas, de barreira e térmicas, além de outras propriedades físico-químicas quando comparada com polímeros (UYAMA et al., 2003).

O isolado proteico de soro de leite (IPS) consiste principalmente de β -lactoglobulina (β -Lg, 44 - 70%) e α -lactoalbumina (α -La, 14 - 22%), juntamente com as imunoglobulinas e albuminas do soro bovino (BSA, 1-5%) (FOEGEDING; LUCK, 2002; KINSELLA; WHITEHEAD, 1989). É um biopolímero que tem recebido atenção para uso como material de embalagens de alimentos comestíveis ou biodegradáveis por produzir filmes transparentes e revestimentos que podem atuar como barreira ao oxigênio e fornecer certas propriedades mecânicas (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2000, 2005).

Objetivou-se avaliar o efeito do ácido cítrico combinado com montmorilonita sódica nas propriedades morfológicas (microscopia eletrônica de varredura), estruturais (espectroscopia na região do infravermelho), ópticas e resistência ao vapor de água de filmes de isolado proteico de soro de leite visando futuras aplicações como embalagens ativas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Material, delineamento experimental, desenvolvimento dos filmes, acondicionamento e espessura estão descritos no artigo 1.

2.1 Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes foi determinada por meio do método acumulante, conforme ASTM E398-03, (AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS - ASTM, 2003b), com equipamento *Permatran W 1/50 G* (Minneapolis, MN, USA). O equipamento foi calibrado com filme de referência fornecido pelo fabricante e a pressão do gás de nitrogênio utilizada foi 200-300 kPa durante os testes. Os testes foram realizados em três repetições e a PVA ($\text{gm}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$) foi calculada conforme equação 1:

$$PVA = (TPVA \cdot \delta) / \Delta P \quad (1)$$

Em que: δ é a espessura dos filmes, e ΔP representa a diferença de pressão de vapor entre as faces do filme: $\Delta P = S \cdot (R_1 - R_2)$; S é a pressão de vapor saturado na temperatura do teste (6,5537 kPa), R_1 é a UR no lado úmido da cápsula (50%) e R_2 é a UR no lado seco da cápsula (10%).

2.2 Propriedades ópticas

A cor dos filmes foi medida usando um colorímetro *Color Quest XE*, *Hunter Lab* (Reston, VA, USA) e sistema CIE (L^* , a^* , b^*) com uma fonte de luz D65, ângulo observador de 10° e modo reflectância. Os parâmetros analisados foram: (L^* , a^* , b^*), índice *haze*, e índice de saturação *chroma* (C^*).

Os resultados foram expressos como a média de três leituras. A transparência dos filmes foi determinada medindo a porcentagem de transmitância (%T) a 600 nm usando um espectrofotômetro GBC UV/VIS 918 (*Shimadzu*, Tokyo, Japão) conforme método D1746-03 (ASTM, 2003a). A transparência (T_{600}) foi calculada pela equação 2:

$$T_{600} = (\text{Log \%T})/\delta \quad (2)$$

onde δ é a espessura do filme (mm).

2.3 Microscopia Eletrônica de Varedura (MEV)

Filmes de aproximadamente 2 mm foram utilizados para obter as micrografias na microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise foi realizada em microscópio LEO 1430 VP (*Zeiss*, Cambridge, Inglaterra) com voltagem de aceleração de 20 kV. As amostras foram colocadas em “stubs” com fita de carbono e revestidas em ouro, sob vácuo por 180 segundos (metalização), fixados ao microscópio e fotomicrografados.

2.4 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR) dos filmes foi medida em espectrofotômetro *Thermo Scientific Nicolet 6700* equipado com um detector KBr-DTGS e um divisor de feixe KBr (*Vernon Hills*, Illinois, USA). Amostras de cada filme foram utilizadas para a realização de 64 varreduras na faixa média do infravermelho (4000 a 400 cm^{-1}), com resolução espectral de 4 cm^{-1} para obtenção dos espectros.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Permeabilidade ao vapor de água

A interação dos fatores MMT e AC foi significativa ($p < 0,05$) para permeabilidade ao vapor de água (PVA).

O controle de espessura é uma variável importante em estudos de propriedades de barreira. Com o aumento da espessura, ocorre uma redução da resistência à transferência ao vapor de água e menor PVA (MCHUGH; AVENABUSTILLOS; KROCHTA, 1993). Neste trabalho, a espessura dos filmes não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) e variaram de 0,18 a 0,25 mm.

Para serem utilizados como embalagens, filmes à base de proteínas, ou materiais biodegradáveis necessitam possuir baixa permeabilidade ao vapor de água ou a gases. Conforme Tabela 1, a PVA em filmes de isolado proteico de soro de leite (IPS) diminuiu com o aumento de MMT. O IPS é um polímero hidrofílico que possui grupos hidroxílicos, assim, a água poderia facilmente permear o filme. Na presença de MMT, um caminho tortuoso é formado com a dispersão das lamelas de MMT na matriz polimérica dificultando a passagem de vapor de água (NING et al., 2009; RAY; OKAMOTO, 2003).

Li et al. (2011) estudaram filmes de isolado proteico de soro e nanopartículas de dióxido de titânio e observaram uma redução em torno de $2,89 \times 10^{-10} \text{ gm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ na permeabilidade ao vapor de água com uma concentração acima de 0,25% de dióxido de titânio. Filmes contendo apenas IPS e diferentes quantidades de glicerol foram estudados por Kokoszka et al. (2010). Esses autores encontraram baixa PVA em umidade relativa entre 30-53% e relataram que um aumento na concentração de IPS, aumenta a PVA devido à presença de grupos hidroxílicos em maior quantidade. Ozdemir e Floros (2008) estudaram a otimização de formulações de filmes de IPS com sorbitol, cera de abelha e sorbato de potássio e demonstraram que a PVA diminuiu com o teor de proteína

quando ocorre a incorporação de lipídeos na matriz resultando em filmes de mesma espessura.

A adição de AC também diminuiu a PVA dos filmes em relação ao filme MMT0AC0. Observou-se que a combinação MMT3AC5 apresentou a menor PVA (Tabela 1). Park et al. (2005) relataram que o ácido cítrico também pode ser utilizado como plasticizante em substituição ao glicerol. Esses autores citam que na presença de ácido cítrico, a ligação de hidrogênio formada com um grupo hidroxila e um grupo carboxílico aumenta a interação inter/intramolecular entre aditivos presentes no filme. Ning et al. (2009) estudaram o efeito do ácido cítrico no processamento de nanocompósitos de amido termoplástico e montmorilonita sódica. Esses autores relataram que o ácido cítrico auxilia na dispersão da MMT com redução da PVA em torno de $2 \times 10^{-10} \text{ gm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$. Ma et al. (2009) estudaram filmes de amido de arroz e amido de ervilha incorporados com ácido cítrico e também encontraram uma redução na PVA.

Tabela 1 Permeabilidade ao vapor de água (PVA) de filmes de IPS/MMTNa⁺/AC

MMT (g·100g ⁻¹ IPS)	AC (g·100g ⁻¹ IPS)	PVA x 10 ⁻¹² (g·m ⁻¹ ·s ⁻¹ ·Pa)
	0	4,29 ± 0,00 c
0	5	2,61 ± 0,00 a
	10	3,83 ± 0,24 b
	0	2,16 ± 0,00 a
1	5	3,19 ± 0,00 b
	10	3,40 ± 0,00 c
	0	2,11 ± 0,01 b
3	5	1,60 ± 0,00 a
	10	1,95 ± 0,00 b

* Médias observadas na coluna com mesma letra não diferem estatisticamente (p<0,05)

3.2 Propriedades Ópticas

As propriedades ópticas de transparência, índice *haze* e a^* sofreram interação significativa ($p < 0,05$) dos fatores MMT e AC (Tabela 2). O parâmetro luminosidade (L^*) não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos variando de 90,87 a 92,29. Esse resultado pode ser atribuído à baixa concentração de MMT presente nos filmes não sendo suficiente para redução da luminosidade.

Conforme ASTM D1003-00 (2000), a dispersão da luz através de um objeto é responsável por uma redução na sua visualização, sendo mensurada pelo índice *haze*. A luz que é dispersa ao passar através de uma película ou filme de um material pode produzir um campo nebuloso ou esfumado quando os objetos são vistos através do material.

O índice *haze* apresenta as irregularidades da superfície refletiva do filme, influenciada por parâmetros específicos durante a formação do filme, tais como o grau de dispersão e tipo de argila, e compatibilidade entre constituintes do filme. É uma medida da irregularidade e da heterogeneidade da superfície (SOTHORNVIT et al., 2010).

Observou-se um aumento do índice *haze* com aumento das irregularidades dos filmes MMT3AC5 e MMT3AC10 em relação aos filmes MMT1AC5 e MMT1AC10 (Tabela 2). Esse fato pode ser explicado por possíveis aglomerados e maior concentração de MMT, e formação de uma estrutura cristalina pela presença de cristais de ácido cítrico que não foram dispersos nos filmes MMT3AC5 e MMT3AC10 conforme os difratogramas de raios X mostrados no artigo 1. Porém, o filme MMT1AC10 apresentou redução do índice *haze*, com diminuição de irregularidades caracterizando-se por uma superfície lisa e homogênea (Tabela 2). A transparência dos filmes MMT0AC5 e MMT0AC10 não apresentou diferença significativa em relação ao IPS. Os filmes MMT3AC5 e MMT3AC10 apresentaram redução da transparência em

relação aos filmes MMT1AC5 e MMT1AC10 (Tabela 2). Sothornvit et al. (2010) estudaram filmes de IPS incorporados com diferentes concentrações de montmorilonita sódica e também encontraram uma redução na transparência de 14,38 (filme de IPS) para 4,22 (filme com 20 g de MMT) com o aumento do teor de argila. Esses autores relataram que a diminuição pode ser ocasionado por uma aglomeração das nanopartículas de MMT. Rhim (2011) encontrou uma diminuição da transparência de 70,3% - 51,9% em filmes de nanocompósitos com o aumento da concentração de montmorilonita sódica.

O parâmetro (-a*) que corresponde a uma tendência ao verde aumentou com a adição de MMT. Quando ocorreu a adição de AC esse parâmetro diminuiu em concentrações de 0 a 1% de MMT. Já a adição de 3% de MMT combinado com ácido cítrico não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Os parâmetros *hue*, *chroma* e *b** sofreram influência significativa apenas quanto ao teor de MMT (Tabela 3). *Chroma* é a medida da saturação da cor (ZHONG; SONG; LI, 2011). Assim, cores pálidas ou acinzentadas apresentam baixo valor de saturação (RAMOS; GOMIDE, 2007). Observou-se baixos valores de *chroma* caracterizando-se por filmes mais pálidos, ou seja com pouca intensidade de cor. O parâmetro *b** (amarelo) aumentou com a concentração de MMT. Hong e Rhim (2008) relataram que o aumento nos parâmetros *a** e *b** poderiam ser devido a uma incompleta dispersão da MMT em um polímero hidrofílico, como o IPS. Os valores do ângulo *hue* são atribuídos à tonalidade de cor e através deles pode-se estimar a posição da amostra no sólido de cor (RAMOS; GOMIDE, 2007). Observou-se uma diminuição significativa de *hue* apenas com a adição de 3% de MMT sendo os valores apresentados situados em uma tonalidade amarela dentro do sólido de cor no sistema Cielab.

Tabela 2 Transparência, índice *haze* e *a** de filmes de IPS/MMTNa⁺/AC

MMT (g·100g ⁻¹)	AC (g·100g ⁻¹)	Transparência (log(%T)/mm)	Índice haze (%)	a*
0	0	12,36 ± 1,03 a	53,41 ± 0,20 a	-0,91 ± 0,03 a
	5	11,60 ± 1,26 a	54,93 ± 0,48 b	-0,86 ± 0,03 a
	10	12,01 ± 1,45 a	53,93 ± 0,56 a	-0,88 ± 0,02 a
1	0	12,06 ± 0,90 b	54,24 ± 0,47 b	-0,94 ± 0,02 b
	5	13,87 ± 0,77 b	54,73 ± 1,49 b	-0,83 ± 0,04 a
	10	11,02 ± 1,10 a	51,76 ± 0,36 a	-0,99 ± 0,04 b
3	0	12,18 ± 0,43 a	54,55 ± 0,19 a	-0,99 ± 0,04 a
	5	10,74 ± 2,68 a	58,71 ± 0,05 b	-1,02 ± 0,09 a
	10	11,07 ± 1,00 a	55,19 ± 0,91 a	-1,00 ± 0,06 a

* Médias observadas na coluna com mesma letra não diferem estatisticamente (p<0,05)

Tabela 3 Hue, chroma e b* de filmes de IPS/MMTNa⁺/AC

FILMES MMT (g·100g ⁻¹ IPS)	Hue	chroma	b*
0	107,61 ± 1,03 a	2,04 ± 0,28 a	2,80 ± 0,19 a
1	108,70, ± 1,96 a	2,93 ± 0,35 a	2,78 ± 0,37 a
3	105,99 ± 0,40 b	3,67 ± 0,40 b	3,53 ± 0,40 b

* Médias observadas na coluna com mesma letra não diferem estatisticamente (p<0,05)

3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

As Figuras 1 e 2 representam as micrografias de superfície obtidas por MEV dos filmes de IPS. O filme de IPS (Figura 1a) apresentou superfície lisa e homogênea. A argila montmorilonita caracteriza-se como partículas brancas nas imagens de MEV (KUMAR et al., 2010). O filme MMT1AC0 apresentou-se com porosidade, aglomerados e possível dispersão de MMT com partículas de tamanho médio de 3 µm (Figura 1b). O filme MMT3AC0 apresentou-se mais

homogêneo, com ausência de porosidades e partículas aglomeradas de 2 μm na matriz de IPS (Figura 1c). Tunç e Duman (2010) observaram por MEV, imagens semelhantes de MMT com dimensão média das partículas de MMT de 15 μm .

Na Figura 2, são representadas as micrografias de IPS com adição de ácido cítrico. Nas Figuras 2a e 2b, observou-se uma aglomeração dos cristais de ácido cítrico com uma ordenação vertical desses cristais para o filme MMT0AC5. Quando ocorre a adição de MMT nos filmes MMT1AC5 e MMT1AC10 (Figura 2c e 2d), observou-se pequena aglomeração com 5% de AC e possibilidade de dispersão com 10% de AC. Já os filmes MMT3AC5 e MMT3AC10 (Figura 2e e 2f) apresentaram maior aglomeração de cristais de ácido cítrico. Esse resultado corroborou com os resultados de raios X apresentados no artigo 1 no qual os picos de difração apresentam possíveis resultados de dispersão para os filmes com 1% de MMT.

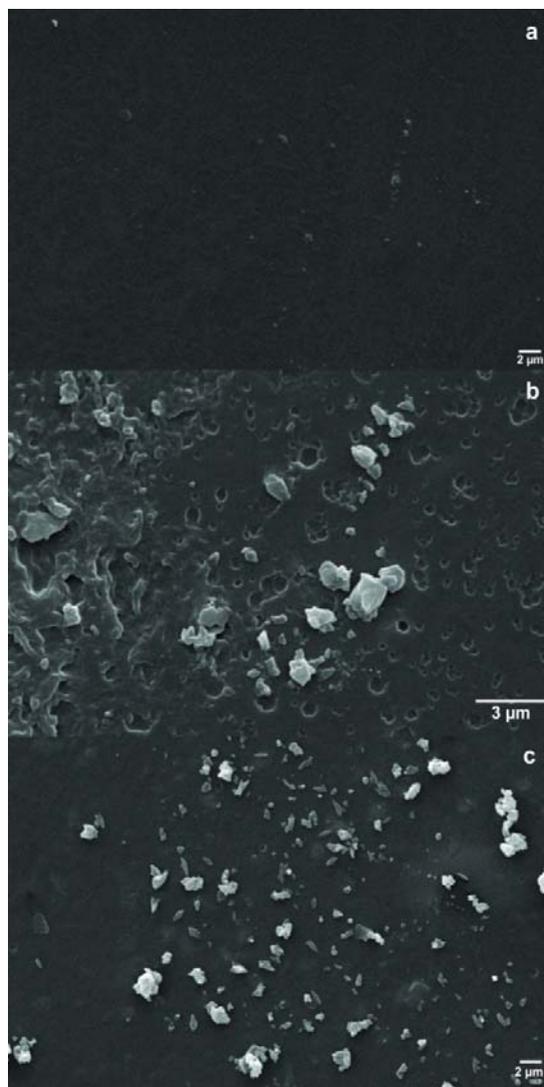


Figura 1 MEV. Micrografias de superfície de filmes de IPS. a) IPS; b) MMT1AC0; c) MMT3AC0

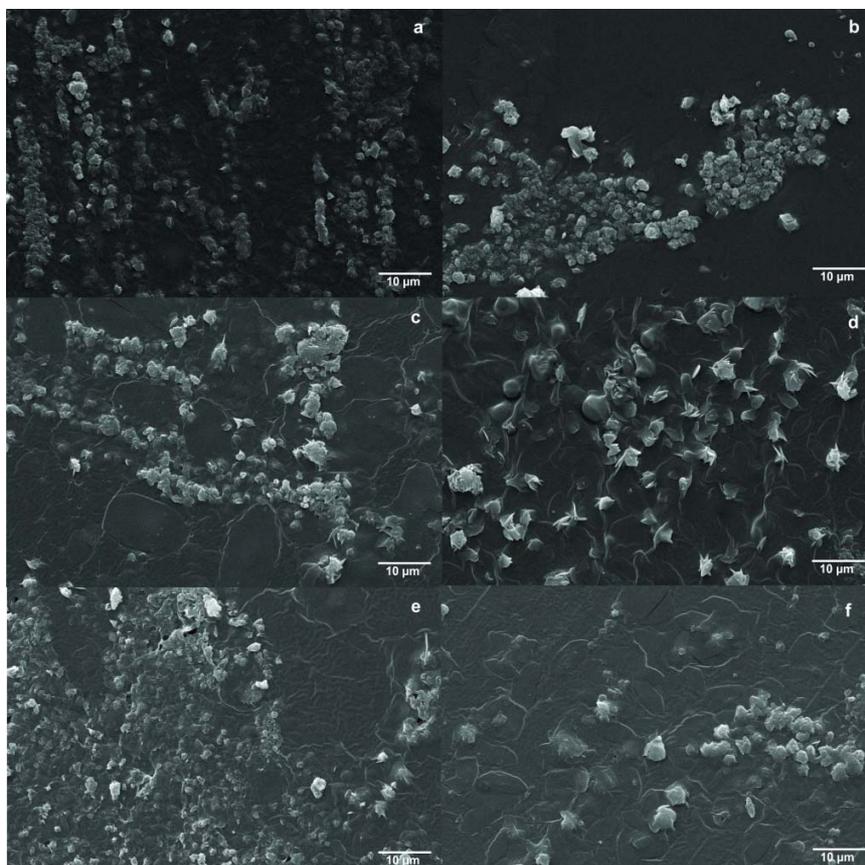


Figura 2 MEV. Micrografias de superfície de filmes de IPS. a) MMT0AC5
b) MMT0AC10; c) MMT1AC5; d) MMT1AC10; e) MMT3AC5;
f) MMT3AC5

3.4 Espectroscopia no Infravermelho - FTIR

A espectroscopia na região do infravermelho é utilizada na determinação das características da matriz polimérica e alterações de interações intermoleculares dos nanocompósitos (ZHONG; SONG; LI, 2011). Quando ocorre mistura dos compostos, interações químicas e ligações físicas refletem em mudanças nos picos espectrais (MARTINS; CERQUEIRA; VICENTE, 2012).

A Figura 3 representa os espectros dos filmes estudados. A vibração localizada na faixa espectral de 800-1150 cm^{-1} é atribuída a bandas de glicerol correspondendo a bandas de vibrações de C-C e C-O (GUERRERO et al., 2010).

A vibração na região 3600 – 3400 cm^{-1} é atribuída ao estiramento vibracional de O-H (MARTINEZ-CAMACHO et al., 2010; ZHONG; SONG; LI, 2011) que segundo Martins, Cerqueira e Vicente (2012) sobrepõe ao estiramento vibracional de N-H. Estudos sobre proteínas nessa região espectral indicaram que a banda correspondente para N-H aparece geralmente em 3254 cm^{-1} (BANDEKAR, 1992; RAMOS et al., 2013).

A região espectral de 3000 - 3600 cm^{-1} foi caracterizada por apresentar uma banda larga com intensidades próximas na faixa de 3279 a 3285 cm^{-1} para todos os filmes de isolado proteico de soro de leite (Figura 3a, 3b, 3c). Essa banda larga está relacionada a ligações cruzadas de proteínas que foram provavelmente derivadas a partir de um grau mais elevado de reticulação da rede proteica com cadeias mais próximas uma das outras promovidas por ligações de hidrogênio e, portanto, menor quantidade de grupos -OH livres (FAIRLEY et al., 1996; MCHUGH; KROCHTA, 1994).

Picos fortes dos grupos amida em 1650 e 1590 cm^{-1} , são atribuídas ao estiramento C=O e N-H, respectivamente (WANG et al., 2005). Todos os filmes apresentaram um pico em torno de 1634 a 1636 cm^{-1} . Porém, a adição de ácido cítrico nos filmes MMT0AC5; MMT1AC5 e MMT3AC5 apresentou redução da intensidade desses picos e consequente interação entre moléculas (Figuras 3a; 3b; 3c). Um pico largo em 1729 cm^{-1} é um estiramento vibracional em C=O. Visto que é improvável que todos os grupos carboxílicos sejam esterificados, então, provavelmente, um pico de coalescência é causado pela ligação éster e grupos carboxílicos C=O do ácido cítrico (SHI et al., 2008). A redução da força de interação é relacionada com a frequência (ou comprimento de onda) no deslocamento de estiramentos vibracionais. Assim, quanto menor a frequência

do pico mais forte é a interação (NING et al., 2007; PAWLAK; MUCHA, 2003).

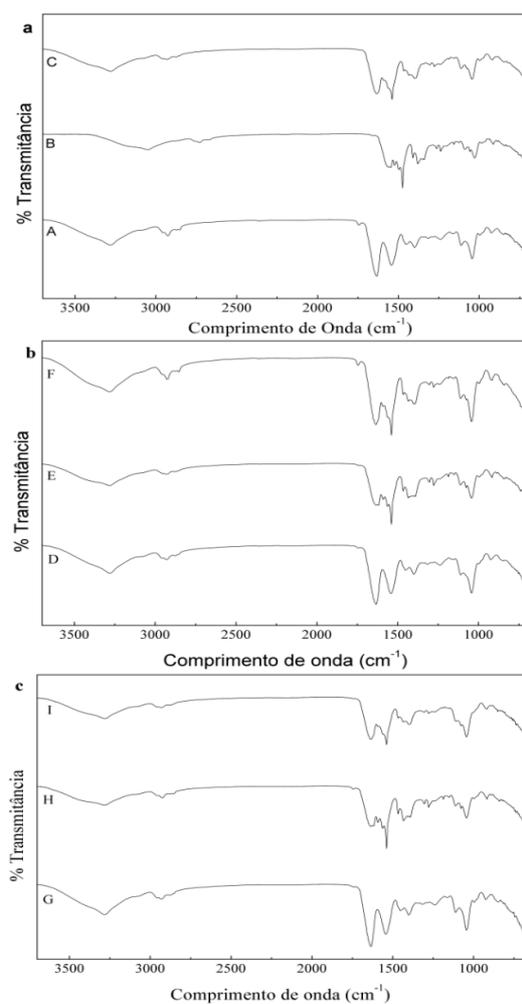


Figura 3 Espectros de FTIR. a) A: IPS; B: MMT0AC5; C: MMT0AC10;
b) D: MMT1AC0; E: MMT1AC5; F: MMT1AC10;
c) G MMT3AC0; H: MMT3AC5; I: MMT3AC5

Uma vibração em 1084 cm^{-1} é atribuída ao estiramento do grupo funcional -C-O (ZHONG; SONG; LI, 2011). O deslocamento para menores

comprimentos de onda conforme visualizado em todos os filmes em torno de 1040 cm^{-1} pode indicar um aumento da interação entre os nanocompósitos. Ning et al. (2009) estudaram o efeito do ácido cítrico em nanocompósitos de amido termoplástico com montmorilonita sódica e encontraram um deslocamento dos picos para baixos comprimentos de onda relatando uma possível interação da MMT e ácido cítrico.

Pela avaliação da intensidade das vibrações, os filmes com 5% de ácido cítrico apresentaram redução do comprimento de onda e consequente interação entre moléculas.

4 CONCLUSÃO

Baseado nos parâmetros de cor estudados, principalmente, transparência, *chroma* e no efeito não significativo de L^* , observou-se pequenas alterações das propriedades ópticas dos filmes de IPS incorporados com montmorilonita e ácido cítrico resultando em filmes opacos sem afetar a aparência geral dos filmes.

A microscopia eletrônica de varredura apresentou possíveis resultados de dispersão para os filmes MMT1AC5 e MMT1AC10.

Os picos de espectroscopia no infravermelho apresentaram fortes interações entre ácido cítrico, montmorilonita e IPS.

O filme MMT3AC5 apresentou baixa permeabilidade ao vapor de água com a interação entre montmorilonita e ácido cítrico. Assim, esse filme, à base de proteínas do soro poderia ser indicado para carrear aditivos alimentares como o ácido cítrico visando sua aplicação em produtos que causam escurecimento enzimático, por exemplo.

REFERÊNCIAS

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS.
Standard test method for haze and luminous transmittance of transparent plastics: ASTM D1003-00. Philadelphia, 2000.

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS.
Standard test method for transparency of plastic sheeting. ASTM D1746-03. Philadelphia, 2003a.

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS.
Standard test method for water vapor transmission rate of sheet materials using dynamic relative humidity measurement. ASTM E398-03. Philadelphia, 2003b.

ARRIETA, M. P. et al. Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 114, p. 486–494, 2013.

BANDEKAR, J. Amide modes and protein conformation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1120, p. 123-143, 1992.

DEL AGUILA, J. S. et al. Effect of antioxidants in fresh cut radishes during the cold storage. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, n. 6, p. 1217-1223, 2008.

FAIRLEY, P. et al. Mechanical properties and water vapor permeability of edible films from whey protein isolate and sodium dodecyl sulfate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, p. 438-443, 1996.

FOEGEDING, E. A.; LUCK, P. J. Whey protein products. In: ROGINSKI, J.; FUQUAY, J. W.; FOX, P. F. (Ed.), **Encyclopedia of dairy sciences**. Amsterdam: Academic, 2002.

GUERRERO, P. et al. Mechanical and thermal properties of soy protein films processed by casting and compression. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 100, p. 145-151, 2010.

HONG, S. I.; RHIM, J. W. Antimicrobial activity of organically modified nanoclays. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Stevenson Ranch, v. 8, p. 5818–5824, 2008.

JUVONEN, H. et al. Film formation and surface properties of enzymatically crosslinked casein films. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 119, n. 4, p. 2205–2213, 2011.

KINSELLA, J. E.; WHITEHEAD, D. M. Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. In: KINSELLA, J. E. (Ed.). **Advances in food and nutrition research**. Amsterdam: Academic, 1989. p. 343-438.

KOKOSZKA, S. et al. Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films. **International Dairy Journal**, Barking, v. 20, p. 53–60, 2010.

KUMAR, P. et al. Preparation and characterization of bio-nanocomposite films based on soy protein isolate and montmorillonite using melt extrusion. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 100, p. 480–489, 2010.

LI, Y. et al. Fabrication and characterization of TiO₂/whey protein isolate nanocomposite film. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, p. 1098-1104, 2011.

MA, X. et al. Properties of biodegradable citric acid-modified granular starch/thermoplastic pea starch composites. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 75, p. 1-8, 2009.

MARTÍNEZ-CAMACHO, A. P. et al. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 82, p. 305-315, 2010.

MARTINS, J. T.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. **Food hydrocolloids**, Oxford, v. 27, p. 220-227, 2012.

MCHUGH, T. H.; AVENA-BUSTILLOS, R.; KROCHTA, J. M. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapour permeability and explanation of thickness effects. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 58, p. 899–903, 1993.

MCHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Plasticized whey protein edible films: Water vapor permeability properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, p. 416–423, 1994.

NING, W. et al. Effect of citric acid and processing on the performance of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 76, p. 68–73, 2009.

NING, W. et al. The influence of citric acid on the properties of thermoplastic starch/linear low-density polyethylene blends. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 67, p. 446–453, 2007.

OZDEMIR, M.; FLOROS, J. D. Optimization of edible whey proteins. Films containing preservatives for water vapour permeability, water solubility and sensory characteristics. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 86, p. 215–224, 2008.

PARK, H. R. et al. Properties of starch/pva blend films containing citric acid as additive. **Journal of Polymers and the Environment**, Heidelberg, v. 13, n. 4, p. 375–382 2005.

PAWLAK, A.; MUCHA, M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 396, n. 1-2, p. 153–166, 2003.

PELTZER, M.; WAGNER, J.; JIMENEZ, A. Migration study of carvacrol as a natural antioxidant in high-density polyethylene for active packaging. **Food Additives and Contaminants, Part A: Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**, Abingdon, v. 26, n. 6, p. 938–946, 2009.

PEREDA, M.; ARANGUREN, M. I.; MARCOVICH, N. E. Characterization of chitosan/ caseinate films. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 107, n. 2, p. 1080–1090, 2008.

PEREDA, M. et al. Chitosan–gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 1372–1381, 2011.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes - fundamentos e metodologias**. Viçosa, MG: UFV, 2007. 599 p.

RAMOS, O. L. et al. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 30, p. 110-122, 2013.

RAY, S. S.; OKAMOTO, M. Biodegradable polylactide and its nanocomposites: Opening a new dimension for plastics and composites. **Macromolecular Rapid Communications**, Basel, v. 24, p. 815–840, 2003.

RHIM, J. W. Effect of clay contents on mechanical and water vapor barrier properties of agar-based nanocomposite films. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 86, n. 2, p. 691-699, 2011.

SALMIERI, S.; LACROIX, M. Physicochemical properties of alginate/ polycaprolactone-based films containing essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 10205–10214, 2006.

SHI, R. et al. The effect of citric acid on the structural properties and cytotoxicity of the polyvinyl alcohol/starch films when molding at high temperature. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 74, p. 763–770, 2008.

SOTHORNVIT, R. et al. Effect of clay content on the physical and

antimicrobial properties of whey protein isolate/organo-clay composite films. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 43, p. 279–284, 2010.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Oxygen permeability and mechanical properties of films from hydrolyzed whey protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 3913–3916, 2000.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizers in edible films and coatings. In: HAN, J. H. (Ed.). **Innovations in food packaging**. London: Elsevier, 2005. p. 403–433.

TUNÇ, S.; DUMAN, O. Preparation and characterization of biodegradable methyl cellulose/montmorillonite nanocomposite films. **Applied Clay Science**, Amsterdam, v. 48, p. 414–424, 2010.

UYAMA, H. et al. Green nanocomposite from renewable resources: plant oil–clay hybrid materials. **Chemistry of Materials**, Washington, v. 15, p. 2492–2494, 2003.

VERBEEK, C. J. R.; VAN DEN BERG, L. E. Extrusion processing and properties of protein-based thermoplastics. **Macromolecular Materials and Engineering**, Weinheim, v. 295, n. 1, p. 10–21, 2010.

WANG, S. F. et al. Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: preparation and characterization. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v. 90, p. 123–131, 2005.

ZHONG, Y.; SONG, X.; LI, Y. Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch–chitosan composite films as a function of acid solvent types. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 84, p. 335–342, 2011.

ARTIGO 3

EFEITO DE FILMES ATIVOS DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE NA CONSERVAÇÃO DE MAÇÃS MINIMAMENTE PROCESSADAS

RESUMO

Objetivou-se verificar a inibição da atividade polifenoloxidase e peroxidase, em maçãs *var. Gala* minimamente processadas cobertas por filmes nanobioativos de isolado proteico de soro de leite/montmorilonita contendo ácido cítrico, na diminuição do escurecimento enzimático durante o armazenamento sob refrigeração. Filmes de isolado proteico de soro de leite (IPS) incorporados com a combinação dos aditivos 40% glycerol (GLY), 3% de montmorilonita (MMT), 5 e 10% de ácido cítrico (AC), foram intercalados às rodela de maçãs. Todas as amostras foram acondicionadas em bandejas de polipropileno e armazenadas a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa $85 \pm 3\%$ UR, durante oito dias. A cada dois dias, as amostras de maçãs foram avaliadas quanto à cor, acidez, pH, sólidos solúveis, atividade de água e enzimas polifenoloxidase e peroxidase. O filme com 3% de MMT e 5% de AC apresentou os menores valores de umidade e solubilidade, mostrando que a adição de MMT influencia nas propriedades do filme. Verificou-se que o escurecimento enzimático das rodela de maçãs foi reduzido para todos os filmes durante o armazenamento. Porém, os filmes contendo ácido cítrico mantiveram as menores oscilações de cor, reduzindo a perda de qualidade associada à manutenção da acidez, sólidos solúveis, atividade de água e redução da atividade polifenoloxidase e peroxidase, prolongando a vida útil de maçãs 'Gala'. Assim, sugere-se a aplicação de filmes contendo argila montmorilonita e ácido cítrico a fim de reduzir a perda da qualidade e aumentar a vida útil de maçãs minimamente processadas.

Palavras-chave: Embalagem ativa. Escurecimento enzimático. Conservação.

1 INTRODUÇÃO

A maçã é uma fruta colhida no Brasil durante os primeiros meses do ano e grande parte da safra é armazenada durante longo período acarretando aumento de custos para conservação e perda de qualidade da fruta. É considerada uma das frutas mais produzidas no Brasil e sua utilização como produto minimamente processado pode agregar valor e acelerar o seu consumo. As principais variedades comercializadas no Brasil são a Gala e a Fuji, que representam cerca de 95% de toda produção brasileira (CZELUSNIAK, 2003). Maçãs da variedade Gala apresentam um aumento crescente de produção, pois atendem às exigências do consumidor por apresentarem coloração da epiderme vermelho mais intenso, tamanho médio e sabor doce (KREUZ; ARGENTA, 2003).

Apesar do crescimento de produtos minimamente processados, a vida útil de frutas e hortaliças é limitada por reações de degradação, principalmente pelo escurecimento enzimático, quando cortadas ou descascadas e crescimento de micro-organismos (BOTELHO et al., 2010; LIMBO; PIRGIOVANNI, 2007).

A principal enzima envolvida nas reações de escurecimento de maçãs são as polifenoloxidases (E.C. 1.14.18.1) (PPO) (SATAQUE; WOSIACKI, 1987). Essas enzimas catalisam a oxidação dos compostos fenólicos e produzem pigmentos castanhos na superfície de vegetais cortados. O escurecimento leva ao desenvolvimento de sabores desagradáveis e perdas na qualidade (HAMINIUK et al., 2005; NUNES; VILAS BOAS; XISTO, 2011; WILSON, 2008). A peroxidase (E.C. 1.11.1) (POD) é outra enzima que participa do processo de escurecimento enzimático, desestruturando as membranas celulares e promovendo reações em cadeia que levam à formação de radicais livres alterando as características sensoriais do produto (BOTELHO et al., 2010; VILAS BOAS; KADER, 2006).

Para evitar a ação dessas enzimas no escurecimento são utilizados métodos químicos como a diminuição do pH, adição de antioxidantes (ácido ascórbico, ácido cítrico, cloreto de cálcio e ácido etileno diamino tetracético) e hidrólise da PPO com proteases (FAGUNDES; AYUB, 2005; RAYBAUDI-MASSILIA et al., 2007; ROJAS-GRAÜ et al., 2006). O ácido cítrico não é um agente antioxidante, é um ácido orgânico, naturalmente encontrado nos vegetais que age como quelante e atua em sinergia com ácido ascórbico, eritórbico e seus sais neutros. Apresenta efeito inibitório sobre a PPO pelo abaixamento do pH, complexando com o cobre do centro ativo da enzima (DEL AGUILA et al., 2008).

Uma forma de minimizar reações de degradação, devido ao processamento mínimo é a utilização de embalagens ativas, que interagem de maneira positiva com o alimento e ambiente, conferindo características sensoriais e, ou nutricionais desejáveis e aumento da vida útil do produto (ENDO et al., 2008; LACOSTE et al., 2005). O princípio de atuação desse tipo de embalagem consiste na incorporação e, ou imobilização de certos aditivos, em menores quantidades, à embalagem em vez da incorporação direta no produto por meio da liberação controlada, aumentando a qualidade do alimento (GÜÇBILMEZ; YEMENICIOFLU; ARSLANOFLU, 2007; KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006).

Filmes à base de proteínas do soro podem ser utilizados como embalagens ativas visando à redução de um resíduo da indústria de laticínios e substituição de plásticos convencionais. São excelentes para carrear aditivos alimentares, tais como antioxidantes, antimicrobianos, corantes, sabores, nutrientes fortificantes e especiarias (PRANOTO; SALOKHE; RAKSHIT, 2005; SALMIERI; LACROIX, 2006). Além disso, a liberação controlada do ingrediente ativo (baixa taxa de difusão) do material de embalagem para o alimento ajuda a manter a concentração do ingrediente ativo, relativamente alta

no decorrer do tempo (KRISTO; KOUTSOUMANIS; BILIADERIS, 2008; MIN; KROCHTA, 2005).

Existem poucas pesquisas sobre o efeito da combinação de filmes ativos e agentes antiescurecimento para produtos minimamente processados a fim de inibir o escurecimento enzimático. Baseando-se no fato de que o ácido cítrico atua como agente quelante no controle da atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase, acredita-se que a adição desse composto em um filme ativo possa prevenir o escurecimento enzimático e auxiliar na conservação de maçãs minimamente processadas. Assim, objetivou-se avaliar o efeito de nanocompósitos de isolado proteico de soro de leite incorporado com ácido cítrico na prevenção do escurecimento e manutenção da qualidade de maçãs minimamente processadas, armazenadas em temperatura de refrigeração.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Isolado proteico de soro de leite (IPS 9400), com 90% de proteína, foi obtido pela *Hilmar Ingredients* (Hilmar, CA, USA). Glicerol pela *Sigma Aldrich* (Brasil), ácido cítrico anidro granulado pela *Cargill* (Uberlândia, MG, Brasil) e argila montmorilonita (Cloisite Na⁺) foi fornecida pela *Southern Clay Products, Inc* (Gonzales, TX, USA). Maçãs da cultivar 'Gala' foram adquiridas no mercado varejista de Lavras (MG).

2.2 Delineamento Experimental

Para o desenvolvimento dos filmes, o experimento foi conduzido em um planejamento fatorial completo, com os seguintes fatores e níveis:

montmorilonita sódica (MMT-Na⁺) e ácido cítrico (AC), sendo 0 e 3% e 0; 5 e 10%, respectivamente. Essas concentrações foram baseadas na análise de permeabilidade ao vapor de água (artigo 2), no qual os filmes com 3% de MMT obtiveram os menores valores. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os filmes de isolado proteico de soro de leite foram codificados conforme Tabela 1.

Tabela 1 Filmes desenvolvidos

Filmes	MMT (g·100g ⁻¹ IPS)	AC (g·100g ⁻¹ IPS)
IPS	0	0
MMT0AC5	0	5
MMT0AC10	0	10
MMT3AC0	3	0
MMT3AC5	3	5
MMT3AC10	3	10

Para avaliação do efeito dos filmes na maçã, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 6 x 5, sendo seis tratamentos, conforme Tabela 1 e cinco tempos de armazenamento (0, 2, 4, 6 e 8 dias), com três repetições. A parcela experimental constituiu-se de uma bandeja contendo aproximadamente 100 g de rodela.

Os resultados foram avaliados com nível de 5% de significância utilizando-se o *software* SPSS *Estatística* 17.0 (SPSS STATISTICS, 2007) pela análise de variância (ANOVA), e os modelos gerados foram avaliados em termos do coeficiente R² acima de 0,65.

2.3 Desenvolvimento, acondicionamento e espessura dos filmes

O desenvolvimento, acondicionamento e espessura dos filmes, estão descritos no artigo 1.

2.4 Caracterização dos filmes

A umidade dos filmes foi determinada após secagem em estufa a 105 °C, sob circulação forçada de ar por 24 h. Amostras (0,2 g) de filme foram cortadas, colocados em placas de Petri, e pesados antes e depois da secagem. Os valores de umidade foram determinados em relação ao peso inicial e o peso perdido durante a secagem (ASTM, 2007), sendo relatados em base úmida.

A solubilidade (S) em água dos filmes foi determinada em triplicata, conforme Rhim, Lee e Kwak (2005) e Tunç e Duman (2010). Os filmes (3 × 5 cm) foram colocados em béqueres de 50 mL contendo 30 mL de água desionizada, cobertos com parafilm e armazenados em incubadora 25,0 ± 0,5 °C durante 24 h. A matéria seca não dissolvida foi filtrada utilizando papel de filtro e secos a 105 °C durante 24 h. A solubilidade em água dos filmes foi calculada pela equação 1:

$$\text{Solubilidade em água (\%)} = 100(W_1 - W_2)/W_1$$

(1)

Onde: W_1 e W_2 são os pesos inicial e de matéria seca não dissolvida dos filmes, respectivamente.

A densidade do filme (ρ^s) foi expressa como a média de cinco determinações e calculada a partir do peso do filme e suas dimensões (SALGADO et al., 2010), conforme a equação 2:

$$\rho^s = \frac{m}{A \times \delta} \quad (2)$$

Onde: A é a área do filme (15 cm^2), δ a espessura do filme (cm), m a massa seca (g) e ρ^s a densidade de matéria seca (g cm^{-3}).

2.5 Processamento mínimo da maçã

Maçãs 'Gala' foram selecionadas segundo homogeneidade de cor (epiderme vermelha) e ausência de defeitos no mês de julho. Posteriormente, os frutos foram lavados em solução de água e sabão neutro e sanitizadas em água fria ($10 \text{ }^\circ\text{C}$) contendo solução de hipoclorito de sódio 200 mg.L^{-1} , durante 20 min. para evitar contaminação durante o processo. Em seguida, foram submetidos a um pré-resfriamento em câmara fria a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 h, para redução da temperatura. Após esse período, os frutos foram fatiados (com casca) manualmente com auxílio de facas afiadas, em rodela de espessura de aproximadamente 5 mm, em ambiente climatizado a $18 \text{ }^\circ\text{C}$ e imersas rapidamente em solução de hipoclorito a 100 mg.L^{-1} a $4 \text{ }^\circ\text{C}/10 \text{ min}$. Após essa imersão, o excesso de líquido foi drenado em papel absorvente e cerca de 100 g de rodela de maçãs foram intercaladas com os filmes de isolado proteico de soro de leite conforme Tabela 1 e Figura 1. Todas as amostras foram acondicionadas em bandejas de polipropileno e armazenadas em câmara fria a $5^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa ($85 \pm 3\% \text{ UR}$), por 8 dias. Rodela de maçãs sem os filmes não foram consideradas, visto que, a partir de estudos preliminares, observou-se um escurecimento enzimático em menos de 8 h após o corte.



Figura 1 Maças intercaladas com filme de IPS e armazenadas em bandejas de polipropileno a $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa ($85 \pm 3\%$ UR), por 8 dias

2.6 Análise das maçãs intercaladas nos filmes durante armazenamento

A cada dois dias, as amostras de maçãs foram avaliadas quanto à cor, através dos parâmetros L^* , a^* , b^* e saturação (*chroma*), onde a coordenada L^* indica a luminosidade do produto (valor zero cor preta e valor 100 cor branca), a coordenada a^* está relacionada à intensidade de verde (-80) a vermelho (+100) e a coordenada b^* está relacionada à intensidade de azul (-50) a amarelo (+70). Esses parâmetros foram medidos por refratometria, utilizando-se colorímetro da marca Minolta, modelo CR 400, sistema CIELAB. Foram realizadas quatro leituras em cada uma das três repetições em todos os tratamentos em diferentes pontos das rodela. O índice de escurecimento (IE) foi calculado conforme Buera, Lozano e Petriella (1985) e utilizado como indicador a intensidade de cor castanha. O índice de escurecimento (IE) foi calculado conforme equação 3:

$$\text{IE} = \frac{100 (x - 0.31)}{0,172} \quad (3)$$

Onde:

$$x = a^* + \frac{1,75L^*}{\square} 5,645L^* + a^* - 3,012b^*$$

O pH na maçã foi determinado utilizando-se um pHmetro digital TECNAL (Tec-3MP), segundo técnica da *Association of Official Analytical Chemists* - AOAC (2002). Acidez titulável (% ácido málico) foi determinada por titulação em solução padronizada de NaOH 0,1N, tendo como indicador a fenolftaleína, de acordo com AOAC (2002). O teor de sólidos solúveis (SS) foi determinado por refratometria, utilizando-se o refratômetro digital PR 100-ATAGO com compensação de temperatura automática a 25°C e os resultados expressos em °Brix, conforme AOAC (2002). A atividade de água (Aa) foi medida com o equipamento Aqualab (Decagon modelo 3 TE). As amostras (5 g) foram colocadas em recipientes de plástico à temperatura de 25 °C.

A extração e determinação da atividade enzimática da polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) foram realizadas conforme método proposto por Matsuno e Uritani (1972). A atividade foi expressa em unidade por minuto por grama de tecido fresco (U min⁻¹ g⁻¹), segundo método de Teisson (1979).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos filmes

A Tabela 2 representa os valores encontrados de espessura, densidade (ρ^s), solubilidade (S) e teor de umidade (U), dos filmes de IPS (6%, m/v), contendo glicerol, MMT-Na⁺ e agente ativo antiescurecimento ácido cítrico.

Os filmes de IPS combinados com MMT e ácido cítrico não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) quanto à densidade e espessura.

O teor de umidade é um parâmetro relacionado com a quantidade de moléculas de água ocupadas no volume vazio da microestrutura de rede do filme (LI et al., 2011). Os filmes MMT0AC5 e MMT3AC0 não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) na adição de 5% de ácido cítrico e 3% de MMT isoladamente. Porém, quando houve a combinação desses agentes, o filme MMT3AC5 apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) quanto ao teor de umidade em relação ao IPS e demais filmes.

Filmes biodegradáveis resistentes à água são desejáveis quando se utiliza alimentos com média ou alta umidade. Se o filme possui baixa resistência à água, irá dissolver-se rapidamente perdendo assim seu agente ativo, reduzindo possivelmente sua ação. A adição de MMT nos filmes MMT3AC0 e MMT3AC5 apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao filme de IPS, com redução de 13,4% e 6,4%, respectivamente, na solubilidade em água. A insolubilidade parcial dos filmes de IPS, como observado neste trabalho, também foi encontrada por Fairley et al. (1996), McHugh e Krochta (1994) e Ramos et al. (2012) e pode ser causada pela presença de fortes ligações intermoleculares (ligações de dissulfeto) entre as moléculas de proteína no interior da matriz polimérica de filmes de IPS. Além disso, a adição de argila MMT à matriz do filme conduziu a uma redução da solubilidade devido à formação de ligações de hidrogênio entre a matriz de IPS e MMT. As estruturas em camadas de silicato da argila MMT podem formar ligações de hidrogênio com IPS, assim as moléculas de água não são capazes de quebrar essa estrutura formada, portanto, o filme MMT3AC0 apresentou a menor solubilidade. Tunç e Duman (2010) encontraram resultados semelhantes em nanocompósitos de metilcelulose e argila montmorilonita sódica. Ozdemir e Floros (2008) encontraram redução na solubilidade em água com filmes de IPS e cera de abelha. Em geral, uma diminuição da solubilidade dos filmes indica uma

melhoria na resistência à água, e, assim, uma menor permeabilidade ao vapor de água.

Tabela 2 Propriedades físicas (média, \pm desvio padrão), espessura, densidade (ρ^s), solubilidade (S) e teor de umidade (U), de filmes de IPS contendo glicerol, MMT- Na^+ e agente ativo antiescurecimento ácido cítrico

Filmes ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{IPS}$)	Espessura* (mm, n=5)	ρ^s ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, n=5)	S (%, n=3)	Umidade (U) (%, n=5)
IPS	0,20 \pm 0,01 a	1,35 \pm 0,11 a	64,24 \pm 0,86 a	33,22 \pm 0,15 b
MMT0AC5	0,21 \pm 0,03 a	1,23 \pm 0,04 a	61,95 \pm 0,24 a	30,48 \pm 0,83 c
MMT0AC10	0,18 \pm 0,01 a	1,26 \pm 0,04 a	63,76 \pm 0,74 a	28,07 \pm 0,20 d
MMT3AC0	0,20 \pm 0,01 a	1,04 \pm 0,09 a	55,63 \pm 0,79 b	30,24 \pm 0,33 c
MMT3AC5	0,20 \pm 0,02 a	1,23 \pm 0,06 a	60,15 \pm 0,30 b	26,88 \pm 0,33 e
MMT3AC10	0,21 \pm 0,04 a	1,24 \pm 0,02 a	67,51 \pm 0,04 a	37,96 \pm 0,88 a

* Médias observadas na coluna com mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

3.2 Efeito dos filmes em maçã minimamente processada

O escurecimento enzimático é a causa primária do declínio da qualidade sensorial e vida útil de maçãs recém-colhidas (HE; LUO; CHEN, 2008; LU et al., 2007). A avaliação do escurecimento enzimático baseia-se na medição de reflectância (L^* , a^* , b^*), na superfície de frutos e vegetais recém-cortados durante o armazenamento (GARCIA; BARRETT, 2002; GHIDELLI et al., 2013).

Os parâmetros L^* , a^* , índice de escurecimento, *chroma* e polifenoxidase (Tabela 3), apresentaram interação significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos e tempo de armazenamento.

As maçãs com os filmes IPS, MMT0AC5, MMT3AC0 e MMT3AC5 apresentaram-se mais estáveis quanto ao parâmetro (L^*) durante o tempo de

armazenamento. Observou-se uma redução no valor L^* até o 4º dia de armazenamento com pequeno aumento até o 8º dia (Figura 2a; Tabela 3). Esse resultado indica ligeiro escurecimento na maçã nos primeiros dias de armazenamento em decorrência, provavelmente, de reações oxidativas do escurecimento enzimático catalisadas pela polifenoloxidase e peroxidase. As maçãs que continham os filmes IPS e MMT3AC0 apresentaram alta luminosidade devido às propriedades de ação antiescurecimento presentes no IPS. Pérez-Gago et al. (2003) observaram que a emulsão de IPS sem antioxidantes foram eficazes na redução do escurecimento enzimático de maçãs recém-colhidas. O aumento de L^* pode ser relacionado à migração do ácido cítrico do filme para a maçã podendo agir como agente branqueador. Fontes et al. (2008) estudaram maçãs minimamente processadas com uso de agentes antioxidantes e branqueadores (ácido ascórbico, cítrico, cloreto de sódio e cloreto de cálcio) obtendo maçãs com tendência a colorações mais claras ao longo do tempo de armazenamento. Além disso, o aumento de L^* , possivelmente pode ser relacionado à presença de açúcares na fruta que conferem maior brilho, apresentando maior claridade.

O parâmetro (a^*) (variação de verde ($-a^*$) a vermelho ($+a^*$)) mostrou que as rodela de maçãs com os filmes MMT3AC10 e IPS apresentaram os menores índices de coloração avermelhada na maçã (Figura 2b). Esse resultado pode ser explicado pela adição de alta concentração do ácido cítrico combinado com o IPS que possuem ação antiescurecimento. Para o tratamento MMT0AC10, não houve ajuste significativo quanto ao parâmetro a^* .

A presença de MMT nos filmes MMT3AC0, MMT3AC5 e MMT3AC10 provocou nas maçãs, um aumento dos valores de *chroma* (C^*) a partir do 3º dia com conseqüente escurecimento (Figura 2c, Tabela 3). Isso pode ser atribuído à elevada hidrofilicidade de superfície da $MMTNa^+$ resultando

numa mudança de cor (SONG et al., 2013), devido à possível migração da MMT para a maçã.

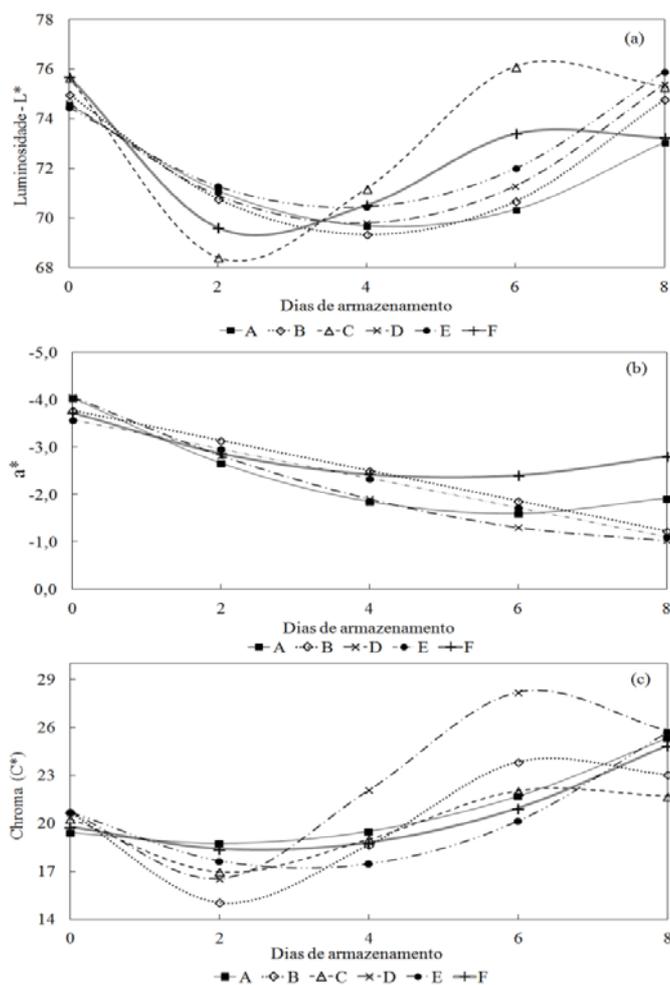


Figura 2 Variação da luminosidade (2a), de a^* (2b), Chroma (2c) em rodelas de maçãs minimamente processadas durante o armazenamento ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 85\text{ UR}$). A (IPS); B (MMT0AC5); C (MMT0AC10); D (MMT3AC0); E (MMT3AC5); F (MMT3AC10)

Na figura 3a observou-se que os filmes MMT0AC5, MMT0AC10 e MMT3AC5 intercalados nas rodela de maçãs apresentaram menor índice de escurecimento até o 3º dia de armazenamento, quando comparadas aos filmes, IPS e MMT3AC0. A cor de fatias de maçãs foi preservada com filmes à base de carragenina e proteínas de soro de leite, com agentes antiescurecimento e cloreto de cálcio (LEE et al., 2003). Filmes de isolado proteico de soro e concentrado, caseinato de cálcio e carboximetilcelulose também diminuíram o escurecimento em fatias de maçãs (OLIVAS; MATTINSON; CÁNOVAS, 2007; PEREZ-GAGO et al., 2003).

No processamento mínimo de maçãs, as células do tecido são quebradas e enzimas, como polifenoloxidasas (PPO) são liberadas e levadas em contato com seus substratos, causando escurecimento enzimático (GARCIA; BARRET, 2002; OLIVAS; MATTINSON; CÁNOVAS, 2007). Houve diminuição significativa ($p < 0,05$) até o 5º dia da PPO no escurecimento das rodela de maçãs em todos os filmes, exceto o filme IPS. As maçãs com os filmes MMT3AC5 e MMT3AC10 apresentaram a menor atividade enzimática (Figura 3b, Tabela 3). Esse efeito pode ser explicado pela presença do ácido cítrico que tem sido identificado como um agente antiescurecimento pelo seu efeito inibitório sobre a PPO, reduzindo o pH e atuando como agente quelante do cobre. Além disso, a adição de nanopartículas de MMT auxilia na melhoria de propriedades de barreira a gases (MAJDZADEH-ARDAKANI; NAZARI, 2010) e filmes de polímeros à base de proteínas como o IPS possui boa barreira ao oxigênio, diminuindo reações de escurecimento (KIM; USTUNOL, 2001).

Assim como a PPO, as peroxidases possuem atividade na reação de oxidação de compostos fenólicos em presença de peróxido de hidrogênio. Como produto da oxidação as quinonas são obtidas, as quais são instáveis e após a oxidação não enzimática na presença de O_2 polimerizam-se e formam as melaninas (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Os valores observados para

peroxidase (POD) foram significativos ($p < 0,05$) para tempo e tratamento, isoladamente (Figura 3c).

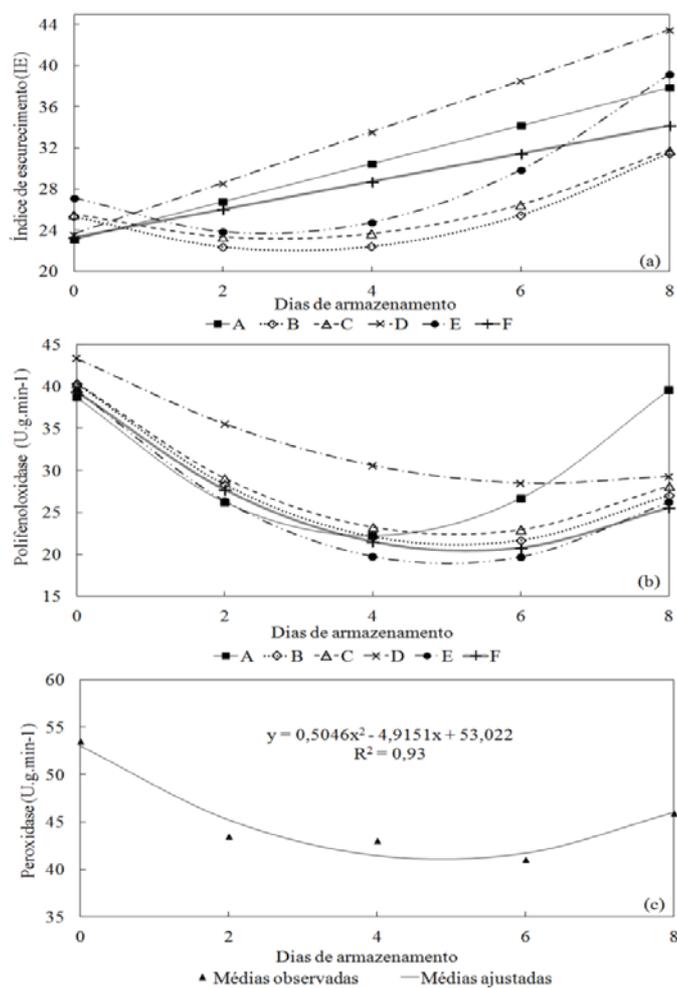


Figura 3 Variação do índice de escurecimento (3a), da polifenoloxidase (3b) e peroxidase (3c) em rodela de maçãs minimamente processadas durante o armazenamento ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 85\text{ UR}$). A (IPS); B (MMT0AC5); C (MMT0AC10); D (MMT3AC0); E (MMT3AC5); F (MMT3AC10)

Tabela 3 Equações ajustados para Luminosidade (L^*), a^* , índice de escurecimento (IE), *chroma* (C^*), polifenoloxidase (PPO); médias observadas de peroxidase (POD); pH; acidez, sólidos solúveis (SS) e atividade de água (Aa)

Luminosidade - L^*			a^*	
Filmes	Equação Ajustada	R^2	Equação Ajustada	R^2
IPS	$L^* = 0,257t^2 - 2,244t + 74,56$	0,65	$a^* = -0,071t^2 + 0,830t - 4,037$	0,91
MMT0AC5	$L^* = 0,346t^2 - 2,792t + 74,98$	0,85	$a^* = 0,319t - 3,777$	0,92
MMT0AC10	$L^* = 0,268t^2 - 1,799t + 74,08$	0,94	equação não ajustou	-
MMT3AC0	$L^* = 0,326t^2 - 2,512t + 74,63$	0,62	$a^* = -0,04t^2 + 0,699t - 4,055$	0,92
MMT3AC5	$L^* = 0,2945t^2 - 2,180t + 74,46$	0,62	$a^* = 0,308t - 3,573$	0,78
MMT3AC10	$L^* = 0,106t^3 + 1,501t^2 - 5,625t + 75,69$	0,86	$a^* = -0,053t^2 + 0,535t - 3,728$	0,73
Índice de escurecimento - IE			Chroma - C^*	
Filmes	Equação Ajustada	R^2	Equação Ajustada	R^2
IPS	$IE = 1,848t + 23,07$	0,70	$C^* = 0,180t^2 - 0,702t + 19,41$	0,63
MMT0AC5	$IE = 0,373t^2 - 2,212t + 23,30$	0,96	$C^* = -0,159t^3 + 2,106t^2 - 6,395t + 20,67$	0,88
MMT0AC10	$IE = 0,313t^2 - 1,721t + 25,57$	0,82	$C^* = -0,091t^3 + 1,209t^2 - 3,702t + 20,25$	0,96
MMT3AC0	$IE = 2,485t + 23,61$	0,66	$C^* = -0,190t^3 + 2,355t^2 - 6,028t + 20,67$	0,92
MMT3AC5	$IE = 0,526t^2 - 2,701t + 27,14$	0,80	$C^* = 0,359t^2 - 2,244t + 20,70$	0,91
MMT3AC10	$IE = 1,358t + 23,31$	0,80	$C^* = 0,221t^2 - 1,127t + 19,76$	0,83
Polifenolotidase - PPO			Perotidase - POD ¹	
Filmes	Equação Ajustada	R^2	Médias Observadas	
IPS	$PPO = 1,059t^2 - 8,360t + 38,68$	0,67	48,4 ± 8,12 b	
MMT0AC5	$PPO = 0,725t^2 - 7,467t + 40,35$	0,90	46,44 ± 7,79 b	
MMT0AC10	$PPO = 0,689t^2 - 7,051t + 40,44$	0,90	42,35 ± 7,89 b	
MMT3AC0	$PPO = 0,358t^2 - 4,626t + 43,37$	0,87	61,32 ± 8,29 a	
MMT3AC5	$PPO = 0,820t^2 - 8,231t + 39,59$	0,83	38,1 ± 7,86 c	
MMT3AC10	$PPO = 0,686t^2 - 7,217t + 39,41$	0,78	36,21 ± 8,57 c	
pH			Acidez (AT) (% ácido málico)	
Filmes	Equação Ajustada	R^2	Equação Ajustada	R^2
IPS	$pH = -0,0235t^2 + 0,282t + 3,75$	0,85	$AT = 0,0026t^2 - 0,0123t + 0,274$	0,71
MMT0AC5	$pH = -0,021t^2 + 0,331t + 3,86$	0,96	$AT = 0,0047t^2 - 0,0398t + 0,258$	0,70
MMT0AC10	$pH = -0,033t^2 + 0,477t + 3,91$	0,93	$AT = 0,0022t^2 - 0,0235t + 0,260$	0,94
MMT3AC0	$pH = 0,154t + 3,84$	0,95	$AT = -0,001t^3 + 0,0124t^2 - 0,0368t + 0,258$	0,77
MMT3AC5	$pH = -0,018t^2 + 0,337t + 3,82$	0,99	$AT = -0,0017t^3 + 0,0238t^2 - 0,0822t + 0,254$	0,65
MMT3AC10	$pH = -0,038t^2 - 0,498t + 3,99$	0,87	$AT = 0,0045t^2 - 0,0409t + 0,259$	0,97
Atividade de água			Sólidos Solúveis (SS) (° Brit)	
Filmes	Equação Ajustada	R^2	Equação Ajustada	R^2
IPS	$Aa = -0,0014t + 0,988$	0,65	$SS = 0,75t + 12,53$	0,65
MMT0AC5	$Aa = 0,0004t^2 - 0,0042t + 0,988$	0,77	$SS = -0,161t^2 + 1,837t + 11,85$	0,71
MMT0AC10	$Aa = 0,0004t^2 - 0,0043t + 0,989$	0,86	$SS = -0,292t^2 + 2,85t + 11,87$	0,82
MMT3AC0	$Aa = 0,0002t^2 - 0,0029t + 0,990$	0,91	$SS = -0,149t^2 + 1,807t + 11,68$	0,80
MMT3AC5	$Aa = -0,0019t + 0,989$	0,99	$SS = 0,95t + 12$	0,87
MMT3AC10	$Aa = 0,0005t^2 - 0,0047t + 0,988$	0,71	$SS = -0,345t^2 + 3,295t + 12,51$	0,66

¹ Médias observadas com mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

As rodelas de maçãs que continham os filmes MMT3AC5 e MMT3AC10 apresentaram menor escurecimento enzimático provavelmente devido ao sinergismo de IPS, MMT e ácido cítrico e não apresentaram diferença significativa. Já as rodelas com o filme MMT3AC0 apresentaram maior escurecimento enzimático em relação aos demais devido à ausência de ácido cítrico conforme as médias observadas na Tabela 3 para o parâmetro peroxidase. Com esses resultados, observa-se que possivelmente a presença de MMT inibe a ação do IPS com a ausência de ácido cítrico. A Figura 3c demonstra que todos os filmes tiveram uma diminuição da peroxidase até o quinto dia com ligeiro aumento até o oitavo dia.

Observou-se aumento dos valores de pH (Figura 4a, Tabela 3) para todos os tratamentos, porém as maçãs com os filmes MMT0AC10 e MMT3AC10, apresentaram pH mais alto. Este aumento pode referir-se à diminuição nas concentrações de ácidos orgânicos (ácido málico) presentes na maçã consumidos pelo processo respiratório. Segundo Chitarra e Chitarra (2005), ácidos orgânicos são precursores do “*flavor*” e favorecem a respiração em células vegetais, assim o pH aumenta com a redução da acidez. O aumento do pH refere-se a quebra de amido em açúcares redutores e sua conversão em ácido pirúvico provocada pela respiração das frutas. Isso pode ser verificado na figura 4b, no qual os tratamentos MMT0AC5, MMT3AC5 e MMT3AC10 apresentam os menores valores de acidez até o 4º dia de armazenamento (Tabela 3). O aumento da acidez, após o 4º dia, pode ser decorrente da interrupção do processo respiratório e migração do ácido cítrico pela liberação controlada do filme para a maçã. Outro fator a ser analisado é o pH ajustado para 8 no desenvolvimento dos filmes, o que pode ter favorecido um aumento do pH encontrados nas rodelas de maçã.

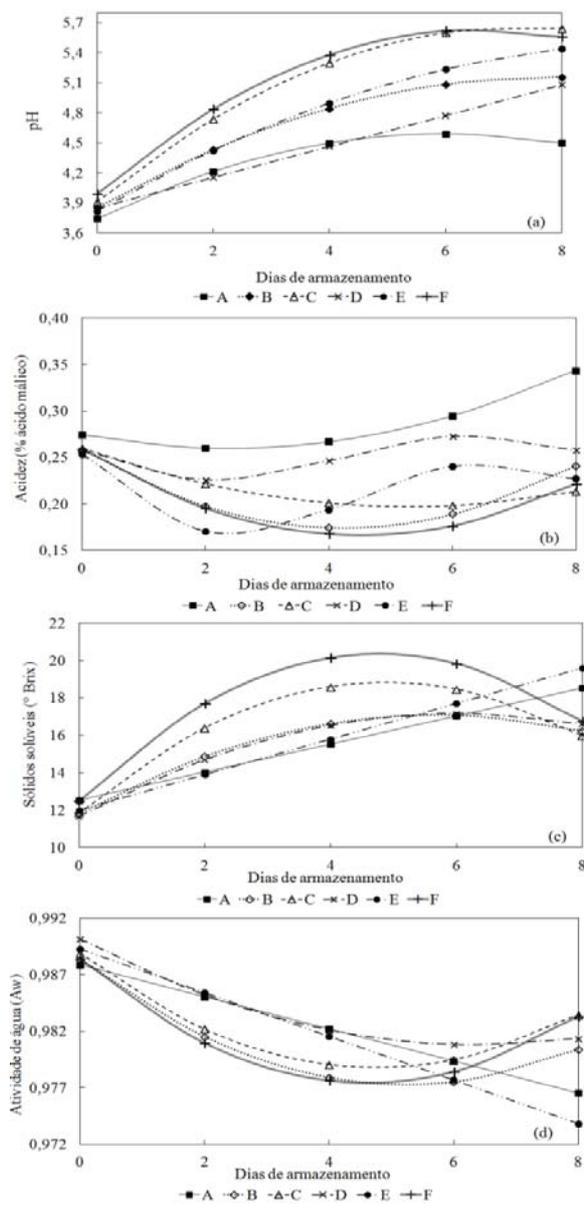


Figura 4 Variação do pH (4a), da acidez (4b), sólidos solúveis (4c) e atividade de água (4d) em rodela de maçãs minimamente processadas durante o armazenamento ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 85\text{ \% UR}$). A (IPS); B (MMT0AC5); C (MMT0AC10); D (MMT3AC0); E (MMT3AC5); F (MMT3AC10)

Maçãs caracterizam-se como frutos climatéricos e durante o amadurecimento, apresentam um aumento na taxa respiratória, estimulada pelo etileno (BIALE, 1960; SAQUET; STREIF, 2002). Conforme Sadler e Murphy (1998) e Olivas, Mattinson e Cánovas (2007), os açúcares presentes nas frutas tendem a aumentar com a maturação dos frutos e os ácidos tendem a diminuir. A figura 4c apresentou um aumento na concentração de sólidos solúveis em todos os tratamentos, em especial as maçãs com os filmes MMT0AC5, MMT0AC10 e MMT3AC10 os quais apresentaram um aumento significativo até o 5º dia, com ligeiro declínio até o 8º dia de armazenamento. A alta concentração de sólidos solúveis pode ser decorrente da provável migração do ácido cítrico presente no filme, que pode ter sido utilizada no processo respiratório em substituição aos açúcares. O decréscimo na acidez é atribuído à diluição da concentração de ácidos e consequente transformação desses ácidos em açúcares solúveis (JERONIMO; KANESIRO, 2000). Segundo Chitarra e Chitarra (2005), a hidrólise da protopectina em pectina solúvel e hidrólise do amido em glicose e frutose favorecem o aumento de sólidos solúveis. O aumento na concentração de sólidos solúveis pode estar associado à desidratação das maçãs em consequência da refrigeração. Gonçalves, Antunes e Brackmann (2000) estudaram pêras '*Nijisseiki*' em atmosfera refrigerada e encontraram maior concentração de sólidos solúveis totais em consequência da desidratação dos frutos. Jiang, Pen e Li (2004) estudaram fatias de castanhas tratadas com ácido cítrico e observaram teores mais elevados de sólidos solúveis em relação ao controle.

Houve diminuição na atividade de água (Aa) das rodela de maçã para todos os filmes durante o tempo de armazenamento (Figura 4d). Porém, o filme MMT3AC0 manteve a Aa nas rodela de maçãs com valores mais altos que os demais filmes, mostrando que a presença de argila MMT pode influenciar na atividade de água.

4 CONCLUSÃO

A combinação entre MMT e ácido cítrico para o filme MMT3AC5 apresentou os menores valores de umidade e solubilidade.

Baseado na cor e inibição da atividade enzimática da polifenoloxidase como parâmetros críticos de qualidade, o presente trabalho mostrou que a aplicação de montmorilonita combinada com ácido cítrico em filmes de isolado proteico de soro de leite foram eficazes na conservação de rodela de maçãs minimamente processadas durante o armazenamento a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 85\text{ UR}$. O filme MMT3AC5 apresentou a melhor resposta quanto a esses parâmetros, mostrando que a utilização de nanopartículas de argila montmorilonita auxiliou nas propriedades de barreira e consequente redução da perda de qualidade em maçãs minimamente processadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES, CNPq, FINEP e FAPEMIG pelo apoio financeiro, *Hilmar Ingredients*, *Southern Clay Products* e *Cargill Brasil* pela doação de isolado proteico de soro, argila montmorilonita PB Cloisite Na⁺ e ácido cítrico, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for moisture content of paper and paperboard by oven drying. ASTM D644-99R07**. Philadelphia, 2007.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association of Official Analytical Chemistry**. 17th ed. Washington, 2002.
- BIALE, J. B. Respiration of fruits. In: RUHLAND, W. (Ed.). **Handbuch der Pflanzenphysiologie**. Berlin: Springer Verlag, 1960. v. 12, p. 536-592.
- BOTELHO, M. C. et al. Quality of fresh cut pupunha palm cabbage: application of antioxidants. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 5, p. 1312-1319, 2010.
- BUERA, M. P.; LOZANO, R. D.; PETRIELLA, C. Definition of colour in the nonenzymatic browning process. **Die Farbe**, Madrid, v. 32, n. 33, 318-322, 1985.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.
- CZELUSNIAK, C. et al. The quality of apples produced in Brazil: physical and chemical aspects. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 1, p. 25-31, 2003.
- DEL AGUILA, J. S. et al. Effect of antioxidants in fresh cut radishes during the cold storage. **Brazilian Archives of Biology Technology**, Campinas, v. 51, n. 6, p. 1217-1223, 2008.

ENDO, E. et al. Use of active films in the minimally processed potato conservation. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 349-360, abr./jun. 2008.

FAGUNDES, A. F.; AYUB, R. A. Caracterização físico-química de caquis cv. Fuyu submetidos à aplicação de agentes inibidores de escurecimento e armazenados a 0 °C. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 3, p. 403-408, 2005.

FAIRLEY, P. et al. Mechanical properties and water vapor permeability of edible films from whey protein isolate and sodium dodecyl sulfate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, p. 438–443, 1996.

FONTES, L. C. B. et al. Preservation of minimally processed apple using edible coatings. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 882-880, 2008.

GARCIA, E. L.; BARRETT, D. M. Preservative treatments for fresh-cut fruits and vegetables. In: LAMIKANRA, O. (Ed.). **Fresh-cut fruits and vegetables: science, technology and market**. Boca Raton: CRC, 2002. p. 267-303.

GHIDELLI, C. et al. Antibrowning effect of antioxidants on extract, precipitate, and fresh-cut tissue of artichokes. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 51, n. 2, p. 462-468, 2013.

GONÇALVES, E. D.; ANTUNES, P. L.; BRACKMANN, A. Armazenamento de pêra 'Nijisseiki' em atmosfera controlada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 226-231, 2000.

GÜÇBILMEZ, C. M.; YEMENICIOFLU, A.; ARSLANOFLU, A. Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein Wlms incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. **Food Research International**, Barking, v. 40, p. 80–91, 2007.

HAMINIUK, C. W. I. et al. Efeito de prétratamentos no escurecimento das cultivares de maçã Fuji e Gala após o congelamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, p. 1029-1033, 2005.

HE, Q.; LUO, Y.; CHEN, P. Elucidation of the mechanism of enzymatic browning inhibition by sodium chlorite. **Food Chemistry**, London, v. 110, p. 847-851, 2008.

JERONIMO, R. F.; KANESIRO, M. A. B. Efeito da associação de armazenamento sob refrigeração e atmosfera modificada na qualidade de mangas 'Palmer'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 237-243, 2000.

JIANG, Y.; PEN, L.; LI, J. Use of citric acid for shelf life and quality maintenance of fresh-cut Chinese water chestnut. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 63, p. 325-328, 2004.

KERRY, J. P.; O'GRADY, M. N.; HOGAN, S. A. Past, current and potential utilization of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. **Meat Science**, Barking, v. 74, p. 113-130, 2006.

KIM, S. J.; USTUNOL, Z. Sensory attributes of whey protein isolate and candellila wax emulsion edible films. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 66, n. 6, p. 909-911, 2001.

KREUZ, C. L.; ARGENTA, L. C. O uso do 1-MCP para a geração de valor na cadeia produtiva da maçã. **Revista Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 16, n. 2, p. 59-62, 2003.

KRISTO, E.; KOUTSOUMANIS, K. P.; BILIADERIS, C. G. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 22, 373-386, 2008.

LACOSTE, A. et al. Advancing controlled release packaging through smart blending. **Packaging Technology and Science**, London, v. 18, n. 2, p. 77-87, 2005.

LEE, J. Y. et al. Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, London, v. 36, p. 323–329, 2003.

LI, Y. et al. Fabrication and characterization of TiO₂/whey protein isolate nanocomposite film. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, p. 1098-1104, 2011.

LIMBO, S.; PIERGIOVANNI, L. Minimally processed potatoes part 2: effects of high oxygen partial pressures in combination with ascorbic and citric acid on loss of some quality traits. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 43, p. 221–229, 2007.

LU, S. et al. Efficacy of sodium chlorite as an inhibitor of enzymatic browning in apple slices. **Food Chemistry**, London, v. 104, p. 824–829, 2007.

MAJZADEH-ARDAKANI, K.; NAZARI, B. Improving the mechanical properties of thermoplastic starch/poly(vinyl alcohol)/clay nanocomposites. **Composites Science and Technology**, Barking, v. 70, p. 1557–1563, 2010.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 13, n. 6, p. 1091-1101, 1972.

MCHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Plasticized whey protein edible films: Water vapor permeability properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, p. 416–423, 1994.

MIN, S.; KROCHTA, J. M. Antimicrobial films and coatings for fresh fruits and vegetables. In: JONGEN, W. (Ed.). **Raw material safety: fruit and vegetables**. Cambridge: Woodhead, 2005

NUNES, E. E.; VILAS BOAS, E. V. B.; XISTO, A. L. R. P. Qualidade de mandioquinha-salsa minimamente processada: uso de antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 2, n. 3, p. 43-50, 2011.

OLIVAS, G. I.; MATTINSON, D. S.; CÁNOVAS, G.V. Alginate coatings of minimally processed 'Gala' apples. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 25, p. 89-96, 2007.

OZDEMIR, M.; FLOROS, J. D. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for water vapor permeability, water solubility and sensory characteristics. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 86, p. 215–224, 2008.

PÉREZ-GAGO, M. B. et al. Effect of solid content and lipid content of whey protein isolate–beeswax edible coatings on color change of fresh-cut apples. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 68, p. 2186–2191, 2003.

PRANOTO, Y.; SALOKHE, V. M.; RAKSHIT, S. K. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. **Food Research International**, Barking, v. 38, 267–272, 2005.

RAMOS, O. L. et al. Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. **Food Research International**, Barking, v. 45, p. 351–361, 2012.

RAYBAUDI-MASSILIA, R. M. et al. Shelf-life extension of fresh-cut "Fuji" apples at different ripeness stages using natural substances. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 45, n. 2, p. 265-275, 2007.

RHIM, J. W.; LEE, J. H.; KWAK, H. S. Mechanical and water barrier properties of soy protein and clay mineral composite films. **Food Science Biotechnology**, Seoul, v. 14, p. 112–116, 2005.

ROJAS-GRAÜ, M. A. et al. browning inhibition in fresh-cut 'Fuji' apple slices by natural antibrowning agents. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n. 1, p. 59–65, 2006.

SADLER, G. D.; MURPHY, P. A. pH and titratable acidity. In: SUZANNE N. S. (Ed.). **Food analysis**. Gaithersburg: Aspen, 1998. p. 101–116.

SALGADO, P. R. et al. Biodegradable sunflower protein films naturally activated with antioxidant compounds. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, p. 525–533, 2010.

SALMIERI, S.; LACROIX, M. Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone- based films containing essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, 10205–10214, 2006.

SAQUET, A. A.; STREIF, J. Respiration and ethylene production by apples stored in different oxygen concentrations. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 1, p. 71-75, jan-abr. 2002.

SATAQUE, M. Y.; WOSIACKI, G. Caracterização da polifenoloxidase da maçã (Malus doméstica, v. Gala) **Arquivo de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 30, n. 2, p. 287-299, 1987.

SONG, N. B. et al. Effects of plasticizers and nano-clay content on the physical properties of chicken feather protein composite films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 31, p. 340-345, 2013.

SPSS STATISTICS 17.0: user's guide. Chicago, 2007.

TEISSON, C. Le brunissement interne de Içananás: historique, material e métodos. **Fruits**, Paris, v. 34, n. 4, p. 245-281, 1979.

TUNÇ, S.; DUMAN, O. Preparation and characterization of biodegradable methyl cellulose/montmorillonite nanocomposite films. **Applied Clay Science**, Amsterdam, v. 48, p. 414–424, 2010.

VILAS-BOAS, E. V. B.; KADER, A. A. Effect of atmospheric modification, 1-MCP and chemicals on quality of fresh-cut banana. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 39, p. 155–162, 2006.

WILSON, C. L. **Intelligent and active packaging for fruits and vegetables**. Boca Raton: CRC, 2008. p. 315.