

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

MARIANE ALVES TAVARES

**AMIDO, ÁLCOOL POLIVINÍLICO E ÁCIDOS CARBOXÍLICOS NA
PRODUÇÃO DE BIOFILMES**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

APUCARANA
2013

MARIANE ALVES TAVARES

**AMIDO, ÁLCOOL POLIVINÍLICO E ÁCIDOS CARBOXÍLICOS NA
PRODUÇÃO DE BIOFILMES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR como requisito para aprovação no Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos.

Orientadora: Prof. Dr^a Franciele Rezende Barbosa Turbiani

Co-Orientadora: Prof. Me. Patrícia Salomão Garcia

APUCARANA
2013



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Diretoria do *Campus* Apucarana
Pró-Reitoria de Graduação e Educação Profissional
Graduação em Tecnologia em Processos Químicos



TERMO DE APROVAÇÃO

AMIDO, ÁLCOOL POLIVINÍLICO E ÁCIDOS CARBOXÍLICOS NA PRODUÇÃO DE BIOFILMES

por
MARIANE ALVES TAVARES

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentada às 14 horas do dia 05 de abril de 2013 como requisito parcial para obtenção do título de TECNÓLOGO EM PROCESSOS QUÍMICOS, Programa de Graduação em Tecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Apucarana. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores: Dra. Franciele Turbiani (orientadora), Dra. Alessandra Baron e Me. Fernanda Seixas. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado desde que atendidas às recomendações mencionadas.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, Antonio Carlos Tavares e Marta Maria Alves pelo apoio, empenho, confiança e investimento na minha formação.

Ao meu irmão Raphael Augusto Alves Tavares pela colaboração acadêmica e amparo em momentos de dificuldade.

Ao Bruno de Freitas Alves por estar ao meu lado em todos os momentos, amenizando as situações difíceis sempre que precisei.

Aos meus amigos Paulo Henrique Hideki Araki, Marcela Breves de Abreu, Daniela Okada, José Augusto de Oliveira Toral, Guilherme Luiz Brizola, Ana Carolina Toledo Santana e Claudia Regina Rodrigues Nunes, pelos conselhos, auxílio em todas as ocasiões (boas ou ruins), pelas risadas, momentos de descontração e principalmente pelo companheirismo.

A todos os professores que colaboraram para a minha formação e participaram da minha trajetória nesses anos de graduação, em especial as Professoras Franciele Rezende Barbosa Turbiani e Patrícia Salomão Garcia pela orientação, ensinamentos, ideias, paciência e principalmente pela amizade.

Ao Professor Dr. Gylles Ricardo Ströher, pela tranquilidade, profissionalismo, conselhos e ensinamentos transmitidos ao longo desses anos.

A banca Alessandra Machado Baron e Fernanda Lini Seixas pelo aceite do convite e colaboração na versão final.

Agradeço também a todos os servidores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Câmpus Apucarana e da Universidade Estadual de Londrina que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

TAVARES, Mariane Alves. Amido, **Álcool Polivinílico e Ácidos Carboxílicos na Produção de Biofilmes**. 2013. 47 p. – Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2013.

Os plásticos são amplamente utilizados na produção de embalagens de produtos alimentícios, utensílios domésticos, higiene e limpeza, cosméticos, farmacêuticos e industriais. No entanto, plásticos convencionais são responsáveis por gerar uma grande quantidade de resíduos que são depositados ao ambiente e requerem um longo período para degradar completamente. Aliado à necessidade de substituir plásticos provenientes de fontes não renováveis, esse estudo buscou avaliar o efeito da adição dos ácidos carboxílicos nas propriedades de filmes de amido de mandioca e álcool polivinílico plastificados com glicerol e produzidos por casting. Os filmes foram caracterizados quanto à espessura, umidade, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor d'água, propriedades mecânicas e análise morfológica. Foi realizado um Planejamento Fatorial 2^2 completo com 3 repetições no ponto central para estudar o efeito do tempo de blenda (amido-PVOH) e do tempo de reticulação do ácido cítrico nas propriedades de umidade e solubilidade em água dos filmes. Outras formulações de filmes foram elaboradas com o melhor tempo (2 horas de blenda e 15 minutos de reticulação) comparando o controle (amido- PVOH- glicerol) e a interação dos ácidos (cítrico e succínico) nos filmes quanto à diferença significativa ($p \leq 0,05$). A espessura média dos filmes foi de $0,12 \pm 0,02$ mm. Os biofilmes apresentaram cerca de $14\text{g}/100\text{g}_{\text{filme}}$ de umidade e solubilidade em água de até 31% da matéria seca. A tensão na ruptura variou de 16,4 a 25,1 MPa, o alongamento na ruptura de 6,37 a 15,91% e o módulo de Young de 451,8 a 670,6 MPa. A permeabilidade ao vapor de água foi moderada (0,20 a 0,25 $\text{g}\cdot\text{mm}/\text{m}^2\cdot\text{dia}\cdot\text{kPa}$) e os valores encontrados são típicos de biofilmes hidrofílicos. A morfologia dos filmes foi verificada por microscopia eletrônica de varredura e observou-se que o controle apresentou uma estrutura relativamente compacta e homogênea, possivelmente devido a compatibilidade polimérica entre o amido e o PVOH. No entanto, notou-se também a presença de grânulos de amido não rompidos no controle e no filme contendo ácido succínico. No filme contendo ácido cítrico atentou-se na presença de “donuts”, já detectados por outros autores. A partir da análise dos resultados considera-se que de maneira geral, os filmes produzidos apresentaram-se homogêneos, transparentes, visualmente atrativos (sem presença de bolhas) e manuseáveis e que a adição de PVOH melhorou as propriedades, se comparado a filmes contendo somente amido.

Palavras-chave: Amido de mandioca. Álcool Polivinílico. Ácidos carboxílicos. Glicerol. Biofilmes.

ABSTRACT

TAVARES, Mariane Alves. **Starch, Polyvinyl Alcohol and Carboxylic Acids in the Production of Biofilms**. 2013. 46 p. – Technology in Chemical Processes, Federal Technological University of Paraná. Apucarana, 2013.

Plastics are widely used in the production of food packaging, household items, hygiene and cleaning products, cosmetics, pharmaceutical and industrial applications. However, conventional plastics are responsible for generating large amounts of waste that are deposited to the environment and require a long time to completely degrade. Because of the need to replace plastics from non-renewable sources, in this context we studied the junction of cassava starch, polyvinyl alcohol, glycerol and carboxylic acids (citric and succinic acids) in the preparation of biodegradable films by casting method. Furthermore, this study optimized the methodology developed by Shi *et al.* (2008), evaluated the effect of adding carboxylic acids to the properties of the films of PVOH and starch and characterized in relation to the thickness, moisture, water solubility, water vapor permeability, mechanical properties and morphological analysis (scanning electron microscopy). We conducted a complete Factorial Design 2^2 with 3 replications at the central point for studying the effect of time of blend (starch-PVOH) and time of crosslinking of citric acid on the properties of moisture and water solubility of the films. Other formulations of films were prepared with the best time (2 hours of blend and 15 minutes of crosslinking) compared to control (starch-PVOH-glycerol) and the interaction of acids (citric and succinic) in films about the significant difference ($p \leq 0.05$). The average film thickness was 0.12 ± 0.02 mm. The biofilms had around $14\text{g}/100\text{g}_{\text{film}}$ moisture content and water solubility up to 31% of total dry mass. The tensile strength varied from 16.4 to 25.1 MPa, elongation at break from 6.37 to 15.91% and the Young's modulus of 451.8 to 670.6 MPa. The water vapor permeability is moderate ($0,20$ a $0,25$ $\text{g}\cdot\text{mm}/\text{m}^2\cdot\text{dia}\cdot\text{kPa}$), typical of highly hydrophilic films. The morphology of the films was observed by scanning electron microscopy and observed that the control presented a relatively compact and homogeneous structure, suggesting the polymer compatibility between starch and PVOH. However, it was observed also the presence of starch granules not disrupted in control and film-containing succinic acid. In the film containing citric acid verified the presence of "donuts", as detected by other authors. From the analysis results it is considered that in general, the films produced were homogeneous, transparent, visually attractive (without presence of air bubbles) and flexible, and that the addition of PVOH has improved properties when compared to films containing only starch.

Keywords: Cassava starch. Polyvinyl alcohol. Carboxylic acids. Glycerol. Biofilms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química parcial da amilose	14
Figura 2- Estrutura química parcial da amilopectina	14
Figura 3- Estrutura do glicerol.	17
Figura 4- Estrutura química parcial do álcool polivinílico.....	17
Figura 5- Estrutura química do ácido succínico.....	19
Figura 6- Estrutura química do ácido cítrico.	19
Figura 7- Pesa-filtros utilizados nas análises de umidade e solubilidades dos filmes produzidos.....	22
Figura 8- Amostras de filmes em agitação na incubadora	23
Figura 9 - Cápsula utilizada na análise de permeabilidade ao vapor d'água dos filmes.....	24
Figura 10 - Fotos dos filmes de amido- PVOH- glicerol (controle) produzidos por <i>casting</i>	27
Figura 11 - Superfície de contorno dos filmes de amido- PVOH- glicerol- ácido cítrico (curvatura no ponto central): Solubilidade em água.	29
Figura 12- Ganho de massa dos filmes de amido- PVOH- ácidos carboxílicos em função do tempo quando submetidos à permeabilidade ao vapor d'água.	33
Figura 13- Micrografia de fratura (1600 x) dos filmes: (a) C- controle, (b) AC- ácido cítrico e (c) AS- ácido succínico.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Planejamento Fatorial 2 ² completo para produção de filmes de amido-PVOH com ácido cítrico	21
Tabela 2- Solubilidade dos filmes de amido- PVOH- glicerol- ácido cítrico, produzidos segundo o Planejamento Fatorial 2 ² completo	28
Tabela 3- Análise de Variância (ANOVA) para os resultados de solubilidade dos filmes produzidos de acordo com Planejamento Fatorial Completo 2 ²	29
Tabela 4- Conteúdo de umidade e solubilidade em água de filmes de amido- PVOH- ácidos carboxílicos.	31
Tabela 5- Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de amido- PVOH- glicerol- ácidos carboxílico	32
Tabela 6- Classificação da permeabilidade ao vapor d'água de filmes	33
Tabela 7- Propriedades mecânicas dos filmes de amido- PVOH- glicerol- ácidos carboxílicos	34

LISTA DE SÍMBOLOS

σ	Tração na ruptura (MPa)
ε	Alongamento do filme (%)
E_0	Módulo de Young
d_r	Separação entre as garras no momento da ruptura (cm)
d_i	Separação inicial entre as garras (cm)
F_m	Força máxima no momento de ruptura (N)
δ	Espessura inicial do filme (mm)
A_e	Área exposta do filme (m ²)
∇P_{H_2O}	Diferença de pressão parcial do vapor de água no ambiente (kPa)
K_{vap}	Permeabilidade ao vapor de água [(g.mm)/(m ² .dia.kPa)]
\dot{G}	Taxa constante de ganho de massa (g/dia)
S_w	Quantidade de matéria solúvel (%)
m_i	Massa seca inicial (g)
m_{sf}	Massa seca final (g)
ω	Umidade relativa (%)
X_1	Tempo de blenda da variável codificada e real (horas)
X_2	Tempo de reticulação da variável codificada e real (minutos)
Y_1	Variável dependente (umidade %)
Y_2	Variável dependente (solubilidade %)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVO GERAL	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3	REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1	BIOFILMES	13
3.2	AMIDO	13
3.3	PLASTIFICANTES	16
3.4	ÁLCOOL POLIVINÍLICO - PVOH	17
3.5	ÁCIDOS CARBOXÍLICOS	18
4	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	MATERIAIS	20
4.2	MÉTODOS	20
4.2.1	Produção dos filmes	20
4.2.2	Caracterização dos filmes	20
4.2.2.1	Umidade	20
4.2.2.2	Solubilidade	20
4.2.2.3	Espessura	20
4.2.2.4	Permeabilidade ao Vapor D'água	20
4.2.2.5	Propriedades Mecânicas	20
4.2.2.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	20
4.2.2.7	Análise Estatística	20
5	RESULTADOS	27
5.1	PROPRIEDADE DOS FILMES	20
5.1.1	Características Gerais	27
5.1.2	Tempo de Blenda e Reticulação	28
5.1.3	Umidade e Solubilidade	30
5.1.4	Permeabilidade ao Vapor D'água	31
5.1.5	Propriedades Mecânicas	34
5.1.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	36
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

De acordo com Crippa (2006), os plásticos são utilizados em grande escala na produção de embalagens, principalmente de produtos alimentícios, utensílios domésticos, higiene e limpeza, cosméticos, farmacêuticos e industriais. Estas embalagens podem estar na forma de sacolas, garrafas, caixas e filmes. Os plásticos se adaptam a uma variedade de aplicações em virtude de sua resistência mecânica, facilidade de fabricação e variação de cor (SHEREVE e BRINK, 1977).

A utilização dos plásticos nas indústrias tornou-se determinante devido, principalmente, ao seu poder de substituição em diversos segmentos das áreas tecnológicas e as suas propriedades mecânicas (BONA, 2007). As substâncias petroquímicas são as matérias-primas mais usuais para sua fabricação (SHEREVE e BRINK, 1977).

Os plásticos convencionais são responsáveis por gerar uma grande quantidade de resíduos que são depositados no ambiente e também requerem um longo período para degradar completamente. Nos últimos anos vêm se discutindo a necessidade de substituir os plásticos provenientes de fontes não renováveis, como o petróleo, por filmes biodegradáveis.

Uma alternativa viável é o desenvolvimento de biofilmes, de custo relativamente baixo, produzido em larga escala e que possua propriedades mecânicas e de barreira comparáveis aos polímeros convencionais não biodegradáveis.

Segundo Donhowe e Fennema (1993), os biofilmes constituem materiais finos e flexíveis produzidos a partir de materiais biológicos, que atuam como recobrimentos, para proteger os alimentos, ou como filmes, para envolver os mesmos após sua fabricação. Existem três categorias em que os biofilmes podem ser classificados: hidrocolóide (contendo proteínas, polissacarídeos ou alginatos), lipídeos (constituídos de ácidos graxos e acetilglicerol) e compósitos (produzido pela combinação de duas categorias).

Dentre as macromoléculas que permitem a elaboração de biofilmes destacam-se: a proteína sericina, tendo em vista que é um resíduo gerado no processo de produção dos fios de seda (ZHAN et al., 2006; WU et al., 2007) e o amido, que é um polissacarídeo de glicose (SOLOMONS e FRYHLE, 2008),

encontrado com abundância na natureza (BENGTSSON, KOCH e GATENHOLM, 2003).

Além de boa resistência mecânica para suportar o transporte e o armazenamento de produtos, a embalagem deve contribuir com melhores propriedades de barreira a gases e/ou vapor d'água preservando produtos da ação destes agentes por mais tempo, ampliando a vida de prateleira do produto, reduzindo perdas e aumentando seu potencial de uso (SARON, 1998).

Para melhorar a propriedade de barreira e mecânica dos filmes confeccionados a partir de amido e glicerol (plastificante) torna-se necessário adicionar um polímero sintético, álcool polivinílico (PVOH), e ácidos carboxílicos, pois os mesmos podem reagir com a molécula do biopolímero tornando-os menos insolúveis e mais resistentes.

Shi et al., (2008) produziram filmes por *casting* a partir de uma mistura de polímero natural (amido) e sintético (PVOH) juntamente com o ácido cítrico (1:3) obtendo excelentes resultados no produto final. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi produzir filmes com maior teor de amido (1:1).

Assim, a inovação do presente trabalho está na diminuição da quantidade de PVOH, com simultâneo aumento na concentração de amido o que acarretaria em uma redução no custo do produto final. Além disso, outro ácido carboxílico foi utilizado como agente esterificante, o ácido succínico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir pela técnica de *casting* filmes de amido e PVOH com diferentes ácidos carboxílicos (ácido cítrico e succínico) e avaliar as características mecânicas, de aparência e de permeabilidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudar o melhor tempo de blenda amido-PVOH e tempo de reticulação nos resultados de solubilidade dos filmes produzidos com amido-PVOH-glicerol-ácido cítrico;

2. Avaliar o efeito da adição de ácido cítrico e succínico nas propriedades dos filmes de amido e PVOH;

3. Caracterizar os filmes quanto à espessura, umidade, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor d' água, propriedades mecânicas e morfológicas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 BIOFILMES

A preocupação ambiental aliada ao elevado custo de materiais obtidos de fontes não renováveis tem levado a comunidade científica ao desenvolvimento de biofilmes que podem ser elaborados a partir de matérias-primas renováveis, abundantes e de baixo custo.

Entre os biopolímeros mais comumente empregados para a produção de filmes, destacam-se as proteínas, como gelatina (AL-HASSAN e NORZIAH, 2012) e sericina (TURBIANI, 2011) e os polissacarídeos como celulose (LI, ZHANG e XU, 2012; MÜLLER, 2007) e o amido (MALI et al., 2004; MALI et al., 2006; THUNWALL et al., 2008; SHI et al., 2008; GARCIA et al., 2011).

Os biofilmes podem ser obtidos através de processos como extrusão e *casting*. De acordo com Krotcha e Mulder-Johnston (1997), a técnica de *casting* envolve inicialmente uma etapa de solubilização da macromolécula em um solvente, podendo ser incorporados posteriormente diversos aditivos (plastificantes e agentes esterificantes). Na segunda etapa, a solução filmogênica é depositada sobre um suporte, geralmente placas de polipropileno e finalmente submetida ao processo de secagem por evaporação até que o filme se desprenda.

3.2 AMIDO

O amido é um polissacarídeo de origem vegetal que apresenta uma estrutura granular (HERMANSSON e SVEGMARK, 1996; SOLOMONS e FRYHLE, 2008). Os grânulos de amido apresentam diferentes tamanhos e formatos de acordo com a sua fonte (arroz, milho, batata, mandioca).

O amido é constituído por polímeros de glicose quimicamente diferentes chamados de amilose e amilopectina. A amilose (Figura 1) é essencialmente linear, com poucas ramificações, cujas unidades de glicose estão unidas por ligações

glicosídicas α (1,4). Enquanto que a amilopectina (Figura 2) é um polímero altamente ramificado e com elevada massa molar e suas unidades de glicose estão unidas por ligações glicosídicas α (1,4) na cadeia principal e α (1,6) nos pontos de ramificações (RIGO, 2006).

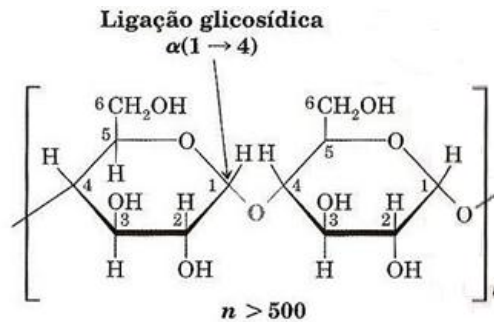


Figura 1- Estrutura química parcial da amilose
Fonte: SOLOMONS e FRAYHLE (2008, p.352).

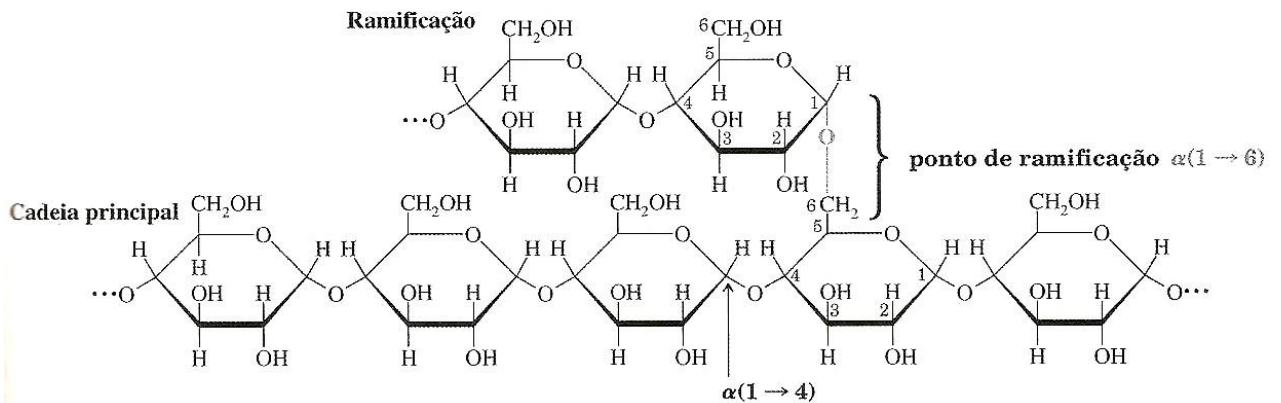


Figura 2- Estrutura química parcial da amilopectina
Fonte: SOLOMONS e FRAYHLE (2008, p. 353).

Segundo Mali et al., (2006), a amilose é responsável pela capacidade de formação de filmes de amido. Em virtude de sua estrutura linear, uma maior proporção de amilose pode produzir filmes mais resistentes proporcionando melhor interação entre as cadeias poliméricas.

De acordo com Rodriguez et al., (2001), dentro do grânulo a amilose e a amilopectina se encontram distribuídas em sucessivas camadas em torno de um

núcleo, conferindo um caráter semicristalino. Essa característica deve-se a presença de regiões mais ordenadas (cristalinas), onde há uma maior concentração de amilopectina e regiões mais desordenadas (amorfas), onde há uma maior concentração de amilose.

A alteração da cristalinidade do amido ocorre quando, devido à presença de água e aquecimento, as ligações de hidrogênio, presentes nas regiões amorfas são rompidas permitindo o intumescimento do grânulo (VAN SOEST e VLIEGENTHART, 1997; GARCIA et al., 1997). Após o rompimento, ocorre a lixiviação da amilose para a fase aquosa, iniciando o processo de gelatinização. Devido à linearidade da amilose, após a gelatinização tende a orientar-se paralelamente, diminuindo a distância intermolecular, permitindo a formação de ligações de hidrogênio com outros grupos hidroxilas provenientes de estruturas adjacentes, tornando os filmes de amido mais hidrofílicos (VICENTINI, 2003).

As diversas fontes de amido também diferem quanto ao teor de amilose e amilopectina. Amido de milho possui por volta de 28% de amilose e 72% de amilopectina, enquanto que o amido de mandioca apresenta de 83% de amilopectina e 17% de amilose. No entanto, Lavina (1993) destaca que o amido proveniente da mandioca apresenta uma série de vantagens em relação às demais fontes. Dentre essas vantagens podem ser citadas: a eliminação das etapas de hidratação e de purificação de componentes proteicos e lipídicos no processo de fabricação.

Há de se considerar ainda que, segundo a Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca (ABAM), em 2009, apresenta que o estado do Paraná foi responsável pela produção de 71% do total da produção de amido de mandioca do Brasil, fato que justifica o emprego de amido de mandioca na produção de biofilmes.

Entretanto, filmes produzidos somente com amido apresentam baixa flexibilidade, propriedades de barreira e mecânicas pouco desejáveis. Para superar este inconveniente, é adicionado à matriz polimérica um plastificante que confere maior mobilidade molecular e distensibilidade ao produto final. O amido plastificado é denominado de amido termoplástico (ATp).

3.3 PLASTIFICANTES

Os plastificantes são definidos como substâncias com alto ponto de fusão e baixa volatilidade que quando adicionados a uma matriz polimérica provocam mudanças nas propriedades físicas, químicas e mecânicas do material (McHUGH e KROCHTA, 1994). Podem ser líquidos, como glicerol ou água, ou sólidos, como o sorbitol (CANEVAROLO, 2006). Além disso, são moléculas pequenas que se alojam facilmente entre as cadeias poliméricas, reduzindo as forças intermoleculares, aumentando assim a mobilidade molecular e a flexibilidade do material final.

Os plastificantes devem apresentar compatibilidade com o biopolímero em questão, sendo os mais comumente utilizados os pertencentes à família dos polióis. A concentração utilizada em filmes geralmente varia de 10 a 60g/100g de matéria seca de polímero, dependendo da flexibilidade que se deseja obter no produto final (GUILBERT, 1986).

O glicerol (Figura 3), na qualidade de agente plastificante, possui as propriedades de aumentar a flexibilidade, melhorando a manuseabilidade dos filmes através da redução das ligações de hidrogênio entre as cadeias do polímero (SRINIVASA, RAMECH e THARANATHAN, 2006; LUO, et al., 2009).

Segundo Mali et al., (2006), quando o glicerol é incorporado como plastificante em filmes a base de amido é fornecido sítios ativos por exposição dos grupos hidroxilas (hidrofílicos), onde a água é adsorvida e atua como um potencializador de mobilidade molecular, devido a sua baixa massa molecular. Em contrapartida, a exposição destes grupos hidroxila responde pelo caráter altamente hidrofílico do amido termoplástico, que pode ser superado pelo emprego de agentes esterificantes responsáveis pela substituição de grupos hidrofílicos (grupos hidroxila) por grupos com características mais hidrofóbicas (grupo éster).

A adição de polímeros sintéticos à matriz polimérica hidrofílica pode ser uma alternativa para melhorar a resistência à água dos filmes produzidos a partir de ATP (amido termoplástico)

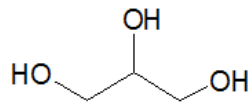


Figura 3- Estrutura do glicerol.

3.4 ÁLCOOL POLIVINÍLICO - PVOH

O álcool polivinílico (Figura 4) é um polímero sintético solúvel em água e com excelente capacidade de formação de filmes, poder emulsificador e adesivo e pode ser empregado também em indústrias de tintas, papel e materiais cerâmicos (FINCH, 1992; MARTEN, 1985).

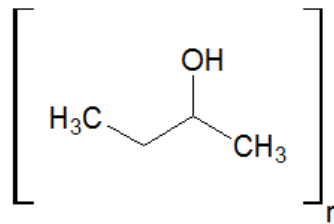


Figura 4- Estrutura química parcial do álcool polivinílico.

Shi et al., (2008) observaram que a adição de PVOH na matriz de amido forma filmes com melhores propriedades mecânicas (resistência à tração e alongação na ruptura) e baixo poder de intumescimento em água.

Muitos autores estudam o desenvolvimento de materiais biodegradáveis, adicionando um polímero natural como o amido a uma matriz polimérica sintética, originando assim uma blenda polimérica (ERMOLOVICH e MAKAREVICH, 2006; SAILAJA e SEETHARAMU, 2008; SHI et al., 2008; GARCIA et al., 2011; OLIVATO et al., 2012).

Dentre os polímeros sintéticos existentes o PVOH destaca-se devido as propriedades de excelente resistência química, propriedades físicas (NAKAYAMA, TAKATSUKA e MATSUDA, 1999), e excelente compatibilizante (JIANG et al., 2004; WAN, et al., 2002), principalmente com amido em razão da presença de diversos grupos hidroxila, conforme observado na Figura 4.

Blendas poliméricas são misturas físicas de dois ou mais polímeros, sem reação química intencional entre os componentes. Uma mistura de polímeros apresenta propriedades diferentes às dos polímeros puros e, na maioria dos casos, superiores quando comparadas às de cada componente individualmente. (AVÉROUS e BOQUILLON, 2004; CANEVAROLO, 2006; NING et al., 2007).

Embora amido e PVOH apresentem semelhanças químicas, o que os classifica como polímeros compatíveis, a proposta de modificação do amido e/PVOH com diferentes ácidos carboxílicos via reações de esterificação para formação de monoéster ou ligações cruzadas (diéster) pode ser justificada por uma possível melhoria principalmente nas propriedades mecânicas e de solubilidade em água do material final.

Os ácidos carboxílicos, por apresentarem baixa toxicidade, são os agentes esterificantes mais comumente utilizados para a produção de filmes para fins alimentícios (SHI et al., 2007; NING et al., 2007; SHI et al., 2008; GARCIA et al., 2011; OLIVATO et al., 2012).

3.5 ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

Ácidos carboxílicos são caracterizados pela presença de um grupo carboxílico (RCOOH) e servem de base para outros compostos químicos, denominados de compostos acila ou derivados de ácidos carboxílicos, como por exemplo: anidrido de ácido, cloreto de acila, éster, nitrila e amida. Como propriedades tem-se que os ácidos carboxílicos são substâncias polares, ou seja, suas moléculas podem formar ligações de hidrogênio fortes entre si e com a água. Além disso, geralmente têm pontos de ebulição altos, sendo que os de massa molecular baixa apresentam solubilidades consideráveis em água (SOLOMONS e FRYHLE, 2008).

De acordo com Garcia et al.,(2011), os ácidos carboxílicos, como ácido cítrico podem atuar como agentes esterificantes e plastificantes e agente hidrolítico.

As hidroxilas do amido e/ou do PVOH comportam-se como as hidroxilas de alcoóis e, portanto reagem com ácidos carboxílicos para formação de ésteres.

Os ácidos dicarboxílicos, como o ácido succínico (Figura 5) e o ácido cítrico (Figura 6) com uma estrutura multicarboxílica, apresentam grupos funcionais capazes de reagir com as hidroxilas de qualquer um dos polímeros (amido/PVOH) inicialmente presente na blenda produzida neste trabalho.

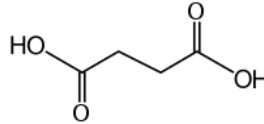


Figura 5- Estrutura química do ácido succínico.

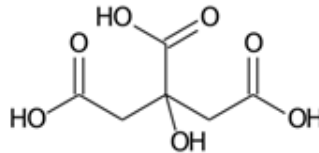


Figura 6- Estrutura química do ácido cítrico.

As ligações cruzadas (diéster), formadas via reações de esterificação reforçam as ligações de hidrogênio naturalmente presentes nas moléculas de polímeros, pois são ligações covalentes e desta forma melhoram as propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água do material (SHI et al., 2008).

Há de se considerar ainda que, conforme sugerido por Shi et al., (2008) o monoéster, possivelmente formado pela reação entre as hidroxilas do amido e/ou PVOH e um dos terminais carboxílicos, pode atuar como plastificante interno melhorando a dispersão entre as cadeias poliméricas e a flexibilidade do material final. Conforme sugerido por Garcia et al., (2011), em razão de sua estrutura multicarboxílica com um grupo hidroxila, o ácido cítrico é um agente multifuncional podendo atuar de diferentes formas dependendo da concentração utilizada: (1) plastificante interno (monoéster), (2) agente de ligação cruzada (diéster), (3) agente hidrolítico.

De maneira análoga, porém com menor intensidade, em virtude de apresentar dois grupos carboxílicos, o ácido succínico também pode atuar como um agente multifuncional, tal qual o ácido cítrico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Para produção dos filmes foram utilizados como polímeros: o amido de mandioca (Indemil, Paranaíba, Brasil) e PVOH (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha). O plastificante utilizado foi o glicerol (Dinâmica, São Paulo, Brasil), Ácido cítrico (Dinâmica, São Paulo, Brasil) e ácido succínico (Isopar, Duque de Caxias, Brasil) foram utilizados como agentes esterificantes.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Produção dos Filmes

O amido de mandioca e o álcool polivinílico foram inicialmente misturados e dissolvidos em água contendo glicerol, à temperatura ambiente com agitação mecânica. A mistura foi aquecida até $95\pm 2^\circ\text{C}$ permanecendo sob agitação para solubilização do PVOH e gelatinização do amido. Após o tempo de blenda foi adicionado o ácido cítrico e a mistura permaneceu sob agitação à 95°C .

Em seguida, alíquotas de 80 g desta solução foram transferidas para placas de polipropileno (diâmetro = 15 cm) e levadas a uma estufa sem circulação de ar (Nova Ética - 420D, Brasil) a 40°C por 16 horas, para gelificação incipiente e formação de um filme por evaporação.

Para otimização do tempo de preparo dos filmes, foi utilizado um Planejamento Fatorial 2^2 completo com 3 repetições no ponto central, totalizando 7 ensaios. As variáveis independentes estudadas foram: tempo de blenda e tempo de reticulação e o agente esterificante empregado nesse estudo foi o ácido cítrico. Os níveis para cada uma das variáveis independentes estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Planejamento Fatorial 2² completo para produção de filmes de amido-PVOH com ácido cítrico

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂
1	-1	-1	2	5
2	+1	-1	4	5
3	-1	+1	2	15
4	+1	+1	4	15
5	0	0	3	10
6	0	0	3	10
7	0	0	3	10

Notas: X₁ - Tempo de blenda (horas); X₂ - Tempo de reticulação (minutos).

Empregando-se a mesma metodologia descrita acima e obedecendo ao melhor tempo de blenda (2 horas) e reticulação (15 minutos), com base nos resultados de umidade e solubilidade dos filmes, novas formulações, contendo ácido cítrico (AC) e ácido succínico (AS), foram preparadas. Para todas as formulações foi utilizada uma proporção de amido: PVOH de 1:1, de maneira a produzir filmes com 3% (m/m) de polímeros. A concentração de glicerol (plastificante) e de ácidos carboxílicos foi fixada em 25% e 5% (m/m) em relação ao amido, respectivamente, para todas as formulações.

Todos os filmes produzidos e as caracterizações, quanto à espessura, umidade, solubilidade e permeabilidade ao vapor d'água, foram feitas na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Apucarana. Enquanto que as análises mecânicas e morfológicas foram realizadas na Universidade Estadual de Londrina.

4.2.2 Caracterização dos Filmes

Para todas as caracterizações, os filmes foram previamente condicionados em dessecadores à $53 \pm 2\%$ de umidade relativa (URE) com solução saturada de $Mg(NO_3)_2$ a $25 \pm 2^\circ C$ por 48 horas, para uniformizar seu conteúdo de umidade.

4.2.2.1 Umidade

Amostras de filmes de amido- PVOH- ácidos carboxílicos foram cortadas com 2,5 cm de diâmetro, e pesadas juntamente com pesa-filtros (Figura 7) em balança analítica (Shimadzu, modelo AY220). Os pesa-filtros contendo os filmes foram submetidos à secagem em estufa de circulação de ar (SOLAB, modelo SL 102/480), a 105°C por um período de 24 horas. Em seguida, os pesa-filtros foram pesados novamente quantificando a massa seca final do filme, conforme a metodologia proposta por Rhim (2002).



Figura 7- Pesa-filtros utilizados nas análises de umidade e solubilidades dos filmes produzidos

O conteúdo de umidade (ω) foi determinado em função da massa seca inicial (m_i) e da massa seca final (m_{sf}), conforme apresentado na Equação 1.

$$\omega = \frac{(m_i - m_{sf})}{m_{sf}} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

ω é a umidade relativa em porcentagem (%);

m_i é a massa seca inicial em gramas (g);

m_{sf} é a massa seca final em gramas (g).

O conteúdo de umidade dos filmes foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão.

4.2.2.2 Solubilidade

A massa de filme de amido- PVOH- ácido carboxílico solubilizada em água foi determinada em triplicata de acordo com a metodologia proposta por Gontard, Guilbert e Cuq (1993).

Inicialmente, amostras de filmes foram cortadas com 2,5 cm de diâmetro, colocadas em pesa-filtros e a massa (pesa-filtros+filme) foi quantificada em balança analítica (Shimadzu, modelo AY220).

As amostras de filmes foram transferidas para copos de isopor onde permaneceram imersas em 50 ml de água destilada, sob agitação branda (à 125 rpm), em uma incubadora refrigerada (Cienlab *Shaker*) durante 24 horas (Figura 8). A temperatura do teste foi de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Ao término do ensaio, as amostras foram novamente transferidas para os pesa-filtros (Figura 7) e levadas à estufa com circulação de ar (SOLAB, modelo SL 102/480) para secagem a 105°C por 24 horas.



Figura 8- Amostras de filmes em agitação na incubadora

A massa seca não solubilizada foi então quantificada em balança analítica (Shimadzu, modelo AY220) após a secagem. A solubilidade foi então determinada a partir da relação com a umidade e a massa seca inicial, conforme apresentado na Equação 2.

$$S_w = \frac{m_i (1 - \omega) - m_{sf}}{m_i (1 - \omega)} \times 100 \quad (2)$$

Em que:

S_w é a quantidade de matéria solúvel em porcentagem (%);

m_i é a massa seca inicial em gramas (g);

m_{sf} é a massa seca final em gramas (g).

4.2.2.3 Espessura

A espessura de cada amostra de filme foi calculada a partir da média aritmética de 5 medidas aleatórias obtidas com auxílio de um micrômetro digital da marca ZAAS, resolução 0,025 mm.

4.2.2.4 Permeabilidade ao Vapor d'Água

A permeabilidade ao vapor d'água foi determinada gravimetricamente, segundo o método E96-95 (ASTM, 1995a). Amostras de filmes de 5,0 cm de diâmetro foram previamente condicionadas à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas em URE de $53 \pm 2\%$ (solução saturada de nitrato de magnésio $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$). As amostras foram fixadas na abertura circular (35 mm de diâmetro) em uma cápsula de permeabilidade de teflon e alumínio (Figura 9). O interior da cápsula foi parcialmente preenchido com cloreto de magnésio (MgCl_2) – $33 \pm 2\%$ (URE) e o sistema foi introduzido no dessecador contendo solução saturada correspondente a uma URE maior que a do interior da cápsula ($75,3 \pm 2\%$ URE – cloreto de sódio NaCl), criando um gradiente de URE para a passagem de vapor d'água para o interior da cápsula. Foram realizadas nove pesagens sucessivas, em intervalos de tempo de 8 e 16 horas. O valor da permeabilidade ao vapor d'água foi calculado em triplicata, conforme Equação 3.



Figura 9 - Cápsula utilizada na análise de permeabilidade ao vapor d'água dos filmes.

$$K_{\text{vap}} = \frac{\dot{G} \times \delta}{A_e \times \nabla P_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (3)$$

Em que:

K_{vap} é a permeabilidade ao vapor de água em [(g.mm)/ (m².dia.kPa)];

\dot{G} é a taxa constante de ganho de massa em gramas por dia (g/dia);

δ é a espessura inicial do filme em milímetros (mm);

A_e é a área exposta do filme (m²);

$\nabla P_{\text{H}_2\text{O}}$ é a diferença de pressão parcial do vapor de água no ambiente próximo às duas faces do filme na temperatura do ensaio (kPa);

A permeabilidade ao vapor de água foi determinada em triplicata e os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão.

4.2.2.5 Propriedades Mecânicas

Um texturômetro modelo TA.TX2 plus (Stable Micro Systems, Inglaterra) foi utilizado para realizar os testes de tração segundo método da ASTM D882-02 (2002). As propriedades avaliadas foram tração na ruptura (σ – MPa), alongamento (ε - %) e Módulo de Young (MPa). Dez corpos de prova de cada formulação foram cortados (50 mm x 20 mm) e condicionados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas em 53 \pm 2% URE (solução saturada de nitrato de magnésio, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$) antes das análises. A velocidade do ensaio foi de 0,83mm/s e a distância inicial entre as garras de 30 mm.

A tração na ruptura e o alongamento foram calculados a partir das Equações 4 e 5.

$$\sigma = \frac{F_m}{A} \quad (4)$$

Em que:

σ é a tração na ruptura em Pascal (Pa);

F_m é a força máxima no momento de ruptura em Newton (N);

A é a área da seção transversal do filme em metros quadrados (m²).

$$\varepsilon = \frac{d_r - d_i}{d_i} \times 100 \quad (5)$$

Em que:

ε é o alongamento em porcentagem (%);

d_r é a separação entre as garras no momento da ruptura em centímetro (cm);

d_i é a separação inicial entre as garras em centímetro (cm).

4.2.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise de microestrutura dos filmes foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras foram imersas em nitrogênio líquido para congelamento rápido, fraturadas com auxílio de pinças de aço inoxidável e introduzidas em dessecador com cloreto de cálcio ($\approx 0\%$ URE) para secar, durante 48 horas, antes do revestimento com ouro com um *Sputter Coater* BAL-TEC SCD 050. Um microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200 foi utilizado para obtenção das micrografias. As imagens de fratura foram obtidas com aumento de 1600x, respectivamente.

4.2.2.7 Análise estatística

A avaliação estatística dos resultados obtidos foi realizada por meio do programa STATISTICS, versão 7, empregando-se Teste de *Tukey* para comparação das médias das propriedades a um nível de 95% de confiança.

As análises estatísticas são voltadas à determinação do nível de significância existente entre os valores obtidos em todos os ensaios. Os diferentes resultados são inicialmente avaliados usando análise de variância (ANOVA), sendo os resultados considerados sempre significativos quando $p \leq 0,05$. Quando o conjunto desses valores forem parâmetros significativos, é realizada aplicação das médias dos dados obtidos, no teste de múltipla comparação de *Tukey*.

5 RESULTADOS

5.1 PROPRIEDADES DOS FILMES

5.1.1 Características Gerais

De maneira geral, os filmes contendo amido- PVOH- glicerol- ácidos carboxílicos apresentaram transparência, boa aparência (sem presença de bolhas), manuseabilidade e fácil desprendimento do suporte, como mostrados na Figura 10.

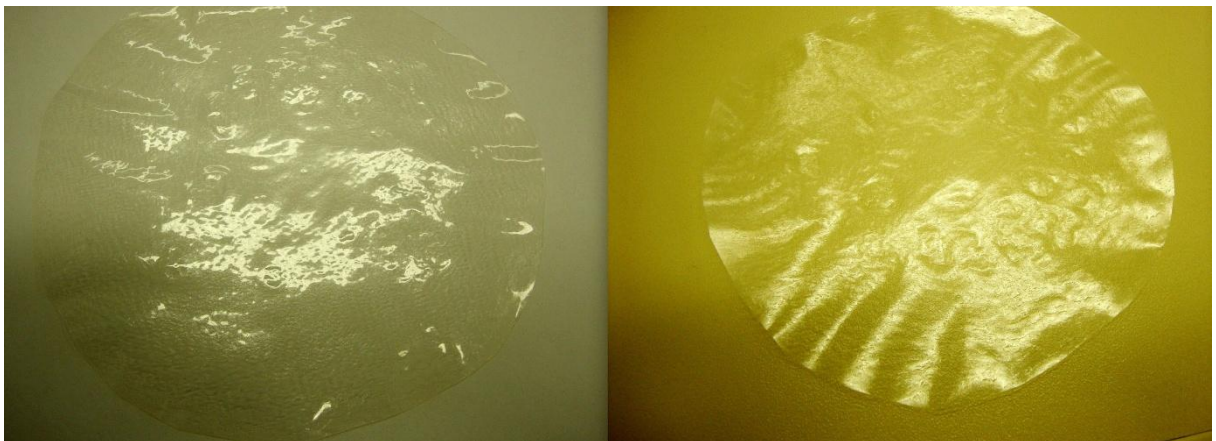


Figura 10 - Fotos dos filmes de amido- PVOH- glicerol (controle) produzidos por *casting*

A aderência (ou pegajosidade), segundo Raquez et al., (2008), que pode ser explicada por um excesso de plastificante, não foi observada para os filmes produzidos com e sem ácidos carboxílicos, sugerindo que o teor de plastificante manteve-se em uma faixa adequadamente aceitável, mesmo que os ácidos carboxílicos possam atuar como agentes plastificantes, conforme sugerido por Shi et al., (2008), Garcia et al., (2011) e Olivato et al., (2012). As espessuras dos filmes variaram de 128 a 156 μm .

5.1.2 Tempo de Blenda e Reticulação

Os resultados do conteúdo de solubilidade para os filmes de amido-PVOH-glicerol-ácido cítrico em diferentes tempos de blenda e reticulação estão apresentados na Tabela 2.

O modelo matemático que melhor se ajustou aos dados experimentais dos parâmetros de solubilidade em água dos filmes foi o modelo linear com duas interações, apresentando valor de R^2 0,918.

De acordo com os valores apresentados na Tabela 2 e a superfície de contorno da Figura 11, os menores valores de solubilidade em água dos filmes de amido-PVOH-glicerol-ácido cítrico foram observados nos menores níveis de tempo de blenda e maior tempo de reticulação, 2 horas e 15 minutos, respectivamente. Já os maiores valores foram notados nos maiores níveis de tempo de blenda e tempo de reticulação, 4 horas e 15 minutos, respectivamente.

Tabela 2- Solubilidade dos filmes de amido- PVOH- glicerol- ácido cítrico, produzidos segundo o Planejamento Fatorial 2^2 completo

Ensaio	Variáveis codificadas e reais		Variáveis Dependentes
	X_1	X_2	Y_1
1	-1(2)	-1(5)	33,91±5, 14 ^{a,b}
2	+1(4)	-1(5)	30,28±6, 37 ^{a,b}
3	-1(2)	+1(15)	24,52±1, 34 ^a
4	+1(4)	+1(15)	36,74±2, 75 ^b
5	0(3)	0(10)	31,64±3, 32 ^{a,b}
6	0(3)	0(10)	32,81±2, 11 ^{a,b}
7	0(3)	0(10)	29,04±5, 01 ^{a,b}

Notas:

(a) X_1 : tempo de blenda e X_2 : tempo de reticulação

(b) Y_1 : Solubilidade (%)

(c) Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as médias através do Teste de Tukey.

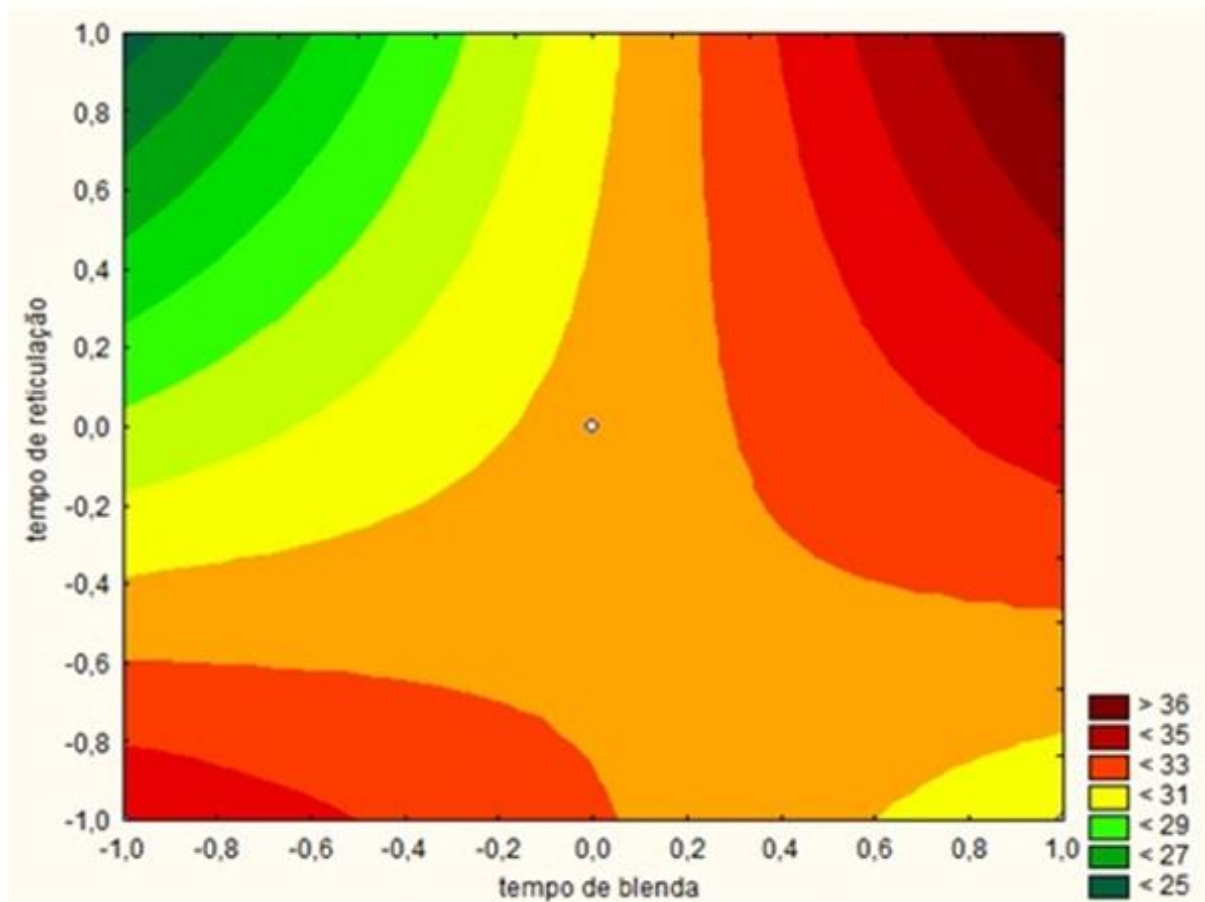


Figura 11 - Superfície de contorno dos filmes de amido- PVOH- glicerol- ácido cítrico (curvatura no ponto central): Solubilidade em água.

Conforme o modelo matemático apresentado na Equação 7 e os dados sumarizados na Tabela 3 verifica-se que a interação entre tempo de blenda e de reticulação exerceu maior influência sobre a solubilidade dos filmes.

Tabela 3- Análise de Variância (ANOVA) para os resultados de solubilidade dos filmes produzidos de acordo com Planejamento Fatorial Completo 22.

Variáveis Dependentes	Variáveis		Efeito	p
	Independentes			
$S_w = (R^2 \ 0,918)$	t_1		4,30	0,16
	t_2		-1,47	0,53
	$t_1 * t_2$		7,93	0,06

Notas:

- (a) S_w = Solubilidade;
 (b) t_1 = tempo de blenda; t_2 = tempo de reticulação;
 (c) $p \leq 0,05$ – efeito significativo.

$$\text{Solubilidade} = + 31,36 + 4,30.t_{\text{blenda}} - 1,47 . t_{\text{reticulação}} + 7,93.t_{\text{blenda}}.t_{\text{reticulação}} \quad (7)$$

O efeito da interação $t_{\text{blenda}}.t_{\text{reticulação}}$ foi positiva e significativa ($p \leq 0,05$). Entretanto, é de interesse que a solubilidade dos filmes de amido-PVOH-glicerol-ácido cítrico seja a menor possível, e dentro deste contexto, conforme observado pela superfície de contorno da Figura 11, Tabela 2 e o modelo matemático, empregando-se menor tempo de blenda e maior tempo de reticulação, observa-se uma redução nos valores de solubilidade em água dos filmes produzidos.

Vale ressaltar também que através da Figura 11 é possível notar que os resultados apresentados não estão em seu ponto de equilíbrio, ou seja, sugere que possivelmente os valores de solubilidade em água podem continuar reduzindo se empregado um tempo de blenda e reticulação menor que 2 horas e 15 minutos, respectivamente.

A partir destes resultados, o menor tempo de blenda e maior tempo de reticulação foram adotados para a produção dos filmes de amido- PVOH- glicerol-ácidos carboxílicos, ou seja, 2 horas e 15 minutos, respectivamente, pois para este ensaio (ensaio 3- Tabela 2) foi obtido o menor valor de solubilidade.

5.1.3 Umidade e Solubilidade

Os valores de umidade e solubilidade para os novos filmes contendo amido-PVOH- glicerol e ácidos carboxílicos produzidos com o melhor tempo de blenda e reticulação estão apresentados na Tabela 4.

Uma baixa solubilidade de filmes biodegradáveis é um dos requisitos mais importantes para a aplicação em alimentos e fármacos, no entanto, a maioria dos estudos publicados com biopolímeros aborda essencialmente as características mecânicas e propriedades de barreira dos filmes (KIM, KO e PARK, 2002; RHIM, 2004).

Tabela 4- Conteúdo de umidade e solubilidade em água de filmes de amido- PVOH- ácidos carboxílicos.

Filme	ω (g/100g _{filme})	S_w (%)
C	14,68 ± 1,04 ^a	30,75 ± 0,64 ^b
AC	14,60 ± 0,34 ^a	23,27 ± 1,45 ^a
AS	13,68 ± 0,30 ^a	21,17 ± 1,83 ^a

Média ± desvio padrão (3 repetições). **Notas:** letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as médias através do Teste de Tukey. C: controle; AC: ácido cítrico; AS: ácido succínico.

O conteúdo de umidade dos filmes (Tabela 4) variou de 13,68 a 14,68%, não apresentando diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o controle e os filmes produzidos com ácidos carboxílicos. Esses valores, na realidade, estão em função do nível de equilíbrio (53 %URE) obtido com o ambiente, no dessecador.

Nota-se que os valores de solubilidade dos filmes AC e AS foram significativamente ($p \leq 0,05$) menores se comparados ao controle, sugerindo que a presença de ácido carboxílico reduziu a solubilidade do filme de amido- PVOH-glicerol. Contudo, mesmo não havendo diferença significativa entre os filmes AC e AS, nota-se uma menor tendência de solubilidade em água para o filme contendo AS. O ácido cítrico, tricarboxílico com grupo hidroxila, possui mais sítios de ligação com a água (ligações de hidrogênio) do que o ácido succínico, um ácido dicarboxílico, o que pode ter contribuído para o maior valor de solubilidade encontrado para o filme AC.

5.1.4 Permeabilidade ao vapor d'água

Os resultados de permeabilidade ao vapor de água dos filmes estão apresentados na Tabela 5.

Segundo Müller (2007), filmes a base de amido apresentam boas propriedades de barreira a gases, porém possuem alta permeabilidade ao vapor de água devido ao seu caráter altamente hidrofílico. Müller (2007) estudou filmes de

amido de mandioca plastificados com glicerol (0,25 g de glicerol/ g amido) e obteve valores de permeabilidade ao vapor d' água que variaram na ordem de 3,816 ($\text{g}\cdot\text{mm}(\text{m}^2\cdot\text{dia}\cdot\text{kPa})^{-1}$). Estes resultados foram maiores se comparados aos obtidos nesse estudo, comprovando então que a junção de um polímero sintético (PVOH) e ácidos carboxílicos, cítrico e succínico, melhoraram as propriedades de barreira ao vapor de água dos biofilmes produzidos.

Tabela 5- Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de amido- PVOH- glicerol- ácidos carboxílico

PVA ($\text{g}\cdot\text{mm}(\text{m}^2\cdot\text{dia}\cdot\text{kPa})^{-1}$)	Formulação		
	C	AC	AS
	$0,204 \pm 0,030^a$	$0,253 \pm 0,117^a$	$0,231 \pm 0,017^a$

Notas:

C: controle; AC: ácido cítrico; AS: ácido succínico

Média \pm desvio padrão (3 repetições).

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as médias através do Teste de Tukey.

Por outro lado, observa-se na Tabela 5 que os filmes C, AC e AS não apresentaram diferença significativa quanto aos valores de permeabilidade ao vapor d'água ($p \leq 0,05$). No entanto, os resultados de propriedades mecânicas (apresentados na Tabela 6) sugerem que os ácidos utilizados no presente trabalho, não atuaram como agentes reticulantes, entretanto é possível que via reações de esterificação, alguns grupos éster tenham sido enxertados nas cadeias de amido e/ou PVOH, substituindo os grupos hidroxilas (hidrofílicos). O enxerto de moléculas de ácido cítrico ou succínico no amido e/ou PVOH pode ter provocado um afastamento das cadeias poliméricas (afastamento estérico), aumentando os interstícios para a difusão das moléculas de água, o que justificaria o ligeiro aumento dos valores de PVA dos filmes de AC e AS quando comparado ao filme C.

A qualificação de filmes em relação às suas propriedades de barreira ao vapor de água pode ser estabelecida pela comparação com algum material já existente no mercado. Uma forma apresentada por Krochta e Mulder-Johnston (1997) é a definição de faixas de valores que corresponderão a filmes com boas, moderadas ou pobres propriedades de barreira, conforme mostrado na Tabela 6.

Tabela 6- Classificação da permeabilidade ao vapor d'água de filmes
Fonte: KROCHTA E MULDER-JOHNSTON (1997)

Propriedades	K_{vap} (g.mm) m ² . dia.kPa)
Pobre	10-100
Moderada	0,10-10
Boa	0,01-0,10

Notas: 38°C e 90% de URE.

Embora essas definições tenham sido realizadas em condições de temperatura e URE um pouco diferentes das estabelecidas neste trabalho, os filmes de amido- PVOH- ácidos carboxílicos apresentam-se como moderadas barreiras à umidade.

A Figura 12 exemplifica os dados obtidos de ganho de massa na análise de permeabilidade ao vapor d'água realizado nos filmes de amido- PVOH- glicerol (controle) e contendo ácido cítrico e succínico. Como já mencionado acima, o filme AC apresentou um ganho de massa ligeiramente maior se comparado ao filme C e AS, mesmos que não tenham diferido significativamente ($p \geq 0,05$).

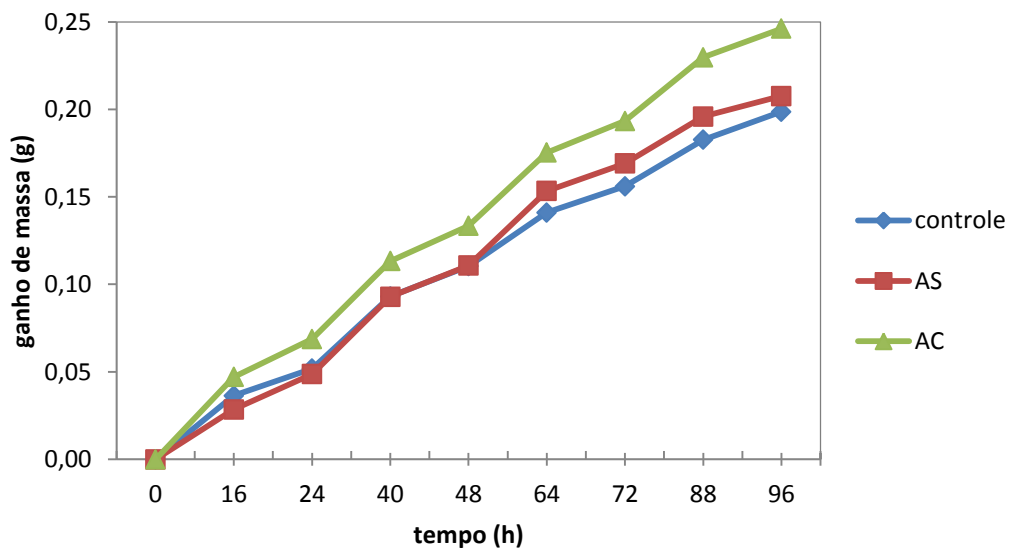


Figura 12- Ganho de massa dos filmes de amido- PVOH- ácidos carboxílicos em função do tempo quando submetidos à permeabilidade ao vapor d'água.

5.1.5 Propriedades mecânicas

As propriedades de tração e alongamento na ruptura e Módulo de Young estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7- Propriedades mecânicas dos filmes de amido- PVOH- glicerol- ácidos carboxílicos

Formulação	Propriedades Mecânicas		
	σ (MPa)	ϵ (%)	E_0 (MPa)
C	25,06 \pm 2,07 ^a	15,91 \pm 2,28 ^a	670,59 \pm 71,39 ^a
AC	16,36 \pm 1,66 ^b	15,22 \pm 2,53 ^a	451,82 \pm 53,07 ^b
AS	17,95 \pm 1,73 ^b	6,37 \pm 1,77 ^b	500,07 \pm 72,29 ^b

Notas:

- (a) C: Controle; AC: ácido cítrico; AS: ácido succínico.
- (b) Concentração de ácidos carboxílicos: 5% (m/m) em relação ao amido.
- (c) σ : tração na ruptura; ϵ : alongamento; E_0 : Módulo de Young.
- (d) Média \pm desvio padrão (3 repetições).
- (e) Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as médias através do Teste de Tukey.

Segundo Garcia et al., (2011), o ácido cítrico modifica a estrutura nativa do amido originando grânulos de amido resistente que tem conformação alterada (formato de *donuts*) conforme observado pela micrografia de fratura apresentada na Figura 13. Os grânulos de amido resistente não gelatinizam e, portanto comprometem a formação de filmes, devido à menor dispersão e a interação entre as cadeias poliméricas, justificando assim a redução nos valores de resistência à tração observada para o filme AC quando comparado ao filme C.

Conforme observado na Tabela 6, os filmes contendo ácidos carboxílicos (AC e AS) não apresentaram diferenças significativas entre si quanto aos valores de tração na ruptura e Módulo de Young.

O ácido succínico (Figura 4) é um ácido dicarboxílico, enquanto que o ácido cítrico (Figura 5) possui uma estrutura tricarboxílica, sugerindo que o efeito hidrolítico do ácido cítrico sobre as cadeias do amido é maior. Assim, mesmo que ainda não significativa ($p \geq 0,05$), os valores de tração na ruptura do filme AC foi menor que a do filme AS.

O filme AC não diferiu significativamente do filme C (controle) quanto aos valores de alongamento na ruptura, entretanto a presença do ácido cítrico produziu filmes com flexibilidade significativamente maior quando comparado ao filme AS.

De acordo com Sreedhar et al., (2005) as propriedades mecânicas não estão apenas relacionadas com o teor de reticulação, mas também com o teor de plastificação. Como já observado por outros autores, a estrutura multifuncional do ácido cítrico (três grupos carboxílicos e um grupo hidroxila) sugere que este ácido pode atuar com diferentes funções dependendo da concentração em que é utilizado: (1) plastificante externo e interno (monoéster), (2) agente de ligação cruzada (diéster) e (3) agente hidrolítico (SHI et al., 2008; GARCIA et al., 2011) Este fato possivelmente explica a diferença, mesmo não significativa ($p \geq 0,05$), dos valores obtidos na tração a ruptura para os filmes produzidos com ácido cítrico e ácido succínico, pois aquele pode ter atuado majoritariamente como plastificante reduzindo a tração a ruptura e aumentando o alongamento do filme. Sreedhar et al., (2005) relata que o agente de reticulação e o plastificante atua de forma contrária sobre as propriedades de tração, ou seja, em geral o aumento do teor de plastificação sugere uma maior flexibilidade ao filme, reduzindo a tração necessária para o rompimento do mesmo.

Segundo Reddy e Yang (2010), concentrações inferiores a 5% (m/m) de AC é insuficiente para formação de ligações cruzadas, enquanto que acima de 5% (m/m) o AC pode atuar como agente plastificante e hidrolítico. Como já mencionado anteriormente, no presente trabalho utilizou-se 5% (m/m) de ácido carboxílico, AC ou AS, em relação ao amido nas diferentes formulações elaboradas.

Conforme sugerido por Shi et al., (2008), o citrato de amido (monoéster) formado pela reação de esterificação entre um grupo hidroxila do amido e um grupo carboxílico do ácido cítrico, permite o enxerto de grupos éster na cadeia de amido, de maneira que os demais grupos carboxílicos bem como o grupo hidroxila presente no ácido possa exercer efeito de plastificante interno. Shi et al., (2008) estudaram diferentes comportamentos de filmes de amido: PVOH e AC, em concentrações distintas observaram que com o aumento da concentração de AC na formulação houve uma redução na tração a ruptura, no entanto, a adição de 5% de AC aos filmes de amido de milho aumentou a tração em 23% em relação ao controle. Contudo, mesmo com a diminuição na ruptura, o alongamento aumentou consideravelmente devido o efeito plastificante que o AC desempenhou (93%). Vale

ressaltar também que Shi et al., (2008) utilizou uma proporção de 1:3 (amido:PVOH) em seu estudo e produziu os filmes com blendas de 4 horas (amido-PVOH) diferindo do trabalho em questão, que empregou a proporção 1:1, reduzindo a utilização do polímero sintético- PVOH e tempo de blenda de 2 horas, aperfeiçoando o processo, como já mencionado anteriormente.

De maneira análoga, porém com menor intensidade uma vez que apenas um terminal carboxílico estaria disponível, o succinato de amido possivelmente formado no filme AS, deveria também exercer a função de plastificantes interno. No entanto, a ação hidrolítica do ácido succínico sobre as cadeias de amido, parece sobressair à sua ação plastificante, o que justifica a redução significativa ($p \leq 0,05$) nos valores de alongamento para o filme AS em relação ao controle e ao filme AC.

As variações nos resultados de propriedades mecânicas é uma incógnita. De acordo com o sugerido por Shi et al., (2008), a reação de esterificação na blenda de amido-PVOH pode ter ocorrido entre o ácido e/ou PVOH. Dentro deste contexto, Garcia et al., (2011) observou que a reação de esterificação também pode ocorrer entre o ácido e o glicerol. E ainda, considerando presença de um grupo hidroxila no ácido cítrico, é possível, porém com menor probabilidade, uma vez que amido e PVOH estão presentes em maior proporção, que duas moléculas de AC possa ter esterificado. Desta maneira, o ácido estaria disponível em menor quantidade para formação de ligações cruzadas com as cadeias poliméricas de amido e/ou PVOH.

Além disso, o tempo de reticulação foi inicialmente testado com AC, contudo, há de se considerar que possivelmente cada um dos ácidos utilizados no presente trabalho possa apresentar um tempo ideal para reticulação que difere do tempo estipulado a partir dos resultados obtidos com AC.

5.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias de fratura dos filmes de amido- PVOH- glicerol- ácidos carboxílicos estão apresentados na Figura 13.

Através das micrografias de fratura é possível observar que o filme controle (Figura 13a) apresentou uma estrutura relativamente compacta e homogênea, indicando que as cadeias poliméricas de amido e PVOH apresentam compatibilidade

química, como já comentado anteriormente, em razão da presença de grupos hidroxilas em ambas as cadeias.

No entanto, conforme destacado na Figura 13(a), a análise de microestrutura do filme C (controle) permite observar a presença de grânulos de amido não rompidos. Embora o processo de gelatinização do amido puro seja rápido, a presença de grânulos de amido não desestruturado sugere que o PVOH possa inibir o processo de intumescimento e desestruturação do grânulo em presença de água e temperatura. Além disso, ainda que o tempo de duas horas tenha se mostrado suficiente para melhores características da blenda de amido-PVOH, deve-se considerar que este estudo preliminar foi realizado na presença do ácido cítrico, que em razão de seu efeito hidrolítico contribui de maneira positiva para a fragmentação e dissolução do grânulo, originando uma estrutura mais homogênea sem a presença de grânulos de amido intactos, conforme observado na Figura 13 (b).

Conforme sugerido por Xie, Liu e Cui (2006) e Garcia et al., (2011), na presença de ácido cítrico, o grânulo de amido sofre uma alteração em sua conformação originando estruturas semelhantes a *donuts* conforme observado também na micrografia de fratura para o filme AC (Figura 13b). Essas estruturas podem ser consideradas como uma evidência da formação de ligações cruzadas.

A formação de uma estrutura mais homogênea para o filme AC (Figura 13b), quando comparado aos filmes C (Figura 13a) e AS (Figura 13c), pode ser justificada pela maior ação hidrolítica do ácido cítrico se comparado ao ácido succínico, possivelmente devido ao fato de que o ácido succínico é um dicarboxílico, enquanto o ácido cítrico é um tricarboxílico, hipótese esta que também pode responder pela presença de grânulos de amido intactos observados nas micrografias de fratura apresentada para o filme AS (Figura 13c). Vale ressaltar também que o estudo do reticulação foi realizado utilizando o AC como base, todavia, há de considerar que possivelmente o tempo ideal de reticulação para o AS pode diferir do tempo estabelecido nos dados obtidos com o AC.

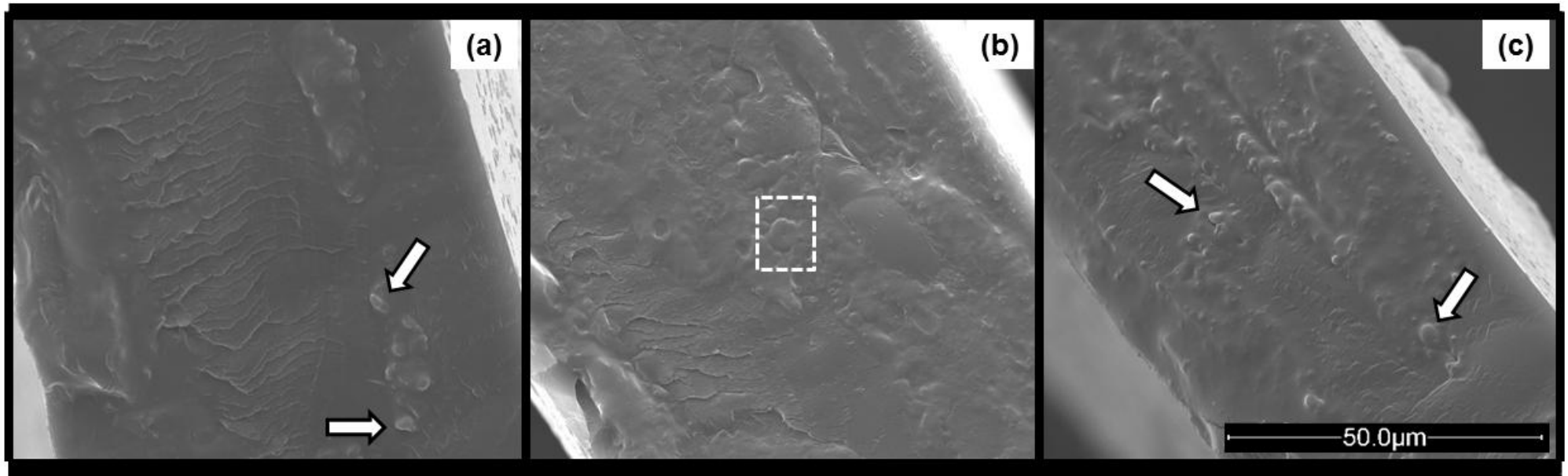


Figura 13- Micrografia de fratura (1600 x) dos filmes: (a) C- controle, (b) AC- ácido cítrico e (c) AS- ácido succínico.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de *casting* mostrou-se eficiente para produção filmes de amido-PVOH- glicerol com ácido cítrico e succínico como agentes esterificantes, formando filmes com boa aparência, estrutura homogênea e baixa solubilidade.

O aumento do teor de amido para produção de filmes com PVOH produz filmes com boa manuseabilidade e flexibilidade, sugerindo que novos estudos sejam feitos no intuito de se aumentar ainda mais a proporção de polímero natural e assim reduzir os custos do produto final.

Embora, pelo Planejamento Fatorial 2^2 completo, o melhor tempo de blenda e de reticulação tenham sido 2 horas e 15 minutos, respectivamente, é possível que quando se refere a ácidos diferentes, o tempo de reticulação em blendas de amido e PVOH também o seja. Também há de se considerar que o modelo de ajuste indicou que o tempo ideal pode ser menor que o escolhido, pois não atingiu o ponto de equilíbrio, sugerindo que o tempo utilizado para produzir os filmes, neste contexto, pode ser novamente aprimorado.

Nos filmes de amido -PVOH- glicerol, os ácidos (cítrico e succínico) parecem atuar majoritariamente como agentes hidrolíticos e plastificantes.

Mais estudos devem ser realizados a fim de elucidar os efeitos dos diferentes ácidos carboxílicos utilizados em filmes de amido e PVOH, entre eles metodologias de caracterização para verificação de formação de ligações éster, como FT-IR e RMN, e análises térmicas para verificação da possibilidade de formação de ligações cruzadas.

REFERÊNCIAS

- AL-HASSAN, A.A. NORZIAH, M.H. Starch-gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. **Food Hydrocolloids**, v. 26, p.108-117, January 2012.
- ASTM. Standard test methods of water vapor transmission of materials. **American Society for Testing and Materials**, Philadelphia, E 96-95, 1995 a.
- ASTM. Tensile properties of thin plastic sheeting. Annual Book of ASTM Standards, **American Society for Testing and Materials**, Philadelphia, D 82, 1995 b.
- AVÉROUS, L., BOQUILLON, N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviors. **Carbohydrates Polymers**. v.56, p.111-122, 2004.
- BENGTSSON, M.; KOCH, K.; GATENHOLM, P. Surface octanoylation of high-amylose potato starch films. **Carbohydrate Polymers**. v. 54, p. 1-11, 2003.
- BONA, J. C. **Preparação e Caracterização de Filmes Biodegradáveis a partir de Blendas de Amido com Polietileno**. 2007. 115f. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Minas Gerais. 2007.
- CANEVAROLO, S. V. **Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. São Paulo: Artibe Editora, 2ªed, 277 p., 2006.
- CRIPA, A. **Estudo do desempenho de filmes multicamadas em embalagens termoformadas**. 2006. 151f. Dissertação (Programa de pós Graduação em Engenharia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- DONHOWE, I.G., FENNEMA, O.R. **Edible Films and Coatings: Characteristics, Formation, Definitions, and Testing Methods**. LNC, Lancaster, PY, USA, p.1-24, 1993.
- ERMOLOVICH, O.A.; MAKAYERICH, A. V. Effect Compatibilizer additives on the technological and performance characteristics of biodegradable materials based on starch-filled polyethylene. **Russian Journal of Applied Chemistry**. v. 79, n. 9, p.1526-1537, 2006.
- FINCH, C. A. **Poly Vinyl Alcohol, Developments**. New York: John-Wiley, 850 p., 1992.

GARCIA, P.S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F.; MALI, S.; DALL'ANTONIA, L. H.; BARRETO, W. Citric Acid as multifunctional agent in blowing films of starch/PBAT. **Química Nova**. v.34, p. 1507-1510, 2011.

GARCIA, V.; COLONNA, P.; BUOCHET, B. & GALLART, D.J. **Structural changes of cassava starch granules alter heating at Intermediate water contents**. *Starch/Stärkes*, v. 48, p. 171-179, 1997.

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

GUILBERT, S. Technology and application of edible protective films. **In Food Packaging and Preservation**. Elsevier Applied Science Publishers, Ltd, New York, p. 371-394, 1986.

HERMANSSON, A-M.; SVEGMARK, K. Developments in the understanding of starch functionality (Review). **Trends in Food Science & Technology**. v. 7, p. 345-353, 1996.

JIANG, H. J. CAMPBELL, G., BOUGHNER, D., WAN, W. K., & QUANTZ, M. Design and manufacture of a polyvinyl alcohol (PVA) cryogel tri-leaflet heart valve prosthesis. **Medical Engineering and Physics**, 26, 269–277, 2004.

KIM, K. W. KO, C. J. PARK, H. J. Mechanical properties, water vapor permeability and solubilities of highly carboxymethylated starch-based edible films. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 218-222, 2002.

KROCHTA, J. M. MULDER-JOHNSTON, C. D. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities, **Food Technology**. v. 51, p. 61-73, 1997.

LAVINA, M. L. **Estimativa da disponibilidade de bagaço de mandioca – resíduo da extração de fécula e polvilho na região Sul Catarinense**. Santa Catarina, 1993. (mimeog.)

LI, R.; ZHANG, L.; XU, M. Novel regenerated cellulose films prepared by coagulating with water: Structure and properties. **Carbohydrate Polymer**. v. 86, p.-95-100, 2012.

LUO, F; HUANG, Q.; FU, X.; ZHANG, L; YU, S-j. Preparation and characterization of cross linked waxy potato starch, **Food Chemistry**. v. 115. p. 563-568, 2009.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. **Journal of Food Engineering**. v. 75. p. 453-460. 2006.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. **Carbohydrate Polymers**. v.56, p.129-135, 2004.

MARTEN, F. L. **Vinyl alcohol polymers**. In: Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. New York: John Wiley, v.17, p. 167-198, 1985.

McHUGH, T. H., KROCHTA, J. M. Milk-protein-based edible films and coating. **Food Technology**. v. 48, n. 1, p. 97-103, 1994.

MÜLLER, C. M. O. **Estudo dos processos de transferência de massa e propriedades mecânicas de biofilmes de amido de mandioca reforçados com fibras de celulose**. Londrina: Doutorado em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, 168p, 2007.

NAKAYAMA, Y., TAKATSUKA, M., & MATSUDA, T. **Surface hydrogelation using photolysis of dithiocarbamate or xanthate: Hydrogelation, surface fixation, and bioactive substance immobilization**. Langmuir. 15, 1667–1672, 1999.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como modelar misturas**. In: Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas, SP: Editora da UNICAMP. Cap. 7, p. 301-348, 2003.

NING, W.; JIUGAO, Y.; XIAOFEI, M.; YING, W. The influence of citric acid on the properties of thermoplastic starch/linear low-density polyethylene blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 446-453, 2007.

OLIVATO, J. B.; GROSSMANN, M. V. E.; BILCK A. P.; YAMASHITA, F. Effect of organic acids as additive on the performance of thermoplastic starch/polyester blown films. **Carbohydrate Polymer**. v. 90, p- 159-164, 2012.

RAQUEZ, J-M.; NABAR, Y.; SRINIVASAN, M.; SHIN, B-Y; NARAYAN, R.; DUBOIS, P. Maleated thermoplastic starch by extrusion reactive. **Carbohydrate Polymers**. p.1-11, 2008.

REDDY, N.; YANG, Y. Citric acid cross-linking of starch films. **Food Chemistry**. v. 118, p. 702-711, 2010.

RHIM, J. W. **Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films**. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology*. v. 37, p. 323-330, 2004.

RHIM, J. W.; GENNADIOS, A.; WELLER, C. L., HANNA, M. A. **Sodium dodecyl sulfate treatment improves properties of cast films from soy protein isolate**. *Industrial Crops and Products*. v.15, n. 2, p.199-205, 2002.

RIGO, L. N. **Desenvolvimento e Caracterização de Filmes Comestíveis**. 2006. 130p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões – Erechim. 2006.

RODRIGUEZ, P.; SAN MARTIN, M.E. & DE LA CRUZ, G.G. **Calorimetria diferencial de barrido y rayos-x del almidón obtenido por nixtamalización fraccionada**. *Superficies y Vacío*. v.13, p.61-65, 2001.

SAILAJA, R. R. N.; SEETHARAMU. Itaconic acid – grafted – LDPE as compatibilizer for LDPE – plasticized Tapioca starch blends, **Reactive & Functional Polymers**. v. 68, p. 831-841, 2008.

SARON, E.S., **Embalagem e segurança alimentar. Publicações Técnicas**. CETEA / ITAL, ADI 370, 1998.

SHEREVE, R. N.; BRINK, J.A. **Indústrias de Processos Químicos**. Editora Guanabara Koogan. Edição 4. Rio de Janeiro, 1997.

SHI, R.; BI, J.; ZHANG, Z.; ZHU, A.; CHEN, D.; ZHOU, X.; ZHANG, L.; TIAN, W. The effect of citric acid on the structural properties and cytotoxicity of polyvinyl alcohol/starch films when molding at high temperature, **Carbohydrate Polymers**. v.74, p. 763-770, 2008.

SHI, R.; ZHANG, Z.; LIU, Q.; HAN, Y.; ZHANG, L.; CHEN, D.; TIAN, W. Characterization of citric acid/glycerol co-plasticized thermoplastic starch prepared by melt blending. **Carbohydrate Polymers**. v. 69, p. 748-755, 2007.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.. **Química Orgânica**. 9 ed., Rio de Janeiro: LTC Editora, 2008, v.2.

SREEDHAR, B.; SAIRAM, M., CHATTOPADHYAY, D. K., SYAMALA RATHNAM, P. A.; & MOHAN RAO, D. V. Thermal, mechanical, and surface characterization of

starchpoly(vinyl alcohol) blends and borax-crosslinked films. **Journal of Applied Polymer Science**. 96, 1313–1322, 2005.

SRINIVASA , P.C. RAMESH.; M.N.; THARANATHAN, R.N. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. **Food Hydrocolloids**. v.21, p.1113-1122, 2006.

THUNWALL, M.; KUTHANOVÁ, V.; BOLDIZAR, A.; RIGDAHL, M.. Film blowing of thermoplastic starch. **Carbohydrate Polymers**. v. 71, p. 583-590, 2008

TURBIANI, F. R. B. **Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis de sericina e PVA reticulados com dimetiloluréia**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química, Janeiro,2011.

VAN SOEST, J.J.G. & VLIEGENTHART, J.F.G. Crystallinity in starch plastics: consequence for material properties. **Trends in Biotechnology**. v.15, p.208-213, 1997.

VICENTINI, N.M. **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fábula de mandioca para uso em pós-colheita**.Tese de Doutorado em Agronomia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2003.

WAN, W. K., CAMPBELL, G., ZHANG, Z. F., HUI, A. J., & BOUGHNER, D. R. Optimizing the tensile properties of poly(vinyl alcohol) hydrogel for the of a bioprosthesis heart valve stent. **Journal of Biomedical Material Research**, 63, 854. 2002.

WU, J. H., WANG, Z., XU, S.Y. Preparation and characterization of sericin powder extracted from silk industry wastewater. **Food Chemistry**. v. 103, p.1255–1262, 2007.

XIE, X. S.; LIU, Q.; CUI, S. W. Studies on the granular structure of resistant starches (type 4) from normal, high amylose and waxy corn starch citrates. **Food Research International**. v. 39, p. 332–341, 2006.

ZHANG, Y. Q., TAO, M. L., SHEN, W. D., MAO, J. P., CHEN, Y. Synthesis of silk sericin peptides-L-asparaginase bioconjugates and their characterization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 81, p. 136-145, 2006.