

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



FACOLTÁ DI INGEGNERIA

Dipartimento di Ingegneria dei Materiali e della Produzione

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA
IN
INGEGNERIA DEI MATERIALI
(XXI CICLO)

***Film biodegradabili a base di polimeri naturali
e sintetici per imballaggi alimentari***

Coordinatore:
Ch.mo Prof. D. Acierno

Relatore:
Prof. S. Iannace

Co-Relatore:
Prof. E. Di Maio

Candidata:
Maria Oliviero

INDICE

Prefazione	Pag.VIII
-------------------	----------

Parte I – Innovazione nei materiali

Capitolo 1 – Introduzione	Pag.1
----------------------------------	-------

Capitolo 2 – La Zeina

2.1 – Il mais	Pag.5
2.2 – Le proteine vegetali del mais	Pag.8
2.3 – La zeina: composizione e struttura	Pag.9
2.3.1 – <i>Proprietà chimiche e fisiche</i>	Pag.13
2.3.2 – <i>Proprietà termiche</i>	Pag.14
2.3.3 – <i>Plasticizzanti per la zeina</i>	Pag.18
2.4 – Estrazione della zeina	Pag.20
2.4.1 – <i>Solventi primari</i>	Pag.20
2.4.2 – <i>Solventi secondari</i>	Pag.23
2.4.3 – <i>Solventi ternari</i>	Pag.25
2.4.4 – <i>Altri solventi</i>	Pag.25

2.4.5 – <i>Gelificazione</i>	Pag.26
2.5 – Processi di estrazione	Pag.27
2.5.1 – <i>CPC process</i>	Pag.30
2.5.2 – <i>Nutrile process</i>	Pag.31
2.5.3 – <i>Zeina commerciale</i>	Pag.31

Capitolo 3 – Denaturazione delle proteine naturali per applicazioni industriali

3.1 – Le proteine naturali	Pag.33
3.2 – La struttura delle proteine naturali	Pag.38
3.3 – Proteine per applicazioni industriali	Pag.44
3.4 – Denaturazione delle proteine	Pag.46
3.4.1 – <i>La temperatura di transizione vetrosa</i>	Pag.49
3.4.2 – <i>Mobilità molecolare e denaturazione</i>	Pag.51

Capitolo 4 – Metodi classici e nuove tecnologie di processo per la formazione di film a base di proteine

4.1 – Capacità delle proteine vegetali di formare film	Pag.53
4.2 – Plasticizzanti	Pag.55
4.2.1 – <i>Meccanismo di plasticizzazione</i>	Pag.56

4.2.1.1 – <i>Teoria della lubrificazione</i>	Pag.56
4.2.1.2 – <i>Teoria del gel</i>	Pag.57
4.2.1.3 – <i>Teoria del volume libero</i>	Pag.58
4.3 – Processi di formazione di film a base di Proteine	Pag.60
4.3.1 – <i>Cast film</i>	Pag.63
4.3.2 – <i>Resin film</i>	Pag.64
4.4 – Preparazione di film di zeina	Pag.64
4.5 – Nuove tecnologie	Pag.71
4.6 – Obiettivo parte I	Pag.76

Capitolo 5 – Materiali e Metodi

5.1 – Materiali	Pag.78
5.2 – Termoplasticizzazione in miscelatore (TPZm)	Pag.79
5.3 – Analisi termiche	Pag.80
5.4 – Analisi Dinamico-Meccanica	Pag.80
5.5 – Diffrazione ai raggi X	Pag.81
5.6 – Spettroscopia FTIR	Pag.81
5.7 – Analisi elettroforetica SDS-Page	Pag.82
5.8 – Misure reologiche	Pag.82
5.9 – Filmatura in bolla di materiali a base di zeina termoplastica (TPZe)	Pag.84

5.10 – Caratterizzazione dei film-test meccanici	Pag.86
--	--------

Capitolo 6 – Analisi dei risultati e conclusioni

6.1 – Termoplastcizzazione (TPZm)	Pag.87
6.2 – Proprietà termiche	Pag.90
6.3 – Diffrazione ai raggi X	Pag.92
6.4 – Analisi spettroscopica FT-IR	Pag.95
6.5 – Analisi elettroforetica SDS-Page	Pag.98
6.6 – Proprietà reologiche elongazionali	Pag.99
6.7 – Haul off force	Pag.103
6.8 – Filmatura in bolla	Pag.104
6.9 – Proprietà meccaniche dei film di zeina termoplastica (TPZe)	Pag.107
6.10 – Conclusioni	Pag.109

Bibliografia – Parte I	Pag.111
-------------------------------	---------

Parte II – Nuovi “sistemi da imballaggio”

Capitolo 1 – Multistrato biodegradabile a base di zeina termoplastica

1.1 – Introduzione	Pag.118
1.2 – Materiali	Pag.121
1.3 – Procedura di preparazione dei materiali costituenti il multistrato	Pag.123
1.4 – Procedura di realizzazione del multistrato	Pag.124
1.5 – Prove di adesione	Pag.126
1.6 – Caratteristiche meccaniche del multistrato	Pag.129
1.7 – Proprietà di trasporto	Pag.130
1.8 – Bagnabilità	Pag.140
1.9 – Conclusioni	Pag.144

Capitolo 2 – Film “attivi” a base di zeina termoplastica

2.1 – Introduzione	Pag.145
2.2 – Materiali	Pag.150
2.3 – Procedura di preparazione del film attivo	Pag.152
2.4 – Prove di rilascio	Pag.153
2.4.1 – <i>Determinazione del lisozima rilasciato</i>	Pag.153

**Parte III – Nuove tecnologie di
sterilizzazione/pastorizzazione**

**Capitolo 1 – Effetto del trattamento ad alta pressione
sul multistrato a base di zeina
termoplastica**

1.1 – Introduzione	Pag.159
1.2 – Il processo di sterilizzazione ad alta pressione	Pag.160
1.2.1 – <i>Le innovazioni e i vantaggi del HPP</i>	Pag.162
1.2.2 – <i>La tecnologia del HPP ed i principi di funzionamento</i>	Pag.164
1.2.3 – <i>Il trattamento ad alta pressione sui materiali polimerici</i>	Pag.167
1.2.4 – <i>Effetti collaterali del trattamento ad alta pressione</i>	Pag.169
1.2.5 – <i>Riflessioni generali sul trattamento ad alta pressione</i>	Pag.170
1.3 – Finalità della parte III dello studio di tesi	Pag.171
1.4 – Materiali e Metodi	Pag.171
1.5 – Risultati e discussione	Pag.173
1.5 – Conclusioni	Pag.180

Lista Tabelle

Pag.182

Lista Figure

Pag.185

Prefazione

All'inizio del XX secolo molti prodotti industriali come inchiostri, tinture, vernici, medicinali, composti chimici, vestiti, fibre e anche le plastiche erano ricavati da risorse biologiche. Poi, negli anni '70, i derivati del petrolio conobbero un incredibile boom e di fatto si sostituirono ai materiali naturali e diventarono le incontrastate materie prime per tutte le varie tipologie di prodotti. Ora, all'inizio del XXI secolo, i recenti sviluppi, soprattutto in tema di inquinamento, hanno riportato in auge la convinzione che le risorse naturali siano la soluzione migliore come materie prime per la produzione industriale. Negli ultimi anni, scienziati ed ingegneri hanno sviluppato con successo procedimenti e tecnologie che abbassano i costi di produzione e, allo stesso tempo, ottimizzano le performance dei prodotti basati su fonti rinnovabili. Parallelamente, le numerose problematiche ambientali non hanno fatto altro che intensificare l'attenzione sulle risorse agricole, forestali e animali come possibili materie prime alternative. La crescita dell'industria dei prodotti ricavati da fonti rinnovabili e naturali è strettamente legata alla creazione di nuovi mercati, alla riduzione dei costi di produzione e al miglioramento delle performance, in modo da risultare competitiva e conveniente nei confronti dei materiali convenzionali derivati da petrolio. Attualmente il mercato più vasto e promettente per questa tipologia di prodotti è quello dell'imballaggio alimentare, un'area che consentirebbe una forte espansione, ma che è anche molto competitiva, con precise richieste in termini di performance e costi. Oggi i materiali utilizzati per l'imballaggio alimentare sono vetro, metallo, carta, cartone e una grande varietà di polimeri plastici derivati dal petrolio. Con l'eccezione della carta e del cartone si tratta, dunque, di materie prime non rinnovabili destinate all'esaurimento (infatti, sebbene alcune possano essere rigenerate, per la legislazione alimentare non possono essere riutilizzate). Lo sviluppo di materiali plastici a partire da fonti rinnovabili, i "BIOPOLIMERI" permetterebbe di evitare tale problema,

con l'ulteriore vantaggio che questi materiali sono biodegradabili. Biopolimeri per l'imballaggio alimentare possono essere direttamente ricavati da materiali biologici o da microrganismi, oppure possono essere ottenuti per sintesi chimica classica a partire da monomeri rinnovabili. Ad oggi, i bio-polimeri biodegradabili più importanti sono, l'acido polilattico (PLA), il poli(idrossi alcanato) ed il poli(idrossi butirato). Il loro elevato costo di produzione ne limita però l'utilizzo quasi esclusivamente a campi ad alto valore aggiunto quali il campo medico (per esempio nella preparazione di fili di sutura) e quello farmaceutico (rilascio controllato di farmaci). Nel settore degli imballaggi alimentari, dove sono invece richieste grosse quantità a basso prezzo, può essere conveniente l'uso di biopolimeri biodegradabili derivanti da risorse rinnovabili più economiche, quali ad esempio i prodotti agricoli, in grado anche di tutelare le proprietà organolettiche e non modificare le proprietà strutturali dell'alimento stesso. È in questo contesto che nasce, nel 2006, il progetto di ricerca europeo NOVELO (Novel Processing Methods for the Production and Distribution of High-Quality and Safe Foods; <http://www.novelq.org>) il cui scopo è quello di sperimentare una nuova soluzione al problema del confezionamento, che faccia uso sia di nuovi materiali da imballaggio che di nuove tecnologie di sterilizzazione/pastorizzazione, per migliorare la qualità e la durata a magazzino (*shelf life*) di differenti prodotti alimentari. Da tale ricerca si è articolato un progetto di tesi che ha avuto come obiettivi:

I- Studio di nuovi materiali di origine naturale da utilizzare come imballaggi alimentari.

II- Realizzazione di nuovi "sistemi da imballaggio", come strutture multistrato e film attivi.

III- Sperimentazione di nuove tecnologie di pastorizzazione ad alta pressione sull'imballaggio realizzato.

Parte I

Innovazione nei
materiali

Introduzione

Progettare e realizzare un materiale per l'imballaggio alimentare è un processo che prevede molte fasi e presuppone attente e numerose considerazioni di vario tipo, al fine di realizzare un imballaggio con tutte le proprietà richieste. Le proprietà da considerare, in relazione alla distribuzione alimentare, sono numerose e possono includere permeabilità a gas e vapore acqueo, proprietà meccaniche e termiche, processabilità, trasparenza, possibilità di essere termoformati e stampati, resistenza ad acqua, grassi, acidi e luce, disponibilità e, ovviamente, costi. Importante oggi è anche la biodegradabilità; da qui la scelta di utilizzare un materiale biologico e rinnovabile (BIOPOLIMERO). Attualmente si trovano pochi esempi di biopolimeri usati per la produzione di imballaggi primari (imballaggi direttamente a contatto con gli alimenti) e questo è dovuto al fatto che gli studi su tali applicazioni sono ancora ai primi stadi, e che comunque i

risultati rimangono confidenziali a causa della competitività sul mercato.

I polimeri derivanti da fonti rinnovabili (biopolimeri) possono essere divisi in tre categorie principali basate sulla loro origine e sulla loro produzione [1]:

1. Polimeri direttamente estratti da materiale naturale (principalmente piante). Fanno parte di questa categoria i polisaccaridi come amido e cellulosa, e le proteine come caseina, glutine e zeina.

2. Polimeri prodotti tramite sintesi chimica "classica" usando monomeri biologici e rinnovabili.

Un ottimo esempio è l'acido polilattico, un biopoliestere polimerizzato a partire da monomeri di acido lattico. I monomeri a loro volta possono essere prodotti dalla fermentazione di carboidrati contenuti nelle derrate alimentari.

3. Polimeri prodotti da microrganismi o batteri geneticamente modificati. Un esempio è il poliidrossialcanoato.

Le tre categorie sono rappresentate schematicamente nella figura 1.1

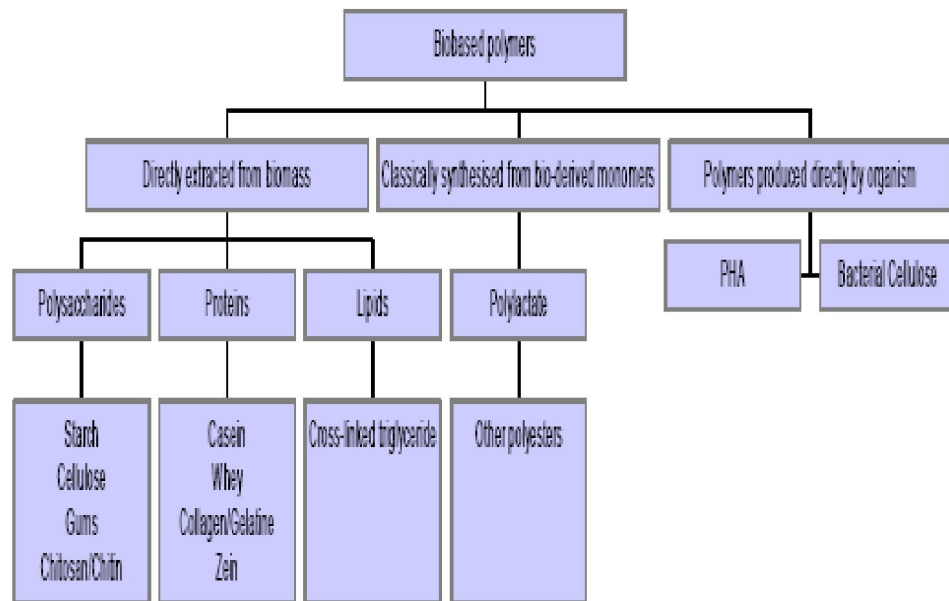


Figura 1.1 Presentazione schematica dei biopolimeri a seconda dell'origine [2].

Materiali appartenenti a tutte e tre le categorie sono già stati utilizzati per gli imballaggi o sono comunque stati presi in considerazione. Malgrado ciò il campo dell'imballaggio è tutt'ora dominato da polimeri derivanti dal petrolio come il polietilene (PE) e il polistirene (PS), nonostante i problemi ambientali connessi con l'uso di materiali non rinnovabili. I problemi associati con i biopolimeri sono triplici: performance, processabilità e costi. Anche se questi fattori sono in qualche modo collegati, i problemi dovuti a performance e processabilità sono più pronunciati con i polimeri estratti direttamente dalle biomasse. Al contrario, i polimeri appartenenti alle categorie 2 e 3 sopra citate generalmente presentano ottime performance e possono essere trasformati in film usando le normali tecniche già usate per i materiali convenzionali. Tendono invece ad essere più costosi se

paragonati ai materiali sintetici (a parità di performance e processabilità). Nel settore degli imballaggi alimentari, dove molto importante sono i costi, si è scelto di utilizzare come materiale innovativo, un polimero estratto direttamente da una biomassa una proteina. Diverse proteine, sia di origine vegetale che animale, sono state utilizzate da diversi gruppi di ricerca nella preparazione di film. Esempi sono il glutine di frumento, il collagene, le proteine del siero del latte, etc. [3]. I film a base di proteine hanno, generalmente, proprietà meccaniche e di barriera al vapor d'acqua più scadenti rispetto ai film sintetici [4-5]. Sono però efficienti barriere per i gas, oli e grassi; possono pertanto essere utilizzati in numerosi sistemi alimentari per minimizzare il deterioramento dei cibi e quindi estenderne la loro shelf life. Abbiamo scelto, in particolare, una proteina vegetale estratta dal mais, la zeina, in quanto risulta unica in termini di termoplasticità e idrofobicità. La sua natura relativamente idrofobica è legata al suo elevato contenuto di amminoacidi non polari [6-7] che le conferiscono proprietà di barriera al vapor d'acqua superiori rispetto ad altre proteine come la caseina o a polisaccaridi come l'amido [8] e pertanto la rendono interessante per la produzione di film per imballaggio alimentare.

La zeina

Dato il ruolo di protagonista che assume in questo lavoro di tesi, questo capitolo vuole presentare una descrizione dettagliata della zeina. In particolare di essa si è analizzata la composizione e struttura, le proprietà chimico-fisiche e termiche principali e le sue eventuali applicazioni in campo industriale.

2.1 – Il mais

Il mais (Figura 2.1) è il cereale più diffuso al mondo; basti pensare che la sua produzione annua si aggira intorno ai 560 milioni di tonnellate quasi interamente prodotte dall'America, paese d'origine del cereale [9]. La sua diffusione è legata principalmente alla sua capacità di crescere in condizioni climatiche miti.



Figura 2.1: Piantagione di mais.

Si tratta, però, come vedremo tra poco, di un cereale con un basso contenuto proteico e ricco d'amido; inoltre le sue proteine lo rendono poco adatto alla panificazione pertanto esso viene utilizzato principalmente come cibo per animali, come ingrediente alimentare e come prodotto industriale.

Generalmente esso viene processato attraverso quattro metodi:

1. Dry Milling
2. Alkaline Processing
3. Wet Milling
4. Dry Grind Process.

I prodotti dei primi due si utilizzano per uso umano; i prodotti principali del Wet Milling sono amido ed olio, mentre il prodotto principale del Dry Grind Process è l'etanolo (Figura 2.2).

I coprodotti del Wet Milling sono *corn gluten meal* (CGM) e *corn gluten feed* (CGF); i coprodotti del Dry Grind Process sono *distillers dried grains* (DDG) oppure *DDG con solventi* (DDGS).

Negli USA il CGM è utilizzato soprattutto come cibo per animali essendo una materia prima disponibile a costi contenuti ($\approx \$120-240/\text{ton}$) [9]

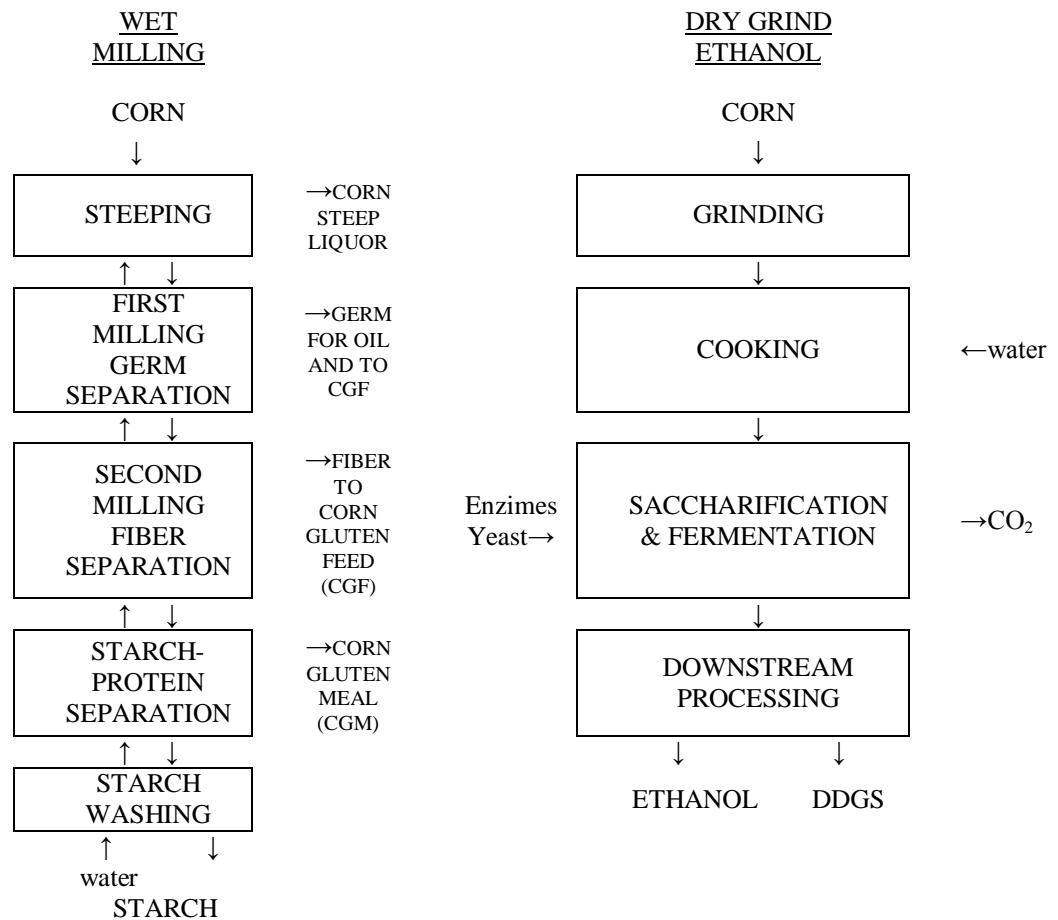


Figura 2.2: Schemi dei processi Wet Milling e Dry Grind Ethanol [9].

2.2 – Le proteine vegetali nel mais

Il mais ha un contenuto di proteine che va dal 7 all'11% [10].

Circa il 75% delle proteine si trova nel tessuto endospermico; la restante parte si trova nel germe che insieme all'endosperma rappresentano le parti principali del chicco del mais (Figura 2.3).

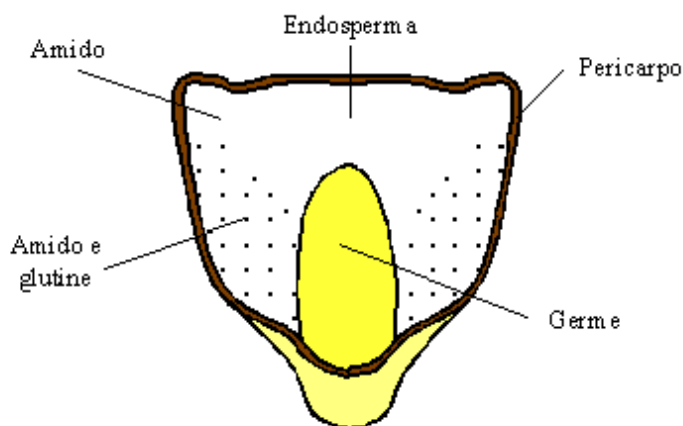


Figura 2.3: Sezione di un chicco di mais e localizzazione dei composti principali [9].

La distribuzione dei maggiori componenti nel mais è rappresentata in Tabella 2.1:

Componenti	Peso % totale nel chicco	Peso % su base secca		
		Endosperma	Germe	Pericarpo
Amido	62.0	87.0	8.3	7.3
Proteine	7.8	8.0	18.4	3.7
Olio	3.8	0.8	33.2	1.0
Altro	11.4	4.2	40.1	88.0
Acqua	15.0	----	----	----

Tabella 2.1: Distribuzione tipica dei componenti principali nel mais [9].

Una classificazione delle proteine vegetali, basata sulla loro solubilità, si deve ad Osborne [11]. Egli le separò in albumine (solubili in acqua), globuline (solubili in soluzioni saline),

prolammine (solubili in soluzione alcoliche) e gluteine (solubili in soluzioni alcaline e acide). Globuline e prolammine, in particolare, risultano insolubili nei solventi convenzionali; nel caso delle prolammine tale insolubilità è da attribuire alla formazione di polimeri di alto peso molecolare, stabilizzati da ponti disolfuro tra le catene. La Tabella 2.2 presenta la distribuzione delle quattro principali classi di proteine nel mais.

Proteine	Solubilità	Peso % totale nel chicco	Endosperma	Germe
Albumina	Acqua	8.0	4.0	30.0
Globulina	Sol. saline	9.0	4.0	30.0
Gluteina	Sol. alcaline	40.0	39.0	25.0
Zeina	Alcool	39.0	47.0	5.0

Tabella 2.2: Distribuzione delle proteine principali nel mais [9].

Tale composizione può cambiare a seconda della varietà di cereali e del metodo di separazione usato.

2.3 – La zeina: composizione e struttura

La frazione prolamminica del mais è nota come zeina.

Nel chicco di mais la zeina è localizzata in particelle di circa 1 μm , distribuite uniformemente nel citoplasma delle celle endospermiche tra granuli di amido di 5-35 μm .

Essa è particolarmente ricca di acido glutammico, leucina, prolina ed alanina (Tabella 2.3).

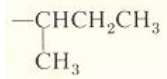
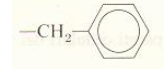
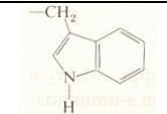
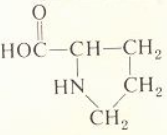
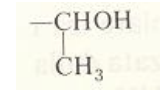
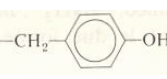
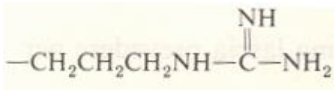
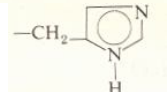
Classe	Amminoacido	Moli/10 ⁵ g	Gruppo R
Apolare (R è un gruppo non carico)	Glicina	17.0	-H
	Glutamina	---	-CH ₂ CH ₂ CONH ₂
	Alanina	110.0	-CH ₃
	Valina	31.0	-CH(CH ₃) ₂
	Leucina	151.0	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂
	Isoleucina	31.0	
	Fenilalanina	43.0	
	Triptofano	---	
	Prolina	94.0	 (struttura completa)
-OH	Serina	52.0	-CH ₂ OH
	Treonina	24.0	
	Tirosina	31.0	
-S	Metionina	10.0	-CH ₂ CH ₂ SCH ₃
	Cisteina	---	-CH ₂ SH
Basica (R contiene un gruppo amminico)	Lisina	1.0	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂
	Arginina	10.0	
	Istidina	8.0	
Acida	Acido aspartico	41.0	-CH ₂ COOH
	Acido glutammico	166.0	-CH ₂ CH ₂ COOH

Tabella 2.3: Composizione in amminoacidi della zeina (il gruppo -R si riferisce alla struttura tipica di un L-amminoacido) [12].

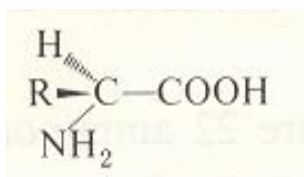


Figura 2.4: un L-amminoacido.

L'elevato contenuto di amminoacidi non polari e la carenza di amminoacidi basici ed acidi sono responsabili dell'insolubilità della zeina in acqua se non in presenza di alcool, alte concentrazioni di urea, alte concentrazioni alcaline (pH >11) o detergenti anionici; infatti in loro assenza i gruppi laterali idrofobi tenderebbero ad associarsi impedendo la dissoluzione della proteina [10].

La zeina è anche ricca di glutamina, l'amide derivante dall'acido glutammico: il gruppo terminale polare insaturo della glutamina promuove l'associazione delle proteine attraverso legami idrogeno e contribuisce alla loro solubilità in acqua [10]-[13].

Le proprietà idrofobe della zeina dipendono inoltre dalla lunghezza dei peptidi: peptidi di peso molecolare minore presentano minore idrofobicità per il minore contenuto di amminoacidi non polari.

Per la zeina è stata proposta una struttura caratterizzata da molecole aventi due distinte regioni: una regione idrofobica che riguarda la porzione idrocarburica che domina un'estremità della molecola di zeina e una regione leggermente polare risultante dalla presenza di gruppi idrossilici e chetonici. Questa duplice natura spiegherebbe l'affinità della zeina per solventi di natura simile come l'etanolo.

Biologicamente la zeina è una miscela di proteine che differiscono in dimensioni molecolari e solubilità.

La letteratura più datata divide le zeine, in base alla loro solubilità differenziale e struttura relativa, in due sole classi: α -zeina e β -zeina [14]-[15].

L' α -zeina costituisce circa l'80% della zeina ed è solubile in etanolo acquoso al 95% o isopropanolo acquoso all'85%; essa consiste in monomeri e una serie di oligomeri di vario peso molecolare collegati da ponti disolfuro.

La β -zeina costituisce il restante 20%, risulta solubile in etanolo acquoso al 60% [16] e consiste in oligomeri di più alto peso molecolare [17].

Studi più recenti hanno consentito una classificazione più ampia in quattro tipi distinti: α , β , γ e δ -zeina [18].

In accordo con tale nomenclatura, l' α -zeina ammonta al 75-85% della zeina totale ed è costituita da polipeptidi di massa molecolare relativa (M_r) 21'000-25'000 e polipeptidi minori di M_r pari a 10'000; essa è ricca di glutammine, proline e amminoacidi non polari (leucina e alanina).

La β -zeina costituisce il 10-15% della zeina totale ed include polipeptidi ricchi in metionina e cisteina, di M_r pari a 17'000-18'000. Tale zeina è relativamente instabile, precipita e coagula facilmente. Pomes [15] ha suggerito che la β -zeina potrebbe essere una proteina di alto peso molecolare formata da molecole di α -zeina legate da ponti disolfuro; a differenza dell' α -zeina, però, non contiene sequenze ripetitive.

La γ -zeina comprende polipeptidi ricchi in prolina, glutammina e amminoacidi non polari, di M_r pari a 27'000 e costituenti il 5-10% della zeina totale.

Infine la δ -zeina contiene componenti minori di M_r 10'000 e 18'000; non sembra contenere sequenze ripetitive di amminoacidi ma ha una composizione simile alla β -zeina. E' il gruppo più ricco in metionina.

Nel 1982 Argos [19] ha proposto un modello strutturale per la zeina basato su 9 sequenze omologhe di 20 amminoacidi che si ripetono a blocchi. Le unità ripetitive, a forma di α -elica, sono arrangiate in capsule in maniera antiparallela; le parti estreme di tali capsule contengono sequenze ripetitive di glutamine che, grazie alla formazione di ponti idrogeno, garantiscono la stabilizzazione della struttura (Figura 2.5).

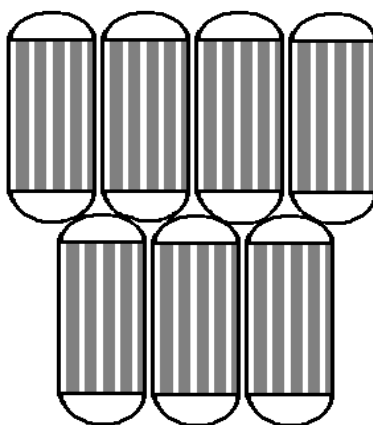


Figura 2.5: Struttura della zeina. Le zone grigie rappresentano le α -eliche e le estremità curve i ponti idrogeno delle glutamine [20].

2.3.1 – Proprietà chimiche e fisiche

La zeina pura è incolore e inodore, anche se quella disponibile in commercio è solitamente di colore giallo paglia con sapore dolce e con una percentuale di solidi non proteici e di oli minori del 2%.

Le principali proprietà chimiche e fisiche della zeina vengono così riassunte da Takahashi [21]:

- La zeina è insolubile in acqua, ma può essere disciolta in etanolo acquoso e solventi organici polari come il propililen-glicol e l'acido acetico;

- La zeina è solubile in acqua con PH maggiore di 11, in detergenti come l'SDS e in presenza di alte concentrazioni di urea;
- La zeina forma film trasparenti da soluzioni;
- La zeina ha comportamento termoplastico con proprietà di flessibilità e di adesione che possono essere realizzate aggiungendo vari plasticizzanti come i grassi o gli esteri;
- La zeina è un eccellente antiossidante per i lipidi;
- Ha una forte capacità adesiva nella sua forma gel;
- È adatta a formare microcapsule;
- La zeina è ricca di amminoacidi ramificati quali la valina, la leucina, l'isoleucina e l'alanina che le conferiscono proprietà benefiche.

2.3.2 – Proprietà termiche

La zeina ha una temperatura di transizione vetrosa (T_g) ed è viscoelastica sopra la T_g .

La T_g della zeina può essere abbassata aggiungendo ad essa un plasticizzante quale può essere anche l'acqua.

Possiamo pertanto affermare che la T_g della zeina è una funzione dell'umidità; in particolare essa decresce rapidamente con legge non lineare con l'aumentare del contenuto di acqua fino ad eguagliare la temperatura ambiente per valori piuttosto alti di umidità (Figura 2.6)[22].

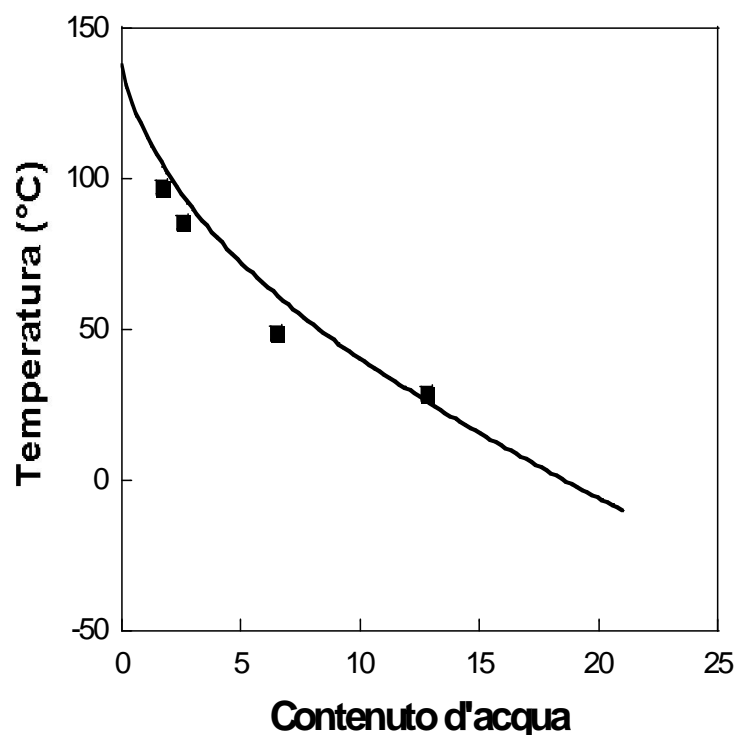


Figura 2.6: Temperatura di transizione vetrosa in funzione del contenuto di umidità da Dejing Fu et al. [22].

Determinare la dipendenza della T_g dalla concentrazione in peso o in volume (c) del plasticizzante è molto interessante in quanto ci permette di definire l'effetto di una plasticizzazione; a tal proposito chiamiamo la funzione $T_g=f(c)$ *funzione di plasticizzazione*.

Molte analisi termiche condotte sulle proteine per calcolare la temperatura di transizione vetrosa usano velocità di riscaldamento relativamente basse; in letteratura si trovano velocità di 5°C/min o 10°C/min su un intervallo di temperatura che va da -30 a oltre 180°C.

Di contro, studi preliminari sulle proteine vegetali utilizzano velocità di riscaldamento di 20°C/min. Elevate velocità aiutano

ad osservare meglio le variazioni di c_p associate a transizioni di ampiezza debole, come le transizioni vetrose dei biopolimeri. Tuttavia in alcuni test è stato visto che maggiori velocità di riscaldamento minimizzano l'evaporazione dell'acqua, che resta pertanto il principale fenomeno parassita nella determinazione della T_g in campioni con livelli di umidità intermedi. Velocità relativamente alte aiutano inoltre a ridurre le alterazioni strutturali nella proteina, favorite a basse velocità.

In letteratura troviamo tre modelli principali di calcolo della T_g : le equazioni di Couchman-Karasz [23], Gordon-Taylor [24] e Kwei [25].

Il modello più citato in letteratura tra i tre è il modello termodinamico di Couchman-Karasz. Esso è basato sulle leggi termodinamiche della miscelazione (condizioni di entropia e continuità di volume) e permette una previsione dell'effetto di un plasticizzante sulle proteine attraverso il calcolo della nuova T_g :

$$T_g = (X_p \delta C_{pp} T_{gp} + X_d \delta C_{pd} T_{gd}) / (X_p \delta C_{pp} + X_d \delta C_{pd})$$

dove X rappresenta la frazione massica (risp. molare) e δC_p la variazione del calore specifico massico (risp. molare) osservata in corrispondenza della T_g . La lettera p si riferisce al polimero (nel caso specifico alla proteina) e la d al diluente, in particolare plasticizzante (acqua, alcool, ecc.).

Seguendo il modello precedente, il modello di Gordon-Taylor fornisce una previsione della T_g per aggiunta di un plasticizzante ad un polimero. Tale equazione è basata sull'additività dei volumi delle unità monomeriche ripetitive e sulla costanza del loro volume specifico parziale nei copolimeri. Esso presenta il vantaggio di richiedere solo la determinazione sperimentale di

una costante, K , (e non la conoscenza del δC_p). Tale equazione ha la seguente forma:

$$T_g = (W_p T_{gp} + KW_d T_{gd}) / (W_p + KW_d)$$

con W frazione ponderale. Nell'equazione di Kwei, infine, si aggiunge un termine che rappresenta l'influenza delle interazioni specifiche atte a stabilizzare o destabilizzare la miscela:

$$T_g = (W_p T_{gp} + KW_d T_{gd}) / (W_p + KW_d) + QW_p W_d$$

I modelli citati non riescono però a fittare i dati sperimentali, che descrivono l'andamento della T_g in funzione della concentrazione, relativi a molte miscele di biopolimeri. In letteratura è però stato considerato un nuovo approccio basato sull'idea di studiare la correlazione tra la temperatura di transizione vetrosa e la composizione chimica di un biopolimero, riducendo il numero di parametri agli elementi principali della sua struttura chimica. Le proprietà fisiche possono così essere determinate come somma dei contributi corrispondenti ai gruppi strutturali della molecola (*tecnica del contributo aggiunto*) [26], indipendentemente dalla presenza di altri gruppi strutturali, dello stesso composto o di altre molecole, incluse quelle di plasticizzante. Ogni biopolimero ha solitamente una struttura tridimensionale individuale ed un numero di gruppi funzionali variabile; pertanto l'esistenza di una struttura unica per le proteine globulari non significa esistenza di un set unico di gruppi strutturali per ogni proteina.

In altre parole tale studio mostra che, tra le caratteristiche chimiche principali di una proteina (composizione di amminoacidi, legami disolfuro trasversali e peso molecolare della catena polipeptidica), la sola composizione amminoacida è sufficiente per calcolare la T_g .

2.3.3 – Plasticizzanti per la zeina

I plasticizzanti devono presentare un equilibrio interno tra gruppi polari e non polari.

Essi sono stati classificati in 7 diversi gruppi da Hansen [27], come mostrato in Tabella 2.4.

In particolare sono stati distinti quelli primari e quelli secondari. Alcuni dei plasticizzanti più efficienti sono solventi non volatili, come il glicol trietilenico.

I plasticizzanti secondari hanno un effetto limitato se usati da soli ma molto efficiente se combinati con altri composti.

La stessa acqua è un plasticizzante e influisce in particolare sulla temperatura di transizione vetrosa come già detto nel paragrafo relativo alle proprietà termiche della zeina.

Plasticizzanti primari Glicoli Trietilene glicol Propilene glicol Etilene glicol Polietilene glicol Polipropilene glicol Sulfonammidi Benzene sulfonammide N-etil benzene sulfonammide p-toluene sulfonammide N-etil p-toluene sulfonammide Acidi grassi Acido oleico Acido palmitico Acido miristico Acido stearico Ammidi Acetammide Acetanilide Urea	Plasticizzanti secondari Glicerolo Sorbitolo Difenilammina Dibutil ftalato Dibutil sebacato Trifenil fosfato
Ammine Trietanolanmina Dietanolammina Gliceril esteri Gliceril monooleato Gliceril monopalmitato Gliceril monostearato Glicol esteri Glicol monooleato Glicol monopalmitato Glicol monosterarato Esteri Dibutil tartrato Monobutil ftalato Monometil azelato Monometil sebacato Miscellanee Etilene glicol monofenil etere Tricresil fosfato Tall oil	

Tabella 2.4: Plasticizzanti per la zeina [18].

2.4 – Estrazione della zeina

La zeina viene estratta dal mais o dal CGM usando solventi opportuni. Le proprietà idrofobiche della zeina fanno sì che essa sia solubile solo in solventi che esibiscono sia caratteristiche polari che non polari come gli alcool alifatici acquosi. In realtà essendo presenti in essa anche residui polari come il gruppo fenolico della tirosina che possono essere ionizzati la zeina è dissolubile anche in alcuni acidi organici (acido acetico, acido lattico ed altri). Sono quindi diversi i sistemi in grado di solubilizzare la zeina, che per definizione è considerata solubile se più dello 0.5% (w/v) della proteina si dissolve nel solvente dando una soluzione trasparente a temperatura ambiente (20-25°C). Più recentemente questi sistemi sono di solito raggruppati in tre grandi classi: solventi primari, solventi binari e solventi ternari.

2.4.1 – Solventi primari

Nella Tabella 2.5 sono elencati possibili solventi primari per la zeina ed il loro punto critico di intorbidamento, ovvero la temperatura alla quale la soluzione diventa torbida (opaca) in seguito a raffreddamento [28]. Affinché una singola sostanza sia un buon solvente per la zeina, le molecole devono avere un proprio equilibrio interno tra gruppi polari e non polari. Il glicol propilenico può dissolvere la zeina a temperatura ambiente mentre il glicerolo ha bisogno di essere riscaldato a 150°C; il glicol polipropilenico con peso molecolare >3000 non dissolve invece la zeina completamente. La presenza di gruppi -OH, -NH₂, -CONH₂ o -COOH nei solventi è importante, così come è importante che essi presentino catene sufficientemente lunghe. Molti solventi organici, sia puri che miscele, presentano infatti

tre o quattro atomi di carbonio; le interazioni tra gruppi polari delle molecole di solvente e amminoacidi laterali delle zeine bloccano i solventi a meno che le loro catene di atomi di carbonio non siano lunghe almeno quanto i residui. Per questo motivo saponi (14-18 atomi di carbonio) e detergenti, come il dodecilsolfato (12 atomi di carbonio), avendo catene sufficientemente lunghe, risultano buoni mezzi di solubilizzazione della zeina in acqua. Una limitazione nell'ammontare di zeina che può essere disciolta nel solvente è legata alla viscosità finale del sistema, che influenza negativamente le fasi successive di miscelazione. Acetone, dioxano e dioxolano formano eccellenti miscele di solventi con acqua producendo soluzioni finali, a parità di zeina disciolta, meno viscosi rispetto all'alcool.

Solvente	Temp. °C	Solvente	Temp. °C
Acetammide	82	Furfuril alcool	≤40
Acido acetico	14	Glicerolo	139
2-ammino-2-etil-1,3-propandiolo	38	Glicerol furfuril	≤40
2-ammino-2-metil-1-propanolo	24	Glicerol- α - γ -dimetil etere	≤40
Anilina	gelifica	Glicerol- α -monocloroidrina	≤40
Alcool benzilico	-18	Glicerol- α -metil etere	≤40
Benzil cellosolve	≤40	Glicerol- α -fenil etere	>54
Butilammina	≤40	β -idroxietilanilina	-30
Butil tartrate	≤40	Idroxietilenediammina	≤40
1,3-glicol butilenico	39	2-idroximetil-1,3-dioxolano	≤40
<i>o</i> -cicloexilfenolo	>55	Acido lattico	≤40
1,3-diammin-propanolo	40	Metanolo	63
Di[- β -idroxietil]anilina	>59	Metil lactato	≤40
Dietanolammina	30	Monoetanolammina	6
Glicol dietilenico	≤40	Monoisopropanolammina	-4
Dietilen-glicol-monoetil-etere	≤40	Morfolina	-6
Dietilen-glicol-monometil-etere	≤40	Morfolina etanolo	>2
Dietilen-triammina	≤40	Fenolo	40
Diglicolcloroidrina	≤40	Feniletanolammina	-15
Diisopropanolammina	32	Acido propionico	60
Glicol dipropilenico	≤40	Propilene cloroidrina	-30
Etil-etere-tripropilenglicol	-20	Propilenediammina	≤40
Etil lactato	-24	Propilene glicol	≤40
Etilfeniletanolammina	-25	Piridina	≤40
Etilene cloroidrina	≤40	Resorcinol monoaceato	0
Glicol etilenico	18	Trietanolammina	>21
Etilen-glicol-monoetil-etere	≤40	Trietilenetetrammina	≤40
Etilen-glicol-monometil-etere	≤40	Tetraidrofurfuril alcool	≤40
Etilen-diammina	11	Trietilene glicol	≤40
Acido formico	7	triisopropanolammina	>46

Tabella 2.5: Solventi primari per la zeina [28].

2.4.2 – Solventi secondari

La zeina è nota per la sua solubilità in solventi binari quali miscele di acqua con composti organici (come alcool, acetone e acetoneilacetone) o miscele di due composti organici anidri (come alcool e idrocarburi clorinati o glicoli). L'esempio tipico di solvente binario per la zeina è rappresentato dall'etanolo acquoso. La solubilità della zeina in etanolo acquoso è mostrata nel diagramma di fase ternario di Figura 2.7 dal quale ricaviamo che è impossibile preparare soluzioni contenenti più del 65% di zeina senza aumentare la temperatura. Temperature più alte innalzano infatti la curva di solubilità fino alla scomparsa del massimo.

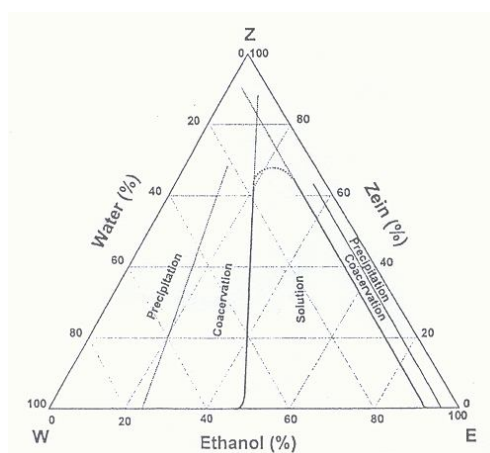


Figura 2.7: Diagramma ternario zeina-acqua-etanolo a 22°C [29].

Da questo stesso diagramma ricaviamo anche che, a concentrazioni di etanolo minori del 40% e maggiori del 90%, appaiono due fasi liquide contenenti entrambe zeina precipitata. Tale fenomeno, largamente utilizzato per il recupero di zeina dopo l'estrazione dal CGM, corrisponde ad una transizione di stato tra solubilizzazione completa e precipitazione della zeina.

Oltre all'acqua, anche gli idrocarburi aromatici incrementano il potere solvente degli alcoli anidri.

Ulteriori solventi binari sono le miscele di chetoni e acqua.

La Tabella 2.6 riporta possibili combinazioni di solventi per la zeina.

Acqua e uno dei seguenti solventi	Un alcool alifatico minore e uno dei seguenti solventi
Acetone Acetonil acetone n-butanolo t-butanolo s-butanolo Dioxalano Dioxano Etanolo Isobutanolo Isopropanolo Metanolo n-propanolo	Acetaldeide Acetone Benzene Butil lactato Cloroformio Diclorometano Di etilen glicol monoetil etere Etil lactato Etilene dicloride Etilene glicol Etilene glicol monoetil etere Furfurolo Metil etil chetone Metilene cloride Nitroetano Nitrometano Propilene glicol 1,1,2,2- tetracloroetano 1,2,3-tricloroetano toluene

Tabella 2.6: Solventi secondari per la zeina [30].

2.4.3 – Solventi ternari

Il primo uso di solventi ternari per l'estrazione di zeina si deve a Galeotti e Giampalmo [31], che osservarono la solubilità della zeina in miscele di tre componenti, due dei quali etanolo e acqua (Tabella 2.7).

Acqua, un alcool alifatico e uno dei seguenti solventi	
Acetaldeide	Dioxano
Acetone	Etileneglicol monoetil etere
Acetonilacetone	Formaldeide
Benzene	Metil acetato
Butiradeide	Nitroetano
Di etilene alcool	Nitrometano
Acqua e due dei seguenti solventi	
1,3-butanediol	Di etilene glicol
1,4-butanediol	Etilene glicol
2,3-butanediol	Di etil glicol
Di etilene glicol	Propilene glicol

Tabella 2.7: Solventi ternari per la zeina [32].

L'aggiunta di acetaldeide ad alcool acquoso riduce notevolmente la temperatura del punto di intorbidamento della miscela solvente, sebbene richieda notevoli quantità di acetaldeide. Miscele ternarie formate da acetone, acqua e aldeide (appena il 5%) offrono invece maggiore resistenza alla gelificazione.

2.4.4 – Altri solventi

La solubilità della zeina in acqua può però essere aumentata anche attraverso un trattamento chimico quale la deamidazione acida o alcalina (rispettivamente con HCl (pH<1) o NaOH (pH>12) oppure attraverso una modificazione enzimatica al fine di convertire gli amminoacidi che rendono idrofoba la zeina quali ad esempio gli amminoacidi di glutammine in acidi e sali. Tuttavia tali trattamenti consumano grandi quantità di sostanze

chimiche o causano una significativa degradazione della proteina, pertanto sono raramente utilizzati.

2.4.5 – Gelificazione

La scelta del solvente è dettata non solo dalla solubilità ma anche dalle caratteristiche di gelificazione.

La zeina in soluzione è instabile, essa infatti gelifica facilmente in tempi che dipendono dal tipo di solvente, dalla concentrazione del solvente (meno acqua provoca una gelificazione più lenta), dalla temperatura (temperature maggiori favoriscono la gelificazione), dal pH e dall'intensità di agitazione che sappiamo promuovere la denaturazione della proteina e quindi la sua gelificazione, che può inoltre essere innescata dalla presenza di corpi insolubili che fungono da autocatalizzatori.

Altri fattori che influiscono sulla stabilità sono il tipo di cereali e il metodo di macerazione, le condizioni di essiccazione ed il tempo di deposito.

I solventi che proteggono meglio la proteina dal fenomeno di gelificazione sono, in base a quanto detto finora, i primari; in quest'ultimi infatti essendo privi di acqua sono caratterizzati da tempi di gelificazione più lunghi.

La stabilità della zeina in soluzione è ovviamente importante per applicazioni commerciali di successo, pertanto sono diversi gli interventi atti ad incrementarla. I più comuni sono quelli che prevedono l'introduzione nella soluzione zeina-solvente di un terzo componente organico, ad esempio 5% di formaldeide in acetone-acqua, o l'aggiunta di stabilizzanti, come glicol propilenico.

Approcci alternativi sono l'invecchiamento dei precipitati in acqua calda (40-50°C), aggiunta di acido cloridrico, borico o fosforico e raffreddamento rapido a temperatura sotto 10°C dopo estrazione con alcool.

L'ulteriore aggiunta di tritanolamina a sistemi alcool-acqua aumenta la trasparenza dei film.

2.5 – Processi di estrazione

I processi di produzione della zeina differiscono per la scelta di:

1. materie prime
2. solventi di estrazione
3. metodo di purificazione
4. metodo di recupero.

La materia prima è generalmente costituita da CGM, contenente un minimo di 60% di proteine su base secca, di cui più della metà costituito da zeina (Tabella 2.8).

Componente	% in peso su base secca		
	CGF	CGM	DDGS
Amido	27	20	
Proteine	23	65	27
Olio	3	4	13
Altro	47	11	60

Tabella 2.8: Distribuzione dei componenti principali nei coprodotti di processo [9].

La scelta del CGM come materia prima è legata soprattutto alla necessità che la zeina prodotta contenga prevalentemente α -zeina [33], essendo gli altri tipi di zeina più inclini alla gelificazione [15]. Il CGM è infatti un coprodotto del Wet Milling, processo che usa anidride solforosa SO_2 per favorire un

rammollimento del mais e facilitare la rimozione dell'amido. E' proprio l'SO₂ ad indebolire la matrice polimerica, rompendo i legami trasversali disolfuro [34] presenti nelle zeine β , γ e δ e rendendo la γ -zeina, una volta ridotta, solubile in acqua [35] ed eliminabile facilmente per infusione in essa. Tale trattamento impoverisce la zeina di cistina. Lo stesso solvente estraente utilizzato per il recupero della zeina commerciale (isopropanolo acquoso all'86%) riduce l'ammontare di β , γ e δ -zeina, solubilizzandole.

La qualità del CGM varia notevolmente nel contenuto proteico a seconda del modo in cui i cereali vengono trattati prima della separazione (condizioni di macerazione e macinazione) e soprattutto nello step finale di essiccazione: il recupero di zeina decresce all'aumentare della temperatura di essiccazione del CGM. In ogni caso il basso contenuto di zeina nelle materie prime (non si supera il 4%) non giustifica ancora i notevoli costi di estrazione.

Il DDGS è un coprodotto del Dry Grind (Figura 2.2) con un contenuto di proteine del 27-30% (Tabella 2.8). Tuttavia da tale sottoprodotto si ottiene una zeina di qualità inferiore.

Molti dei processi descritti in letteratura usano due solventi in successione: uno polare, come soluzioni acquose di etanolo o isopropanolo per l'estrazione, e un solvente apolare, come esano o benzene, per la rimozione di grassi e pigmenti colorati ($\approx 2\%$ su base secca).

I processi commerciali utilizzati sono essenzialmente due: CPC Process e Nutrilite Process (Figure 2.8 e 2.9).

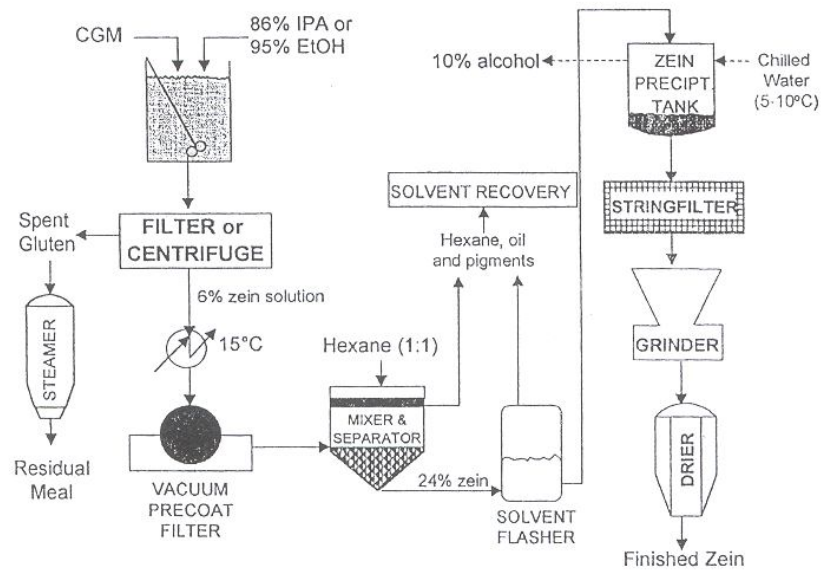


Figura 2.8: CPC process.

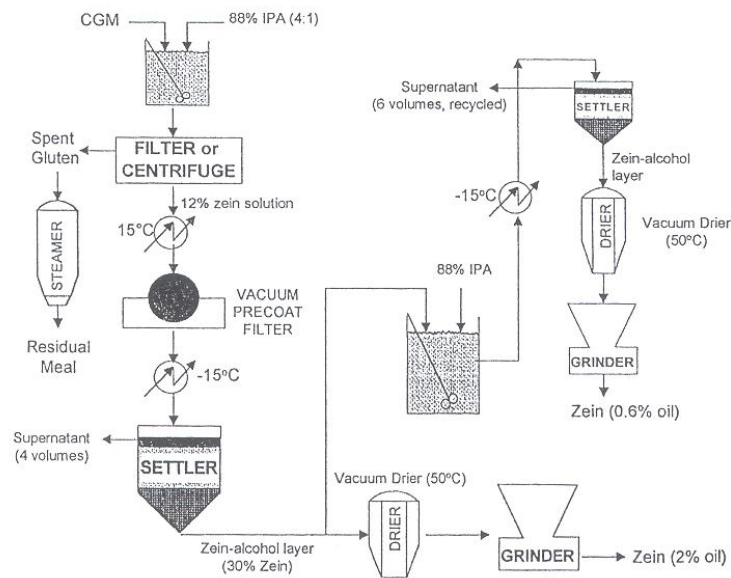


Figura 2.9: Nutrilite process.

2.5.1 – CPC process

Il CGM, secco o umido, viene messo a contatto con isopropilalcol all'86-88% (IPA) caldo o etanolo al 93-95% ad elevato PH e alte temperature (50-60°C). Il processo viene condotto in sistemi di estrazione batch o continui, per un tempo compreso tra 30 e 120 minuti. L'estratto viene filtrato e centrifugato. Il prodotto filtrato, contenente zeina ($\approx 6\%$ w/v) e impurezze, viene purificato, per semplice deposizione o tramite filtrazione sotto vuoto, e poi raffreddato. Successivamente viene aggiunta una sostanza apolare non solvente per la zeina (esano o benzene) al fine di estrarre le impurezze non proteiche come grassi e pigmenti colorati. La zeina viene infine fatta precipitare o in eccesso di acqua fredda oppure a basse temperature (da -15 a -25°C), per poi essere essiccata sotto vuoto. La zeina ottenuta si presenta in forma pulverulenta, di colore giallo paglierino. Il processo è stato modificato nel corso degli anni per includere un trattamento alcalino con NaOH a pH=12, di durata pari a 30 minuti, per la deamidazione degli amminoacidi residui. Il pH viene successivamente abbassato con aggiunta di HCl e la zeina precipitata in acqua fredda. Questa procedura migliora le sue proprietà di stabilità e gelificazione.

L'IPA è il solvente migliore per l'estrazione della zeina in quanto, rispetto all'etanolo, mostra una maggiore efficienza in termini di più alta concentrazione di zeina nella soluzione e di successiva separazione dai grassi e dai pigmenti: una minore quantità di IPA si dissolve in esano favorendo una riduzione dei costi di distillazione. Il calore di vaporizzazione dell'etanolo è inoltre considerevolmente più alto (204,5 cal/gr) rispetto all'IPA (159,35 cal/gr) e quindi i costi di distillazione con l'etanolo sono più elevati.

I maggiori svantaggi del processo CPC sono legati agli alti costi richiesti per il complesso recupero del solvente (distillazione primaria), alla bassa resa e alle grosse perdite di solvente durante l'estrazione, accompagnati da problemi di gelificazione della zeina per la variazione del pH della soluzione. La qualità del prodotto finale è abbastanza variabile.

2.5.2 – Nutrile process

Il più recente NP non usa un solvente apolare per rimuovere l'olio ma ne riduce il contenuto attraverso una riestrazione con una soluzione acquosa all'88% di IPA (Figura 2.9). Questo processo consente un maggior controllo del fenomeno della gelificazione (le basse temperature adottate riducono i rischi di denaturazione della zeina) ma presenta costi significativi associati alla necessità di elevati volumi di solvente e precipitazioni a basse temperature.

Morris e Wilson [36] hanno usato un approccio interessante per produrre zeina pura che prevede l'uso di IPA al 28% e calce al 6%. Il loro processo richiede elevati volumi di solvente (più di 20 lavaggi) e alte temperature (75°C).

2.5.3 – Zeina commerciale e sue applicazioni

L'attuale produzione di zeina non supera 500 ton/anno ed avviene solo in USA e Giappone. Le proprietà della zeina commerciale sono elencate in Tabella 2.9.

Proprietà		Caratteristiche
Colore		Crema leggero
Costante dielettrica		4.9-5.0
Coefficiente di diffusione	di	$3.7 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$
Coefficiente di viscosità	di	25
Temperatura di transizione vetrosa	di	165°C
Peso molecolare		35 000 (varia tra 9.6 e 44 K)
Forma fisica		Polvere amorfa
Punto di degradazione termica	di	320°C

Tabella 2.9: Proprietà della zeina [9].

La zeina commerciale non può essere utilizzata direttamente nei prodotti di alimentazione umana sia per la sua insolubilità in acqua, che la rende difficile da digerire, sia perché essendo povera di amminoacidi essenziali quali lisine e triptofano è carente da un punto di vista nutrizionale. Tali considerazioni ne hanno spostato l'interesse verso l'impiego come polimero industriale ed in particolar modo per la realizzazione di film per imballaggio come vedremo nel capitolo 4.

Prima però di passare a descrivere quali sono le tecniche classiche di produzione di film a base di zeina e quello che è lo stato dell'arte relativo a questa proteina presente nella letteratura scientifica, risulta doveroso, al fine di una maggiore comprensione della problematica in esame, definire nel prossimo capitolo il concetto di struttura e di denaturazione di una proteina naturale, essendo quest'ultima una modifica strutturale strettamente necessaria ogni qual volta si vuole utilizzare una proteina per applicazioni industriali.

3

Denaturazione delle proteine naturali per applicazioni industriali

3.1 – Le proteine naturali

Le proteine sono polimeri degli α -amminoacidi. Gli α -amminoacidi hanno la struttura generale descritta in Figura 3.1.

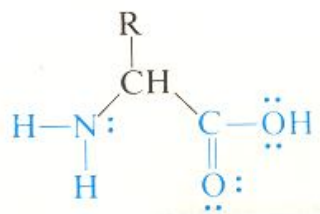


Figura 3.1: α -amminoacido.

in cui un ammino gruppo (NH_2) e un radicale R sono legati ad un atomo di carbonio fissato a sua volta al gruppo carbossilico (COOH) (questo atomo di carbonio è detto in α rispetto al carbossile). Nelle molecole delle proteine si possono trovare 20 amminoacidi diversi, e le proprietà individuali di questi acidi sono definite dalla natura del gruppo R.

Le caratteristiche particolari delle diverse proteine dipendono dal numero totale, dalla natura e dalla sequenza con cui gli amminoacidi sono presenti nella catena polimerica e, inoltre, dalla configurazione spaziale della stessa.

Le formule strutturali, i nomi e le abbreviazioni usate per i 20 amminoacidi sono riportati in Tabella 3.1.

Si vede che gli acidi possono essere considerati come derivati della glicina, in cui vari gruppi R sostituiscono uno degli idrogeni α . A causa delle proprietà acide dei gruppi carbossilici e basiche dei gruppi amminici presenti negli amminoacidi, la loro forma biologicamente più importante è quella **zwitterionica** (Figura 3.2):

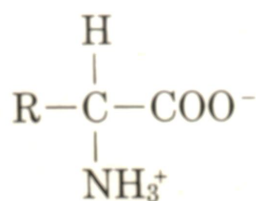


Figura 3.2: Forma zwitterionica di un α -amminoacido [37].

in cui i due gruppi si presentano in forma ionizzata come mostrato nella Tabella 3.1

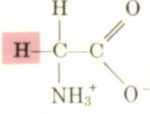
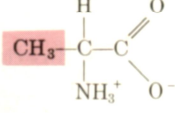
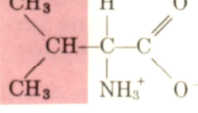
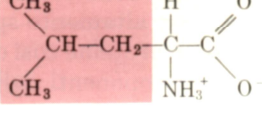
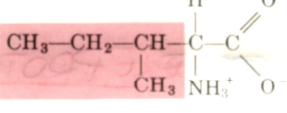
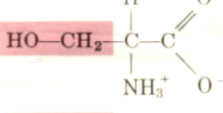
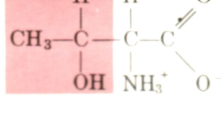
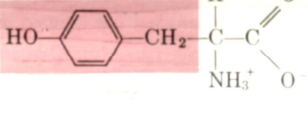
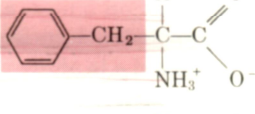
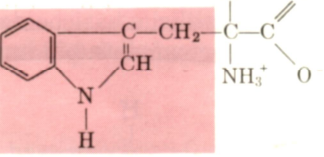
Caratteristica della catena laterale (Gruppo R)	Struttura chimica	Amminoacido	Simbolo
Gruppo Alifatico, non polare		Glicina	Gly
		Alanina	Ala
		Valina	Val
		Leucina	Leu
		Isoleucina	Ileu
Gruppo Alcolico, alifatico e aromatico		Serina	Ser
		Treonina	Thr
		Tirosina	Tyr
Gruppo Aromatico		Fenilalanina	Phe
		Triptofano	Try

Tabella 3.1: Amminoacidi comuni: strutture e simboli [37].

Caratteristica della catena laterale (Gruppo R)	Struttura chimica	Amminoacido	Simbolo
Gruppo Carbossile (Acido)		Aspartico	Asp
		Glutammico	Glu
Base amminica (Basico)		Lisina	Lys
		Arginina	Arg
		Istidina	His
Gruppo Contenente zolfo		Cisteina	Cys
		Metionina	Met
Gruppo carbossammidico		Asparagina	Asn
		Glutammina	Gln
Gruppo Imminico		Prolina	Pro

Tabella 3.1(continuo): Amminoacidi comuni: strutture e simboli [37].

In un certo numero di acidi R è un gruppo puramente alifatico e, in un caso, aromatico. In altri acidi R contiene un gruppo funzionale potenzialmente reattivo. La serina, la treonina e la tirosina contengono un gruppo OH che può essere esterificato con acidi organici o con acido fosforico. L'acido glutammico e l'aspartico portano un secondo gruppo funzionale acido, mentre la lisina e l'arginina presentano un secondo gruppo amminico. Il gruppo solfidrile (o tiolico) –SH, altamente reattivo, è presente nella cisteina. Tale gruppo è di notevole importanza perché due di essi possono dar luogo, ad opera di blandi agenti ossidanti, alla formazione di un gruppo disolfuro, -S-S- secondo la reazione di Figura 3.3, e quindi legare due catene proteiche e influenzare la struttura secondaria e terziaria delle proteine.

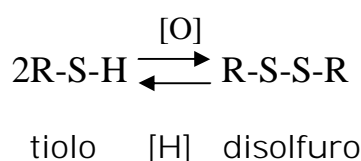


Figura 3.3: Reazione di conversione della cisteina in cistina [37].

Tale reazione è reversibile con l'intervento di blandi agenti riducenti. Come si può facilmente osservare dalla tabella 3.1 tutti gli amminoacidi, eccetto la glicina, portano quattro sostituenti diversi sull'atomo di carbonio in α e pertanto sono otticamente attivi. Dei due possibili arrangiamenti di atomi intorno all'atomo di carbonio asimmetrico, solo le configurazioni L sono state riscontrate nelle proteine naturali.

Gli amminoacidi sono legati insieme per formare le proteine mediante *legame peptidico*. Questo legame può essere raffigurato come derivante dalla condensazione del gruppo carbossilico di un acido con l'ammino gruppo di un altro, con eliminazione di acqua (Figura 3.4).

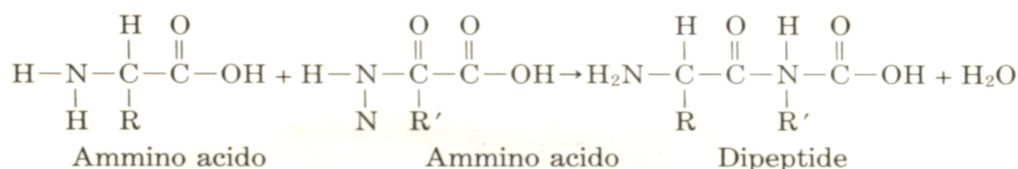


Figura 3.4: Reazione di condensazione di due amminoacidi [37].

Il legame tra il carbonio carbonilico e l'azoto amminico è detto *legame peptidico*. La condensazione di più amminoacidi porta alla formazione di un polipeptide. L'estremità della catena polipeptidica contenente il gruppo amminico è chiamata **N-terminale** e l'estremità contenente il gruppo carbossilico **C-terminale**. L'unità che si ripete nella catena è (Figura 3.5):

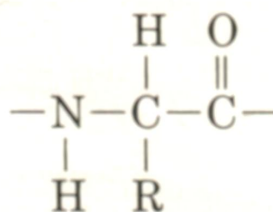


Figura 3.5: Unità ripetitiva di un polipeptide [37].

ed è definita **residuo** di un amminoacido poiché è ciò che resta di un amminoacido dopo l'eliminazione degli elementi che costituiscono l'acqua. In generale catene formate da 70, o anche meno, amminoacidi sono definite polipeptidiche, mentre le molecole naturali a più elevato numero di unità base sono dette proteine.

3.2 – La struttura delle proteine naturali

La struttura delle proteine può essere analizzata e descritta con tre diversi gradi di approfondimento.

La **struttura primaria** si riferisce allo scheletro covalente della catena e quindi alla sequenza degli amminoacidi (Figura 3.6).

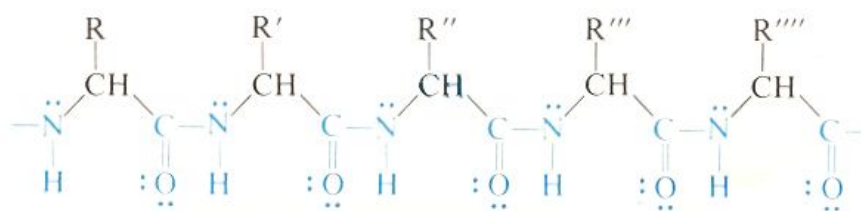


Figura 3.6: Frammento di una proteina [38].

La **struttura secondaria** riguarda invece la disposizione nello spazio della catena peptidica (ad esempio, disposizione estesa oppure avvolta a spirale); essa è determinata essenzialmente dalle interazioni che la catena può avere con se stessa in conseguenza della formazione di legami idrogeno.

La tecnica sperimentale che si è dimostrata più utile nello studio della struttura secondaria delle proteine è la diffrazione dei raggi X. L'analisi ai raggi X ha rilevato che la catena polipeptidica di una proteina naturale può assumere due strutture secondarie principali: una è la cosiddetta struttura a pieghe, l'altra è la struttura ad elica. Per capire bene i motivi che "impongono" una di queste strutture è necessario esaminare la geometria del legame peptidico che è illustrata in Figura 3.7.

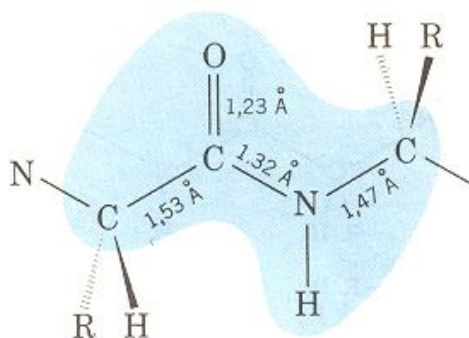


Figura 3.7: Geometria del legame peptidico [38].

I sei atomi che costituiscono il gruppo ammidico (il carbonio carbonilico, l'azoto e i quattro atomi ad essi legati) giacciono nello stesso piano. Il legame carbonio-azoto è insolitamente corto e ciò indica un contributo importante della seguente struttura di risonanza a separazione di carica (Figura 3.8).



Figura 3.8: Legame -NC- [38].

Il legame carbonio-azoto possiede un apprezzabile carattere di doppio legame e pertanto la rotazione dei gruppi intorno a questo legame è impedita. E' invece relativamente libera la rotazione dei gruppi legati all'azoto ammidico e al carbonio carbonilico ed è proprio questa libertà di rotazione che conferisce alle catene peptiche la capacità di assumere conformazioni preferenziali. L'ossigeno del carbonile e l'idrogeno del gruppo -NH- assumono una disposizione di tipo transoide rispetto al legame C-N; lo stesso orientamento è assunto dai gruppi -CHR-. In definitiva, l'ossatura di una catena peptidica è rappresentata da una serie di piani relativamente rigidi separati da gruppi -CHR-. Questi ultimi sono alternativamente diretti verso una direzione e verso la direzione opposta, cosicché è possibile individuare un'unità (Figura 3.9) la cui continua ripetizione genera la catena peptidica.

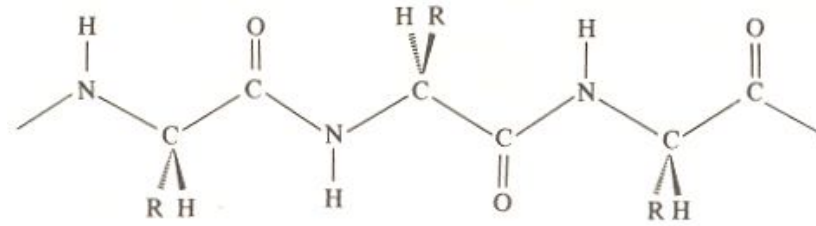


Figura 3.9: Unità ripetitiva di una proteina [38].

Immaginiamo, ora, di accoppiare ad una catena peptidica una seconda catena, in modo da instaurare la formazione di legami idrogeno tra gruppi $-NH-$ e $-CO-$. Il risultato è la struttura piana mostrata in Figura 3.10:

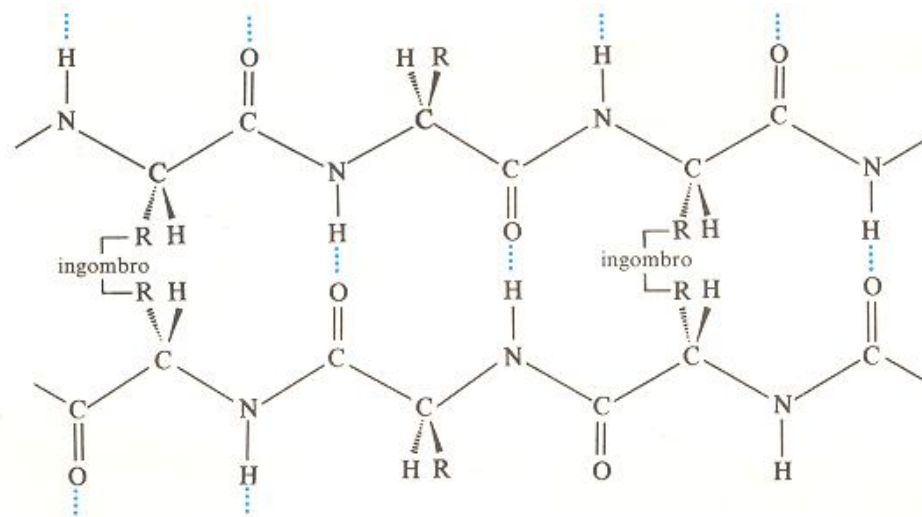


Figura 3.10: Ipotetica struttura piana di un polipeptide[38].

Questa struttura non è, però, in grado di accomodare gruppi R di piccole e medie dimensioni in quanto tra di essi si verrebbero ad esercitare forti repulsioni steriche. Per accomodare i gruppi R, le catene peptidiche si contraggono assumendo la struttura a pieghe o struttura β che avrà ovviamente un'unità ripetitiva più corta della struttura piana (Figura 3.11).

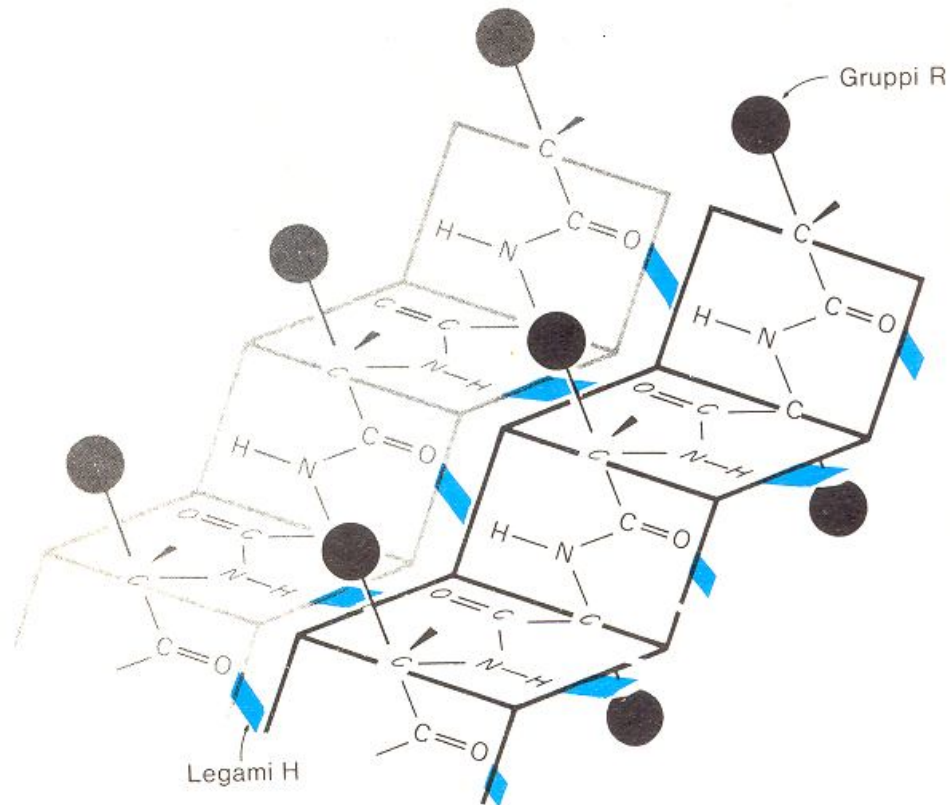


Figura 3.11: Struttura a pieghe di un polipeptide. I tratti colorati sono i legami idrogeno tra le catene adiacenti [38].

Quando i gruppi R hanno dimensioni particolarmente ingombranti, la catena assume un tipo di struttura secondaria completamente diverso, quello di α -elica (Figura 3.12). Questa struttura è un'elica destrorsa con 3,6 amminoacidi per ogni giro e con i gruppi R diretti verso l'esterno. La disposizione ad α -elica è preferita perché permette la formazione di legami idrogeno tra i successivi avvolgimenti dell'elica. Nell' α -elica si forma infatti un legame idrogeno tra l'atomo di idrogeno legato all'azoto ammidico e l'ossigeno del carbonile del quarto amminoacido successivo.

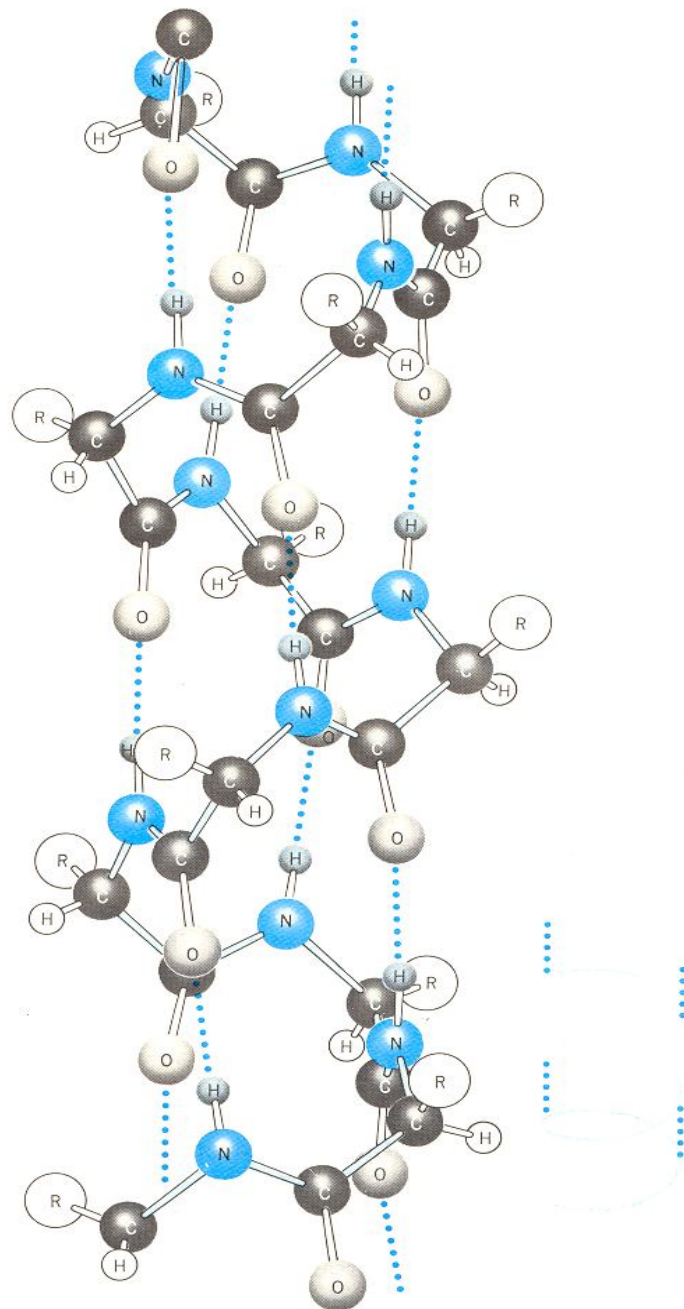


Figura 3.12 : Struttura di α -elica; i legami idrogeno sono indicati con le linee tratteggiate [38].

Non tutte le catene peptidiche però assumono la struttura ad α -elica. Alcune assumono la forma di un avvolgimento casuale che risulta essere una struttura flessibile, variabile e statisticamente casuale. La presenza di unità di prolina e/o di ossiprolina nelle catene peptidiche

produce un altro effetto vistoso: poiché gli atomi di azoto di questi amminoacidi fanno parte di sistemi ciclici a 5 termini, i gruppi legati all'azoto non possono ruotare liberamente per assumere la struttura di α -elica, provocandone l'interruzione e permettendo alla catena piegamenti e convoluzioni (esempi tipici sono le proteine globulari come emoglobina e ribonucleasi).

La **struttura terziaria** di una proteina riguarda infine la sua forma tridimensionale derivante da ulteriori ripiegamenti della catena polipeptidica. Queste pieghe non sono casuali: esse hanno un ruolo nel determinare le funzioni specifiche della proteina, tanto che la loro localizzazione è caratteristica di ognuna di esse. Una varietà di forze (legami di Van der Waals, legami idrogeno, interazioni ioniche, ponti disolfuro) sono impegnate nella stabilizzazione di tale struttura che generalmente si presenta in forma globulare, fibrosa o casuale.

Una conseguenza del ripiegamento delle catene proteiche è quella di esporre il maggior numero possibile di gruppi polari (idrofili) verso l'ambiente acquoso e di orientare il maggior numero possibile di gruppi non polari (idrofobi) nella sacca interna.

3.3 – Proteine per applicazioni industriali

Mentre per applicazioni nutrizionali è importante che le proteine conservino la loro forma nativa, in molte applicazioni industriali modifiche di carattere strutturale sono necessarie non solo per la loro processabilità ma anche per ottenere le prestazioni desiderate; in molti casi queste modifiche si realizzano durante lo stesso processo e sono difficilmente controllabili.

La Tabella 3.2 fornisce alcuni esempi di applicazioni industriali delle proteine con le relative modifiche che è necessario apportare per ottenere specifiche prestazioni.

Alcune proprietà caratteristiche sono: buona aderenza e forza di legame per gli adesivi, resistenza all'acqua per i coating e forza elastica per i materiali plastici. L'aderenza si ottiene esponendo gruppi specifici (ad esempio gruppi polari su superfici polari, come vetro e metalli, e gruppi apolari su superfici apolari, come molte plastiche); per avere invece elevate forze di coesione, le molecole devono essere aggrovigliate. Forza di coesione e resistenza all'acqua possono ottenersi contemporaneamente introducendo legami trasversali tra i polimeri della proteina, la cui reattività risulta quindi un requisito indispensabile e richiede l'esposizione di gruppi reattivi polari come gruppi acidi, amminici, idrossidi e idrosolfuri.

L'esposizione di gruppi specifici e la formazione di catene aggrovigliate implica che la proteina diventi meno strutturata o anche denaturata.

Prodotto	Proprietà	Modifiche
Coating	Aderenza	Esposizione di gruppi specifici
	Tenacia	Aggrovigliamenti
	Resistenza all'acqua	Legami trasversali (gruppi reattivi)
Adesivi	Processabilità	Dissoluzione
	Viscosità (aderenza)	Esposizione di gruppi specifici
	Forza di legame	Aggrovigliamenti
	Resistenza all'acqua	Legami trasversali
Plastica	Elevato punto di fusione	Aggrovigliamenti
	Forza elastica	Aggrovigliamenti
	Resistenza all'acqua	Legami trasversali
Surfatant	Tensione superficiale	Esposizione di gruppi specifici
	Stabilizzazione di interfacce	Esposizione di gruppi specifici

Tabella 3.2: Requisiti fisico-chimici per alcuni prodotti tecnici [39].

3.4 – Denaturazione delle proteine

La denaturazione della proteina segna il passaggio da uno stato iniziale strutturato ad uno stato finale non strutturato avente nessuno o qualche residuo della struttura iniziale. È importante però sottolineare che tale denaturazione mira essenzialmente a modificare la struttura secondaria e terziaria delle proteine, senza modificare la composizione e la sequenza degli amminoacidi, ovvero senza rompere i legami peptidici, come è mostrato in Figura 3.13.

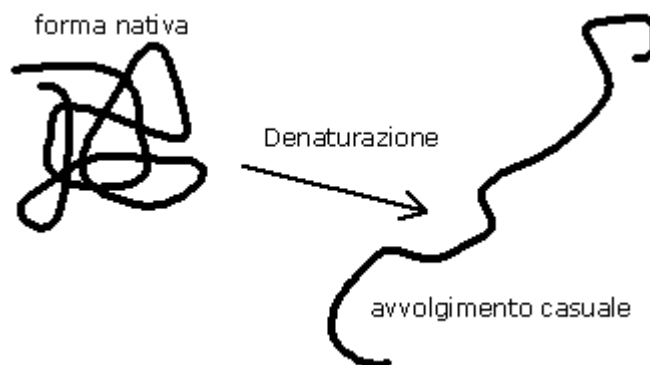


Figura 3.13: Denaturazione proteica.

Essa può avvenire sia per variazione della temperatura (*denaturazione termica*), sia per l'aggiunta di sostanze denaturanti (*denaturazione chimica*) e può essere reversibile o irreversibile.

Solitamente la si realizza in presenza di un contenuto medio di acqua (in generale di solvente) $> 5\%$ e a temperature di circa 75°C anche se tali valori sono variabili in base al tipo di proteina, agli additivi utilizzati e ai metodi di processo.

L'introduzione di additivi è generalmente necessaria per due motivi: modificare le proprietà del materiale, rendendolo ad esempio più duro, più flessibile o più conveniente dal punto di vista economico, e prevenirne la degradazione durante l'impiego o durante lo stesso processo. Essi sono classificati solitamente in additivi di protezione e in additivi chimici.

Gli *additivi di protezione*, come suggerisce lo stesso termine, servono a prevenire modifiche indesiderate nel polimero. Esempi più comuni sono:

- Antiossidanti
- Stabilizzanti termici

Gli *additivi chimici* più validi sono usati per favorire la formazione di legami trasversali lungo le catene polimeriche; il numero di tali legami dipende dal numero e dalla distribuzione di siti attivi sulle catene e dall'ammontare di additivi. L'effetto di tali legami è incrementare la durezza del materiale e ridurre lo scorrimento plastico (creep) impedendo lo scivolamento relativo delle catene.

I *plasticizzanti*, solitamente liquidi non volatili, sono invece usati nei casi in cui si desidera incrementare la flessibilità.

L'influenza della concentrazione di plasticizzante sulla temperatura di denaturazione delle proteine, T_d , è stata studiata in particolare per l'acqua, data la sua inevitabile, e talvolta indesiderata, presenza in ambienti ad atmosfera non controllata. Tale temperatura decresce all'aumentare del contenuto d'acqua soprattutto quando esso supera percentuali del 10-20% (Figura 3.14).

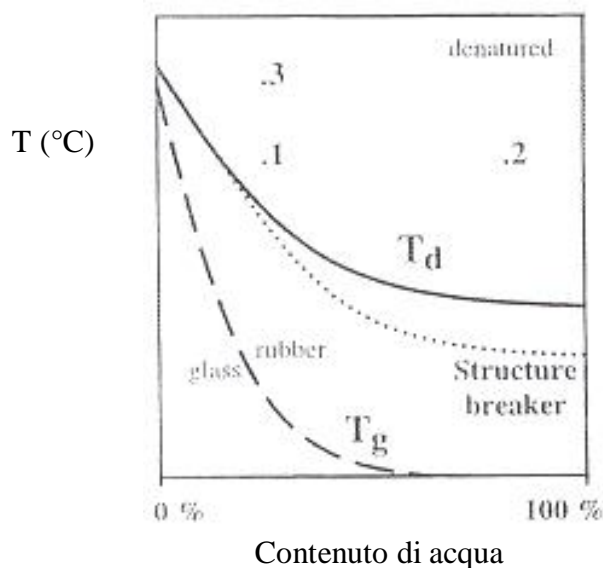


Figura 3.14: Variazione delle temperature T_d e T_g in funzione del contenuto d'acqua [39].

Generalmente la T_d decresce da 120-200°C fino a 80°C passando da assenza di acqua ad un contenuto pari al 20% in peso. La degradazione termica può essere ridotta aggiungendo uno

stabilizzante di struttura (come fluoride di potassio) e può essere accresciuta aggiungendo un demolitore di struttura (come iodide di potassio). Come descritto in molte referenze letterarie, la denaturazione è un fenomeno puramente termodinamico dipendente dalla temperatura (perché influisce sull'energia delle interazioni) e dalla presenza di denaturanti/plasticizzanti. Affinché un fenomeno termodinamico abbia luogo su una scala di tempo misurabile, la mobilità molecolare del materiale deve essere sufficiente, il che avviene al di sopra della temperatura di transizione vetrosa T_g che andiamo a definire anche per le proteine avendo definite per esse una struttura tridimensionale amorfa che conferisce loro la possibilità di realizzare una transizione di tipo vetroso.

3.4.1 – La temperatura di transizione vetrosa

La temperatura di transizione vetrosa T_g è la temperatura alla quale si ha mobilità nella catena polimerica principale e passaggio da uno stato immobile (*vetroso*) ad uno mobile (*gommoso*); pertanto al di sotto della T_g i polimeri hanno un comportamento cui corrispondono in genere basse permeabilità ed elevata fragilità, mentre al di sopra hanno più alte velocità di diffusione e maggiore tenacità.

In relazione alla temperatura ambiente, le materie plastiche possono quindi essere definite come gommosi o vetrosi ed è possibile spiegarne molti comportamenti. Quanto detto dipende dal fatto che al di sotto di tale temperatura solo tratti di catene aventi un massimo di 4 atomi di carbonio presentano mobilità; nella regione di transizione vetrosa tratti di catene contenenti 10-50 atomi hanno energia termica sufficiente per muoversi in maniera coordinata (a gomiti); al di sopra

della T_g segmenti di catene molto lunghi sono capaci di muoversi ed il materiale è mobile.

I parametri che influenzano principalmente la T_g sono:

1. Il **peso molecolare**. È intuitivo che un aumento del peso molecolare e quindi della lunghezza delle catene polimeriche comporti una riduzione della mobilità con conseguentemente incremento della T_g . Una relazione che tiene conto di questo effetto è la seguente:

$$T_g = T_{g\infty} - A/M_w$$

in cui A è una costante, M_w è il peso molecolare medio e $T_{g\infty}$ è la temperatura del polimero a peso molecolare infinito.

2. La **Struttura chimica** ed in particolare la:

- *Flessibilità della catena principale* intesa come facilità di rotazione intorno ai legami della catena principale. Quanto più la catena è flessibile tanto più la T_g è bassa.
- *Dimensione, rigidità e polarità dei gruppi laterali*. Quanto maggiore è la dimensione, la rigidità e la polarità di tali gruppi laterali tanto più la temperatura di transizione vetrosa è alta a causa di una riduzione del volume libero e a un incremento dei legami idrogeno o di van der Waals.

3. Il **grado di reticolazione** del polimero. La T_g aumenta all'aumentare del grado di reticolazione in quanto quest'ultimo determina una riduzione della mobilità della catena polimerica. La legge che tiene conto di questo effetto è stata proposta da van Krevelen [40] e risulta essere del seguente tipo:

$$T_{gcr1} - T_{go} = 1.2T_{go}X_{cr1}/(1-X_{cr1})$$

dove T_{gcr1} e T_{go} sono le temperature di transizione di transizione vetrosa del polimero reticolato e non reticolato, e X_{cr1} è il numero di reticolazione per numero di atomi complessivi.

4. **La presenza di plasticizzanti.** Questi ultimi sono sostanze a basso peso molecolare che si dissolvono nel polimero, incrementandone il volume libero, con conseguente aumento di mobilità e riduzione della T_g . Nel caso delle proteine, acqua e glicerolo sono i plasticizzanti finora più conosciuti e impiegati.

La dipendenza della T_g delle proteine dal plasticizzante acqua è mostrata nella Figura 3.14, già esaminata a proposito della T_d . Si può osservare che la T_g mostra una dipendenza dal contenuto d'acqua (o di un generico plasticizzante) maggiore rispetto alla T_d .

Di solito la T_g si aggira intorno alla temperatura ambiente per un contenuto di plasticizzante totale pari al 25% circa.

3.4.2 – Mobilità molecolare e denaturazione

I principi che regolano la denaturazione e la temperatura di transizione vetrosa sono stati studiati da Sochova [39]; egli afferma che la denaturazione può avvenire solo se la mobilità del materiale è sufficientemente alta, cioè se risulta essere $T_d > T_g$.

In definitiva, per denaturare una proteina, il sistema deve trovarsi sufficientemente al di sopra di T_d e della linea T_g -contenuto d'acqua riportata in Figura 3.14, combinando così sia una denaturazione termodinamica ($T > T_d$) che una sufficiente mobilità delle catene ($T > T_g$). Ciò può essere realizzato, con riferimento alla stessa figura:

- innalzando il contenuto di plasticizzante, a basse temperature (shift dal punto 1 al punto 2);
- innalzando la temperatura, a bassi contenuti di plasticizzante (shift dal punto 1 al punto 3);
- aggiungendo una struttura demolente/denaturante (ad esempio urea) che riduca T_d per un dato contenuto di plasticizzante.

In ogni caso il grado di denaturazione può differire in base alle proteine ed ai metodi di processo.

4

Metodi classici e nuove tecnologie di processo per la formazione di film a base di zeina

4.1 – Capacità delle proteine vegetali di formare film

Le proteine vegetali sono polimeri naturali e, trattate con additivi opportuni, assumono un comportamento tipico di polimeri convenzionali.

Da qui l'idea di utilizzare le proteine vegetali per formare film da imballaggio.

Tra le proteine vegetali disponibili in natura un particolare interesse è rivolto alla zeina, che per la sua natura idrofoba è capace di formare film, per trattamento con solventi appropriati (solitamente alcool acquosi), aventi discrete proprietà di barriera all'umidità.

In particolare i film che si ottengono in seguito all'evaporazione del solvente sono lucidi e resistenti all'usura; nella loro matrice si sviluppano principalmente legami idrogeno e legami disolfuro, sebbene quest'ultimi in numero limitato per il basso contenuto di cistina nella zeina commerciale.

I film ottenuti però con tale proteina sono fragili, il che rende necessaria l'aggiunta di un plasticizzante con lo scopo di indurre una maggiore flessibilità del prodotto finito.

L'elevato costo del prodotto finale, imputabile sia al processo di estrazione delle proteine che ai costi di realizzazione dei film secondo metodi classici, è la causa principale della scarsa commercializzazione di tali prodotti e la forza spingente dei ricercatori che tentano oggi di sperimentare nuove tecnologie di fabbricazione di film a base di proteine basate sulla miscelazione diretta proteina/plasticizzante, risparmiando così i notevoli volumi di solvente altrimenti necessari nelle metodologie classiche di fabbricazione di tali prodotti.

4.2 – Plasticizzanti

Come già detto, i film di zeina pura sono fragili e richiedono l'aggiunta di plasticizzanti al fine di indurre una maggiore flessibilità del prodotto finale [6]-[41]. I plasticizzanti sono sostanze a basso peso molecolare che solitamente vengono aggiunti a polimeri rigidi [42].

La loro azione è quella di ridurre la temperatura di transizione vetrosa dei polimeri. Questi, penetrando nel polimero, separano le catene le une dalle altre in modo da facilitare i movimenti molecolari, incrementare la lavorabilità, la flessibilità e l'estensibilità del polimero stesso [43].

I plasticizzanti riducono anche la frizione tra le catene polimeriche [44]. La loro azione può però causare drammatici cambiamenti nelle proprietà meccaniche dei polimeri [45]-[46]; si è osservato infatti che all'aumentare del contenuto di plasticizzante si misura un abbassamento della forza di frattura, del modulo elastico e della viscosità della miscela biopolimero-plasticizzante.

Diversi sono i materiali che possono fungere da plastificanti: esteri, idrocarburi, acqua, alcoli, glicoli, fenoli e chetoni.

Un fattore importante che caratterizza un plasticizzante è la sua compatibilità nei confronti del polimero in esame. Quanto più è compatibile il plasticizzante tanto più esso è efficiente, la maggiore compatibilità implica infatti una maggiore diffusione del plastificante all'interno del polimero [45].

4.2.1 –Meccanismo di plasticizzazione

Ci sono diverse teorie che spiegano il meccanismo d'azione di un plasticizzante in film sintetici e edibili.

Le teorie più comuni sono la teoria della lubrificazione, la teoria del gel e la teoria del volume libero.

4.2.1.1 –Teoria della lubrificazione

Questa teoria sostiene che la resistenza alla deformazione dei film dipende principalmente dall'attrito molecolare; pertanto volendo ridurre tale resistenza e quindi rendere il film più flessibile è necessario favorire lo scorrimento tra le macromolecole costituenti il polimero. Questo è possibile attraverso l'utilizzo di un plasticizzante(L), il quale, formando legami deboli con le macromolecole del polimero(P) di energia paragonabile a quella che si instaura all'interfaccia tra un solido e un liquido lubrificante, favorisce i movimenti relativi tra le molecole della resina con conseguente diminuzione della resistenza interna della resina stessa. Da qui la funzione di lubrificante dei plasticizzanti. Ci sono due possibilità di scorrimento che possono spiegare il meccanismo di *softening* del plasticizzante: i piani di slittamento possono trovarsi nel bulk del plasticizzante oppure all'interfaccia polimero-plasticizzante a seconda che l'energia per separare le molecole polimero-polimero o solvente-solvente sia minore o maggiore dell'energia necessaria allo slittamento polimero-plasticizzante (Figura 4.1a, 4.1b). Alcune teorie propongono il rigonfiamento delle catene concomitante allo slittamento dei piani di plasticizzazione e dipendente dalla relativa polarità polimero-plasticizzante.

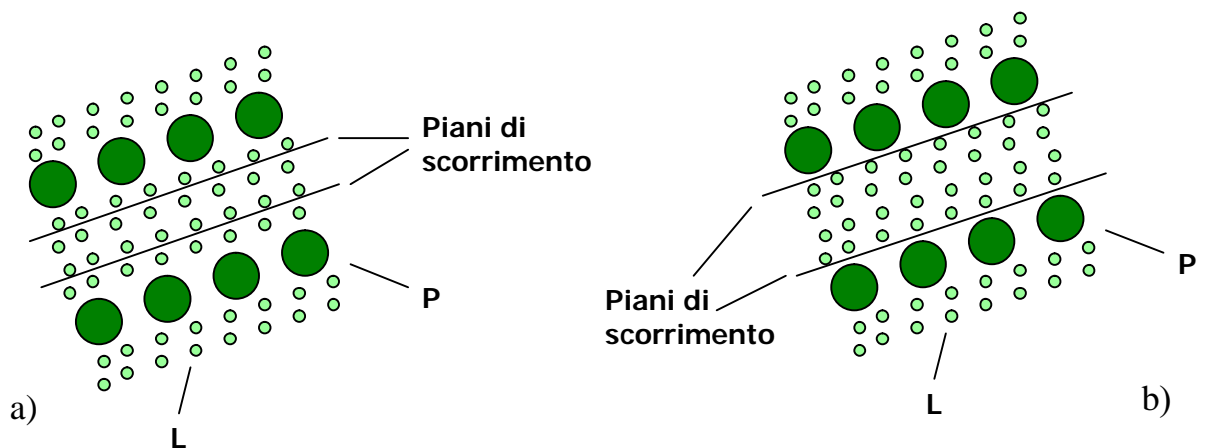


Figura 4.1: Piani di scorrimento a) nel bulk, b) all'interfaccia polimero-plasticizzante.

4.2.1.2 – Teoria del gel

Tale teoria attribuisce la rigidità di una resina non plasticizzata ad una struttura interna tridimensionale a *nido d'api o gel*, formata dall'unione libera di macromolecole, ad intervalli, lungo le catene molecolari [47]. In assenza di plasticizzante nell'emulsione di partenza infatti i centri attivi presenti sulle catene polimeriche sono liberi di legarsi tra loro secondo la struttura tridimensionale di un gel. Essendo questi punti di contatto molto vicini tra loro le celle della struttura a gel sono piuttosto piccole il che rende le resine non plasticizzate abbastanza dure e fragili. La funzione del plasticizzante è quella di rompere le unioni e nascondere i centri attivi e quindi di solvatare selettivamente le catene polimeriche in tali punti (Figura 4.2).

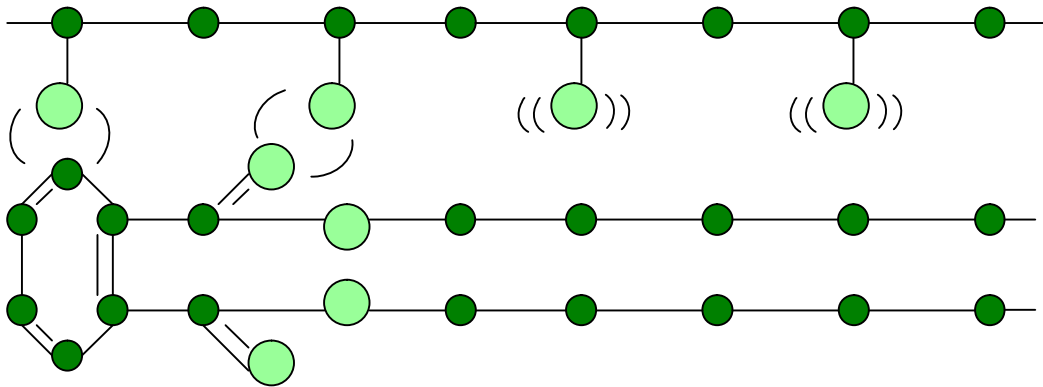


Figura 4.2: Meccanismo d'azione del plasticizzante.

In taluni casi le molecole libere di plasticizzante riescono a "gonfiare" il gel, facilitando il movimento delle molecole polimeriche e riducendo la rigidità della struttura a gel. È importante però ricordare che, nella formazione del film, solvente e plasticizzante sono in competizione per l'accaparramento dei centri attivi sulla molecola polimerica e solo in seguito all'evaporazione del solvente il ruolo del plasticizzante diventa più significativo.

4.2.1.3 – Teoria del volume libero

Questa teoria, di sicuro la più famosa tra quelle proposte, spiega il fenomeno della plasticizzazione in termini di variazione della T_g . L'ipotesi su cui si basa tale modello consiste nell'ammettere che il volume totale del polimero sia costituito da due contributi: il primo, V_0 , è dato dal volume occupato dalle molecole, ed è comprensivo, oltre che del volume fisicamente necessario, anche di quello richiesto dalle vibrazioni degli elementi strutturali attorno alle posizioni di equilibrio; il secondo contributo, V_f , è il volume libero e non necessario al materiale per l'occupazione dello spazio. Risulta pertanto:

$$V=V_0+V_f$$

Entrambi questi valori dipendono dalla temperatura; in particolare il volume V_0 sia a $T < T_g$ che a $T > T_g$ cresce con la temperatura a causa dell'aumento dell'ampiezza delle oscillazioni degli elementi strutturali mentre il volume V_f a $T < T_g$ è costante e a $T > T_g$ aumenta con la temperatura con legge lineare grazie all'espansione termica [48] che si realizza a queste temperature per una crescente mobilità molecolare. L'equazione caratteristica di tale modello, valida in un intervallo di almeno 100°C sopra la T_g è la seguente:

$$f = f_g + \Delta\alpha_f (T - T_g)$$

dove f_g è la frazione di volume libero alla T_g e $\Delta\alpha_f = \alpha_T - \alpha_T^{(g)}$ è il coefficiente di dilatazione termica del volume libero.

Questa equazione può risultare molto utile per spiegare l'effetto del plasticizzante. Infatti, poiché le molecole di plasticizzante sono normalmente più piccole del polimero e presentano un volume libero più grande, la loro aggiunta fa aumentare il volume libero del materiale ad una fissata T , riducendo la T_g del sistema miscelato così come si ricava dall'equazione caratteristica del modello. È importante sottolineare però che tale spiegazione può ritenersi valida solo nel caso in cui assumiamo che il volume libero in un sistema polimerico sia una semplice proprietà additiva. Poiché in realtà tale grandezza è il risultato di forze attrattive e repulsive tra i segmenti che lo costituiscono, e poiché in una miscela tali forze si stabiliscono tra segmenti diversi, si comprende come il significato di quanto detto non ha basi del tutto certe.

4.3 – Processi di formazione di film a base di proteine

I materiali a base di proteine sono caratterizzati da un network macromolecolare continuo, più o meno ordinato e a basso contenuto di umidità. Le interazioni presenti devono essere uniformi e numerose.

La probabilità di formare legami intermolecolari dipende dalla forma delle proteine (ed in particolar modo dal rapporto lunghezza/diametro della catena) e dalle condizioni imposte nel processo di fabbricazione. Proteine con elevato peso molecolare e aventi forma fibrosa (come il collagene) generalmente hanno buone proprietà a formare film e i film che con esse si ottengono hanno buone proprietà meccaniche [49], mentre le proteine globulari o pseudo-globulari (come la zeina) necessitano di essere distese prima di essere sottoposte al processo di formazione del network.

Ad oggi, comunque, non siamo in grado di predire le proprietà funzionali delle proteine in base alla loro struttura primaria.

La formazione di un network macromolecolare (e quindi di un film) da proteine richiede tre step fondamentali:

1. Rottura dei legami intermolecolari (non covalenti e covalenti, se necessario) che stabilizzano i polimeri nella loro forma nativa attraverso l'utilizzo di agenti fisici o chimici. Le catene polimeriche diventano così mobili.
2. Sistemazione e orientamento delle catene polimeriche mobili nella forma desiderata.

3. Formazione di una struttura (network) tridimensionale stabile. La formazione di tale struttura può essere fisica, chimica o una combinazione di entrambe. La *formatura fisica*, o *vetrificazione*, è la riduzione della mobilità molecolare per abbassamento della temperatura al di sotto della temperatura di transizione vetrosa (per esempio dopo estrusione) o per riduzione del contenuto d'acqua o degli agenti usati nello step 1 per rompere i legami intermolecolari (per essiccazione dei coating e adesivi). La *formatura chimica* è invece dovuta alla formazione di ponti disolfuro (di gran lunga più significativi) o di legami covalenti tra gruppi reattivi non sulfurei della proteina.

Nella letteratura scientifica sono descritti due metodi per produrre film a base di proteine vegetali quali la zeina (Figura 4.3):

- *Cast film*
- *Resin film*

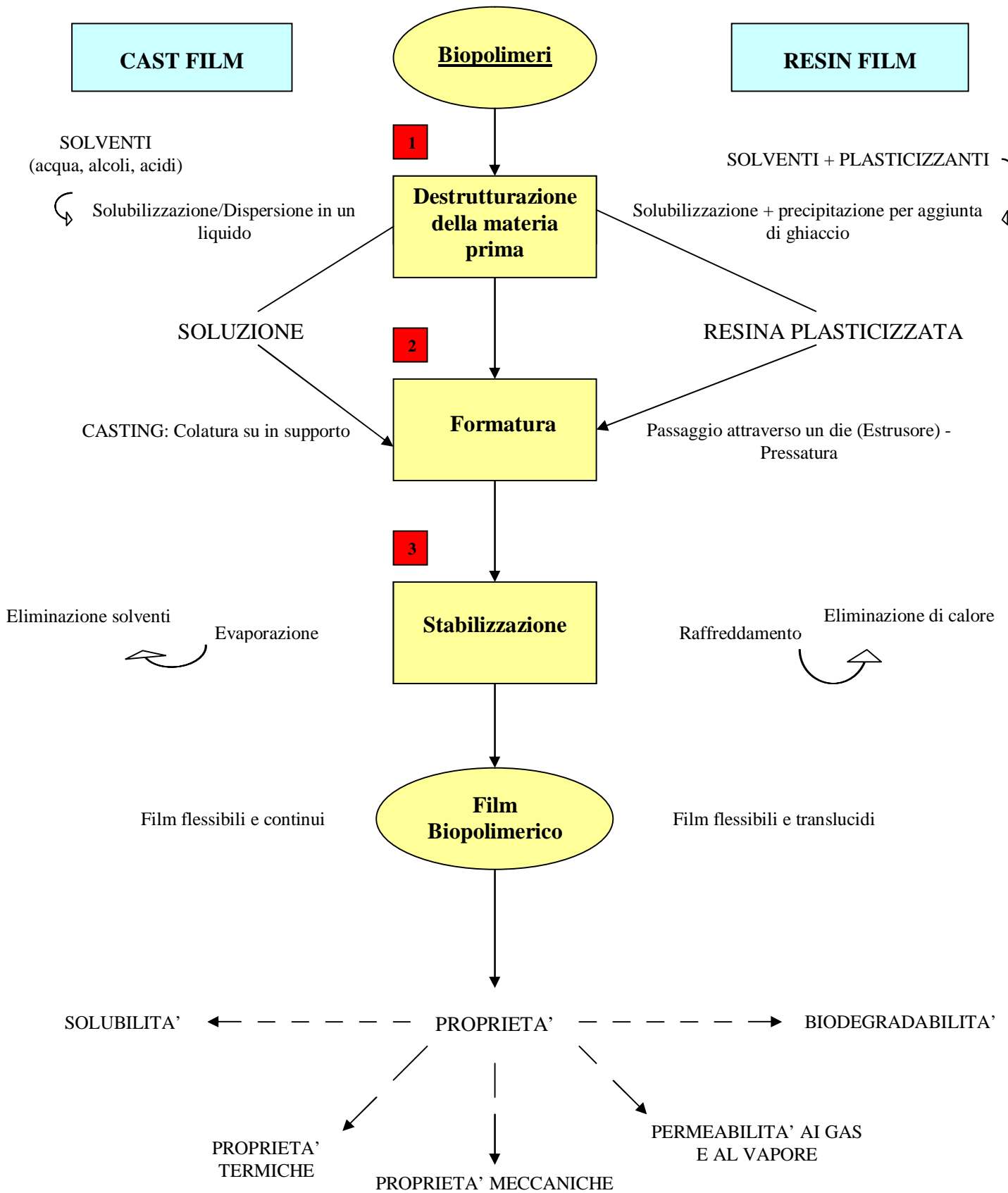


Figura 4.3: Rappresentazione schematica delle due tecnologie usate per produrre film a base di proteine vegetali.

4.3.1 – Cast film

Il processo di produzione di film attraverso casting comprende le seguenti fasi:

1. Preparazione della soluzione solvente-proteina-plasticizzante.
2. Colatura della soluzione su supporti di materiale idoneo.
3. Evaporazione-recupero del solvente a deposito del film.
4. Prelevamento del film.

In tale processo i cambiamenti strutturali più significativi avvengono soprattutto durante la prima fase come appare evidente in figura 4.4.

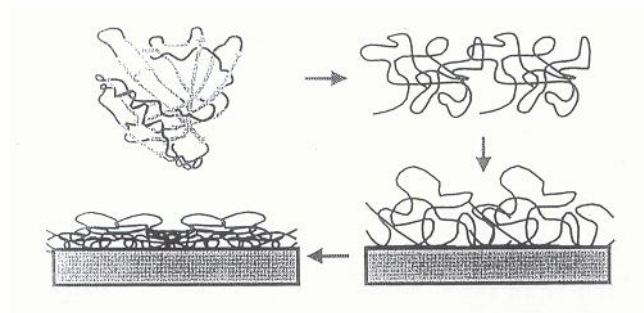


Figura 4.4: Formazione di film attraverso casting [39].

In particolare nella prima fase, che è quella relativa alla *miscelazione*, le molecole di proteina sono sospese nel solvente e soggette ad un certo grado di destrutturazione a causa di incrementi di temperatura, di sforzo di taglio e di denaturanti spesso presenti in tale fase. In seguito all'applicazione su un substrato avvengono cambiamenti strutturali sulla superficie (probabilmente diversi da quelli nel bulk) e le molecole tendono a diventare più piatte e più aggrovigliate. Questa fase è nota come *fase di formazione della struttura*. Nella fase finale, in seguito

all'evaporazione del solvente, le molecole possono strutturarsi ancora, favorendo interazioni (ioniche, idrofobe) che rendono il materiale più compatto. Quest'ultima fase è chiamata *fase di formazione del film*.

4.3.2 – Resin film

La preparazione dei resin film richiede invece:

1. Preparazione della soluzione solvente-proteina-plasticizzante.
2. Formazione della resina attraverso l'aggiunta di ghiaccio alla soluzione al fine di far precipitare la proteina plasticizzata.
3. Il precipitato è raccolto e impastato in una massa modellabile elastica.
4. La resina viene stesa su una struttura rigida e essiccata a condizione ambiente oppure formata da estrusione di pellets di resina essiccata.

Le modifiche strutturali che si realizzano in questo processo sono diverse. Analisi al SEM mostrano infatti una struttura globulare per i cast film e una struttura fibrosa per i resin film [50].

4.4 – Preparazione di film di zeina

Cast film

Diverse tecniche, che variano nella composizione delle soluzioni depositanti, nei substrati per il casting del film e nelle condizioni di essiccazione, sono state messe a punto negli studi di ricerca per ottenere film di zeina.

Hansen [27] sviluppò una formula per preparare soluzioni per film: la zeina veniva disciolta in una miscela di solventi, aggiungendo

anche un plasticizzante ed un agente antiblushing (come un estere amminoacido o un sale di un amminoalcol organico) per prevenire l'arrossamento o lo sbiancamento dei film prodotti in ambienti ad umidità relativa elevata.

Kanig e Goodman [51] prepararono una soluzione di zeina (21.6% w/v) in etanolo acquoso, con l'aggiunta di acido oleico come plasticizzante (15.9% v/v). Essa veniva versata, con un applicatore, su piatti di acciaio inossidabile placcati in cromo. Dopo l'essiccazione per 6-10 min a 51°C, i film venivano staccati senza difficoltà dai piatti.

Takenaka [52] realizzò film di zeina usando due solventi diversi, metanolo e acetone al 70%.

Mendoza [53] usò fogli di polietilene, disposti su piatti di vetro, come superficie per soluzioni alcoliche di zeina. La glicerina fu scelta come plasticizzante e l'essiccazione fu condotta a temperatura prossima a quella ambiente.

Soluzioni diluite di zeina (1-2% w/w) in etanolo acquoso furono impiegate da Guilbert [54]. I film, formati dopo essiccazione a 35°C per 24 ore, erano particolarmente flessibili senza aggiunta di plasticizzante.

Aydt [55] ottenne film di zeina usando una soluzione di etanolo acquoso e glicerina, con piccole quantità di agenti antimicrobici (acido citrico) e agenti antiossidanti. I film venivano essiccati a temperatura ambiente per 24 ore prima di essere prelevati da stampi di alluminio.

Anche Park [56] realizzò soluzioni di zeina in etanolo acquoso con glicerina e acido citrico. Le soluzioni venivano omogeneizzate e

riscaldare a 70°C prima di essere colate su piatti di vetro. Il riscaldamento favoriva la degassificazione delle soluzioni, prevenendo la formazione di bolle durante l'essiccazione.

I film di zeina hanno proprietà meccaniche che dipendono dal tipo e dall'ammontare di plasticizzante: all'aumentare della percentuale di plasticizzante il modulo elastico e lo sforzo a rottura (σ_R) diminuisce e l'elongazione percentuale (ϵ_R) aumenta.

La tabella 4.1 presenta le proprietà meccaniche dei vari film di zeina descritti in letteratura, descrivendo i plasticizzanti e le condizioni di essiccazione usati.

Referenze	% Plasticizzante	Condizioni	TS (MPa)	ϵ %
[55]	glicerolo	72 ore a 26°C, 50% rh	0.4	Fragile
[57]	42% glicerolo	2 giorni a 25°C, 50% rh	13.2	---
[56]	17-39% glicerolo-PEG	48 ore a 25°C, 50% rh	8.4-35.5	3-94
[58]	≈42% acido lattico-glicol trietilenico-sorbitolo	2 ore a 23°C, 55% rh	3.9	213.3
[59]	≈46% glicerolo-PEG	48 ore a 25°C, 50% rh	2.6	84.4
[60]	0-30% glicerolo-PEG	Notte, 52% rh	4.9-14.4	1.5-117.8
[61]	≈52% glicerolo-PEG	2 giorni a 25°C, 50% rh	1.05	130.2
[62]	50-100% acido oleico-acido linoleico	48 ore a 25°C, 50% rh	1.6-9.4	2.8-165
[63]	≈30% PEG400 oppure ≈30% PEG1000	48 ore a 22°C, 50% rh	≈16 ≈23	≈1.5 ≈2

Tabella 4.1: Proprietà meccaniche di film di zeina per casting.

Le proprietà meccaniche della zeina riportate in letteratura sono diverse. I valori per lo sforzo a rottura dei film per casting vanno da 1.05 MPa a 23 MPa. I range di elongazione vanno da 1.5% a 213%. In ogni caso tali valori sono più bassi di quelli relativi ai polimeri sintetici usualmente utilizzati nel settore dell'imballaggio. L'LDPE (low-density-polyethylene) infatti è caratterizzato da uno sforzo a rottura che varia da 9 a 17 MPa e un'elongazione percentuale di circa il 500% per condizioni di essiccamento di 50% RH e 25°C.

Ciò nonostante i film di zeina presentano caratteristiche meccaniche sufficienti per lo scopo per il quale sono realizzati.

I dati relativi ai moduli elastici di tali film non sono sempre reperibili in letteratura; le uniche informazioni riguardano i moduli elastici di film di zeina plasticizzata con glicerolo-glicol polipropilenico-glicol polietilenico, che vanno da 0.17 a 13.1MPa a seconda della concentrazione di plasticizzante (da 40 a 10%) e della temperatura di essiccazione (da 70 a 50°C).

Per quanto riguarda invece le proprietà di barriera dei film a base di zeina, dalla letteratura si ricava che generalmente i film di zeina ottenuti per casting sono caratterizzati da valori di WVP (water vapor permeability) più bassi di quelli di film a base di altre proteine [54] e più alti di quelli dell'LDPE di circa 2-4 ordini di grandezza [64] come riportato in Tabella 4.2.

Referenze	Materiali+ plasticizzante*	Condizioni	WVP (cm ³ μm/m ² d kPa)
[65]	WPI:GLY=4:1	25°C 0/77% RH	70
[66]	Z:GLY=4.9:1	21°C 85/0% RH	9.6
[64]	LDPE	38°C 90/0% RH	0.003

Tabella 4.2: Valori di WVP di film a base di proteine confrontati con i film di LDPE.

*WPI (whey protein isolate, proteina isolata del siero del latte); Z (zeina); LDPE (low-density-polyethylene; polietilene a bassa densità); GLY (glycerol, glicerolo)

La diversità di comportamento è legata alla natura dei materiali in esame: la zeina è parzialmente idrofoba, le altre proteine sono tendenzialmente idrofile mentre l'LDPE, come tutti i polimeri sintetici è totalmente idrofobo.

È importante notare che il valore di permeabilità al vapor d'acqua è influenzato sia dall'ammontare di plasticizzante che dal tenore d'umidità. In particolare il WVP aumenta all'aumentare di questi due fattori; infatti sia il plasticizzante che l'acqua incorporati nel polimero determinano un incremento della mobilità dei segmenti di catena e di conseguenza un incremento del coefficiente di permeazione effettivo [67].

Cherian [68] in particolare descrisse tale incremento di WVP in termini di aumento del volume libero tra le catene molecolari biopolimeriche.

La scarsa abilità dei film di zeina come barriera all'umidità li rende svantaggiosi per imballaggi per uso alimentare.

I valori di OP (oxygen permeability) sono invece più bassi di quelli dell' LDPE e più alti di quelli delle altre proteine.

Gennadios [57] attribuisce ciò all'elevato contenuto di α -eliche nella zeina. Le molecole di ossigeno apparentemente possono permeare più rapidamente attraverso le α -eliche di zeina rispetto alla struttura fortemente reticolata che presentano altre proteine. In Tabella 4.3 sono riportati i valori di OP di film a base di proteina confrontati con quelli di film di LDPE.

Referenze	Materiali+ plasticizzante*	Condizioni	OP ($\text{cm}^3 \mu\text{m}/\text{m}^2 \text{ d kPa}$)
[69]	SPI: GLY=2.4: 1	25°C 0%RH	6.1
[66]	Z: GLY=4: 1	30°C 0% RH	31
[70]	LDPE	23°C 50% RH	1870

Tabella 4.3 Valori di OP di film a base di proteine confrontati con film di LDPE.

*SPI (soy protein isolate, proteina di soia isolata); z (zeina); LDPE (low- density.- polyethylene, polietilene a bassa densità); GLY (glycerol, glicerolo)

Resin film

Wang e Padua [71] producono film a base di zeina attraverso un processo di estrusione di zeina plasticizzata con acido oleico. L'ammontare ottimale di plasticizzante è di 0.7 g di acido oleico/g di zeina.

Zeina, acido oleico (70g/100g di zeina) e monogliceride distillata-130 (5g DMG-130/100g di zeina) sono disciolti in 75% di etanolo e agitati ad elevata velocità per 10 minuti a 60-65%. La soluzione è allora versata in ghiaccio. Il precipitato è raccolto e alimentato in un Farinografo per 30 minuti in modo da ottenere una massa coesiva (resina). La resina così ottenuta è alimentata sia in un estrusore monovite che in uno bivate. Nel primo caso le zone dell'estrusore sono 3 nel secondo caso sono 5. La temperatura delle varie zone è la temperatura ambiente.

In Tabella 4.4 sono riportate le proprietà meccaniche dei film ottenuti per estrusione:

Estrusore	σ_R (Mpa)	ϵ_R %	E (Mpa)
monovite	3.1±0.3	120.6±6.9	101.1±6.7
bivate	4.2±0.2	101.1±12.8	99.4±9,2

Tabella 4.4: Proprietà meccaniche di film di zeina ottenuti per estrusione di resina in pellets [71].

Le piccole differenze nello sforzo a rottura e nell'elongazione a rottura tra i campioni estrusi con singola vite o doppia vite sono da attribuire al maggiore effetto di miscelazione che si realizza nell'estrusione bivate che determina una maggiore espulsione di acqua e quindi una microstruttura del prodotto finale più compatta. I film di zeina ottenuti sia per estrusione monovite che per bivate

mostrano in particolare più alta elongazione a rottura, più basso sforzo a rottura e più basso modulo di Young dei campioni non estrusi. Analisi al SEM di sezioni di film ottenuti per casting e per estrusione di resina di zeina mostrano una struttura più compatta in questo secondo caso a dimostrazione che in questo caso le interazioni tra la matrice proteica e il plasticizzante sono più forti.

Per quanto riguarda le proprietà di barriera di tali film solo i valori di WVP sono stati calcolati. Nella Tabella 4.5 sono riportati i valori di WVP di film di zeina estrusi e confrontati con i film di zeina ottenuti per casting e usando come plasticizzante l'acido oleico.

Processo	Materiali+ plasticizzante	Condizioni	WVP (cm ³ µm/m ² d kPa)
Estrusione	Zeina:OA=1.4:1	25°C, 100/0% RH	3.7
Estrusione	Zeina:OA=1.4:1	25°C, 51/0% RH	1.92
Casting	Zeina:OA=2:1	25°C, 53/0% RH	1.58

Tabella 4.5: Valori di WVP di film di zeina estrusi e confrontati con quelli ottenuti per casting [72].

La stessa formulazione fu utilizzata da Wang e Padua [71] per realizzare film di zeina attraverso un processo di filmatura in bolla.

4.5 – Nuove tecnologie

Un interesse sempre maggiore oggi è dedicato alla possibilità di usare le tecnologie di produzione, impiegate per i polimeri

termoplastici convenzionali, per le proteine. Rispetto a quelli di origine naturale, i polimeri sintetici termoplastici possono essere fusi semplicemente applicando il calore. Purtroppo, l'alta cristallinità e le forti interazioni intermolecolari presenti nelle proteine conducono a una degradazione termica del materiale, senza mai realizzare il melt flow. Quest'ultimo è tuttavia possibile se si utilizza unitamente al calore e allo shear un plastificante adatto, che può fungere da lubrificante interno per ottenere una discreta mobilità molecolare delle macromolecole, necessaria per il melt flow. Così come i materiali termoplastici basati sull'amido, anche le proteine possono essere processate sfruttando il loro comportamento termoplastico. In questo modo, parecchi prodotti possono essere costituiti attraverso processi termici o termomeccanici quali la miscelazione, l'estrusione e la filmatura in bolla. In tutti questi metodi, lo shear ed il calore sono applicati per produrre un flusso macromolecolare. La possibilità di processare le proteine utilizzando direttamente le tecnologie di trasformazione termoplastiche è collegata all'esistenza di una temperatura di transizione vetrosa (T_g).

Sopra la T_g , il materiale dovrebbe fluire sotto lo shear applicato e questo è possibile solo se interazioni o crosslink intermolecolari non sono presenti. I polimeri di origine naturale sono stati modificati chimicamente nel passato (acetato della cellulosa), per ridurre i legami ad idrogeno e ridurre la T_g del biopolimero.

Nel caso della zeina, una riduzione della T_g , necessaria per evitare i fenomeni di degradazione durante il processo di produzione, può essere realizzata usando un plastificante adatto, le cui caratteristiche fisico-chimiche sono ottimizzate sulla base delle proprietà idrofilliche/idrofobiche delle proteine.

Per modificare l'organizzazione strutturale e le forti interazioni intermolecolari presenti nelle proteine, uno shear intenso deve essere applicato durante il riscaldamento e la miscelazione con i plastificanti.

Sebbene in letteratura siano presenti pubblicazioni riguardanti l'estrusione di zeina, queste coinvolgono la necessità di realizzare una resina (come descritto nel paragrafo 4.4, [71] o una miscela di proteina-plasticizzante-acqua [72] prima dell'estrusione. Nel 2007, Selling et al. produssero infatti nastri di zeina plasticizzata con Trietilen glicole (TEG) utilizzando la seguente procedura. La zeina era prima trattata con acqua e TEG in un miscelatore Hobart per preparare una miscela iniziale da alimentare all'estrusore. Dopo l'estrusione, il materiale termoplastico ottenuto veniva raccolto e convertito in pellets da alimentare nuovamente all'estrusore per produrre nastri. Entrambi questi processi sono lunghi e dispendiosi e non utilizzabili per produrre film di zeina su larga scala.

Più recente è invece il tentativo dei ricercatori di preparare film a base di proteine attraverso una tecnologia di estrusione diretta proteina-plasticizzante; in quest'ultimo caso gli step relativi alla destrutturazione della materia prima e della formatura sono combinati in una singola operazione (essi hanno luogo infatti entrambi all'interno dell'estrusore).

Finora però non è stata pubblicata nessuna ricerca relativa a tali processi.

Una tipica procedura per una miscelazione intensiva proteina-plasticizzante, come quelle descritte, prevede che polimero e plasticizzante subiscano una rapida e parziale miscelazione estensiva prima di essere introdotti nel miscelatore o nell'estrusore.

La necessità di introdurre simultaneamente la proteina e il plasticizzante deriva, da quanto detto finora dal fatto che gli additivi, oltre a garantire le desiderate proprietà meccaniche, costituiscono la fase fluida indispensabile per il processo.

Il calore necessario per la realizzazione del processo proviene da due fonti:

$$\begin{aligned} \text{calore totale} &= [\text{calore esterno}] + [\text{calore viscoso}] = \\ &= [(c \times \Delta T + \lambda_f) \times \text{massa}] + [\text{calore viscoso}] \end{aligned}$$

- la prima è il calore fornito esternamente (per esempio attraverso resistenze elettriche) per portare il sistema alla desiderata temperatura e farlo eventualmente fondere;
- la seconda è il calore generato per dissipazione viscosa in un fluido sottoposto ad elevato shear.

Un'aliquota considerevole di calore necessario per ottenere il materiale polimerico deriva pertanto dal lavoro speso dall'apparecchiatura di processo ed aumenta all'aumentare della velocità di lavoro e quindi della potenza erogata dalla macchina (30-60% del calore esterno a 50-80 rpm).

L'elevato riscaldamento per dissipazione viscosa di energia sotto condizioni di elevato shear viene sfruttato in alcuni casi per rammollire il polimero prima dell'introduzione di altri additivi.

Nel caso delle proteine, introducendo contemporaneamente additivo (liquido) e polimero (solido), si limita l'incremento di temperatura risultante dal riscaldamento viscoso, necessario per due motivi fondamentali:

- evitare il rischio di degradazione prematura, favorendo in alcuni sistemi successive reazioni di ramificazione/reticolazione (cottura);
- mantenere un buon grado di shear durante la miscelazione; basso shear (eccesso di fase liquida) riduce l'azione di miscelazione intensiva richiedendo tempi più lunghi e/o temperature più elevate.

La scelta delle condizioni operative da impiegare è complicata dalla forte variabilità delle proprietà del materiale durante la miscelazione, in seguito a variazioni della temperatura e a trasformazioni che modificano la struttura molecolare del polimero.

Gli sforzi termomeccanici che si sviluppano durante la miscelazione possono infatti favorire degradazione o ramificazione del materiale (in letteratura sono frequenti esempi di resine sintetiche che ramificano grazie alla ricombinazione dei radicali formati in seguito ad una parziale degradazione [73]); avanzati stati di ramificazione possono inoltre favorire reticolazioni delle macromolecole.

Tali trasformazioni, comportando variazioni del peso molecolare interno, si riflettono sulla spesa energetica di miscelazione, sulle proprietà reologiche e meccaniche del materiale.

In particolare le reazioni di degradazione, caratterizzate da una diminuzione del peso molecolare, comportano:

- una riduzione della viscosità del sistema ($\eta = K M^a$);
- una riduzione delle proprietà meccaniche del materiale (maggiore fragilità);
- una riduzione della potenza erogata dalla macchina.

Reazioni di ramificazione e reticolazione, caratterizzate da un incremento del peso molecolare, comportano invece:

- un aumento della viscosità del sistema;
- un aumento del modulo elastico per la maggiore rigidità associabile al maggior numero di entanglement (tale influenza si avverte solo a temperature maggiori di quella di transizione vetrosa);
- un aumento di tensione e allungamento alla rottura;
- la necessità di operare con macchine più robuste per i maggiori stress di taglio che si sviluppano nei materiali a più alta viscosità.

4.6 – Obiettivo parte I

In questa prima parte del progetto di dottorato è stata valutata la possibilità di realizzare film termoplastici di zeina commerciale attraverso un processo diretto di filmatura in bolla.

Tuttavia, dal nostro punto di vista, il problema più grande nell'utilizzare i biopolimeri sta nella difficoltà di avere sempre una stessa materia prima. È infatti noto, che la struttura macromolecolare dei polimeri naturali, dipende fortemente da numerosi fattori come le risorse e la tecnica e condizioni di estrazione [74]. In questo contesto, la filmabilità di quattro differenti lotti di zeina è stata analizzata.

Caratterizzazioni termiche e strutturali sono state realizzate sui differenti lotti in modo da valutare il grado di termoplastificazione e la conformazione proteica. Inoltre, è stato osservato che l'incremento della deformabilità del fuso e le proprietà elongazionali

sono cruciali nel processo di filmatura in bolla dei polimeri termoplastici [75]. Per questo motivo il comportamento reologico elongazionale dei film di zeina è stato analizzato e una correlazione tra struttura molecolare, comportamento reologico in elongazione uniassiale e proprietà di filmabilità è stata determinata.

5

Materiali e Metodi

5.1 – Materiali

Quattro differenti lotti (A, B, C e D) di zeina di mais (cod.:Z3625) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Italia). I numeri dei differenti lotti erano 20K0243 (A); 02K0054 (B); 065K0110 (C); 093K1055 (D). Il Polietilenglicole 400 (PEG 400) è stato utilizzato come plasticizzante ed è stato acquistato dalla Fluka (Italia). I materiali così “come ricevuti” (polveri) sono stati sottoposti ad analisi termica, spettroscopica (FTIR) elettroforetica (SDS-Page) e diffrazione ai raggi X.

I materiali termoplastici (Zeina termoplastica in miscelatore, TPZm) ottenuti secondo la procedura descritta nel paragrafo 5.2 sono stati sottoposti anche a caratterizzazioni reologiche elongazionali. I film ottenuti attraverso la tecnologia di filmatura in bolla (paragrafo 5.9, zeina termoplastica in estrusore, TPZe) sono stati sottoposti invece a caratterizzazioni di tipo meccanico. Tutti i materiali, tranne nei casi in cui è diversamente specificato, sono stati condizionati prima di essere testati a temperatura ambiente e al 50% di umidità relativa per due giorni.

5.2 – Termoplastificazione in miscelatore (TPZm)

La zeina in polvere, così come ricevuta dal fornitore (contenuto di umidità, calcolato dall'analisi termogravimetrica, pari circa al 7wt% per tutti i lotti), è stata miscelata con il plasticizzante in un beaker con una spatola in modo da ottenere un impasto omogeneo. L'impasto è stato allora sottoposto ad uno stress termico e meccanico in un miscelatore controrotante (Rheomix 600 Haake, Germania) connesso ad un'unità di controllo (Rheocord 9000 Haake, Germania) per la termoplastificazione. La torque e la temperatura del melt sono stati registrati durante il processo di miscelazione in modo da ottenere la storia del processo di miscelazione. La camera di miscelazione (volume pari a 50 cm³) è stata riempita con 50 g totali di massa in tutti gli esperimenti in un tempo approssimativamente di 3 min a 5 rpm. Un contenuto di plasticizzante del 25 wt.% è stato utilizzato. La temperatura di miscelazione, T_{mix} , la velocità di rotazione, N , e il tempo di miscelazione, t , sono stati fissati a 70°C, 50rpm e 10min rispettivamente [76].

Una pressa a caldo P300P (Collin, Germania) è stata poi utilizzata per preparare film di zeina termoplastica. I materiali raccolti dal miscelatore sono stati riscaldati alla stessa temperatura di miscelazione e pressati a 50 bar per 10 minuti e successivamente raffreddati a 30°C sotto pressione. Dalla zona centrale dei film sono stati ricavati i campioni per le differenti caratterizzazioni.

5.3 – Analisi termiche

Misure termogravimetriche (TGA) e calorimetriche a scansione (DSC) sono state condotte sia sulle polveri che sui termoplastici al fine di valutare l'effetto del processo di termoplasticizzazione sulle proprietà termiche per i differenti lotti di zeina analizzati. In particolare, gli esperimenti di TGA sono stati condotti in una TGA 2959 (TA Instruments, USA) in un range di temperatura che va da 30°C a 1000°C a 10°C/min sotto atmosfera inerte. Per le misure al DSC (DSC Q 1000, TA Instruments, USA), invece, al fine di valutare la temperatura di transizione vetrosa (T_g), i campioni sono stati prima preriscaldati da -70 a 200°C a 10°C/min e mantenuti a questa temperatura per 10 minuti, poi raffreddati velocemente a 30°C e riscaldati a 10°C/min fino a 200°C.

5.4 – Analisi Dinamico-Meccanica (DMA)

L'analisi dinamico meccanica è stata utilizzata per determinare la T_g dei differenti lotti di zeina termoplastica. L'analisi dinamico meccanica è, infatti, complementare alla calorimetria a scansione differenziale. In particolare essendo molto sensibile ai movimenti molecolari che danno origine alla transizione vetrosa è una tecnica

di calcolo della Tg molto più precisa del DSC. Le proprietà dinamiche meccaniche dei film prodotti sono state valutate con un analizzatore dinamico meccanico (Tritec 2000). In modalità dual cantilever bending, una frequenza di oscillazione di 1 Hz (spostamento pari a 0.03mm) è stata applicata al centro del campione (5mm di lunghezza libera) e la temperatura è stata variata da -20°C a 100°C con una velocità di riscaldamento di 2°C/min. La Tg è stata calcolata nel picco di $\tan\delta$.

5.5 – Diffrazione ai raggi X

L'effetto del processo di miscelazione sulla struttura della zeina dei differenti lotti studiati, è stato analizzato attraverso la diffrazione ai raggi X. I diffrattogrammi dei differenti lotti di zeina (polveri e TPZm) sono stati ottenuti con un diffrattometro Philips PW1710 con una radiazione Cu-K α ($\lambda=1.54\text{\AA}$) ad un voltaggio di 40 kV e 30 mA. I campioni sono stati scannerizzati nel range di angolo di diffrazione che va da $2\theta=5$ a 60 con una velocità di scansione di 1°/min a temperatura ambiente.

5.6 – Spettroscopia FTIR

La spettroscopia FTIR è stata utilizzata per analizzare la struttura secondaria dei differenti lotti di zeina prima e dopo il processo di termoplastificazione. Gli spettri di zeina (polvere e TPZm) sono stati registrati nel range di frequenza che va da 4000 a 500 cm^{-1} con una risoluzione pari a 128 scan a 2 cm^{-1} . La deconvoluzione degli spettri così ottenuti è stata realizzata con il software Origin in modo da evidenziare i picchi relativi alla struttura ad α -elica e alla

struttura β -foglietto caratteristici delle proteine naturali. L'area sottesa da tali picchi è stata calcolata e valutata come indice dei differenti contenuti di α -eliche e β -foglietti intramolecolari presenti nei diversi lotti in esame.

5.7 – Analisi elettroforetica SDS-Page

I diversi lotti di zeina in polvere sono stati caratterizzati mediante SDS-Page secondo la procedura descritta da Gao et al.[77] in modo da valutare il peso molecolare dei peptidi presenti nei differenti lotti di zeina. In particolare sono state caricate due diverse quantità di polvere per ciascun lotto in modo da verificare la presenza di cambiamenti legati all'effetto massa.

5.8 – Misure reologiche

-misure di viscosità elongazionale

Solitamente, la processabilità dei polimeri fusi è correlata alle proprietà di flusso in shear. Tuttavia, ci sono situazioni in cui due polimeri pur avendo le stesse proprietà in shear presentano un comportamento piuttosto diverso in processi come l'estrusione piana e la filmatura in bolla., indicando che le proprietà di shear in questi casi non sono sufficienti da sole a caratterizzare i fluidi polimerici. [75]. In questi casi la differente processabilità dei polimeri può essere attribuita a differenze nella architettura molecolare dovute a ramificazioni e/o alla presenza di componenti ad alto peso molecolare[78-79-80] che non sono rilevabili in shear ma che sono più visibili in deformazioni estensionali. In effetti, una

delle proprietà chiave nel processo di filmatura in bolla è la viscosità estensionale [81-82]. È stato infatti osservato che la stabilità della bolla, la deformazione biasciale e l'uniformità di spessore sono strettamente correlati alla viscosità elongazionale. Misure di viscosità elongazionale sono state effettuate mediante un reometro ARES LS (Rheometric Scientific) dotato di un tool elongazionale SER-HV-A01 (Xpansion Instrument, USA) in modo da stabilire una correlazione tra comportamento reologico elongazionale uniassiale e filmabilità per i differenti lotti di zeina studiati. La temperatura di prova è stata fissata a 95°C mentre la Hencky strain rate (o anche velocità di deformazione) $\dot{\epsilon}_0$ è stata variata da 0.03 s⁻¹ a 0.1s⁻¹

-misure di haul off force

Un'altra importante proprietà reologica nel processo di filmatura in bolla è l'haul off force [82]. Essa è definita come la forza necessaria per sostenere il peso del polimero quando la bolla è formata. Misure dell' haul off force sono state realizzate sui differenti TPZm con un reometro capillare (RH7, Bohlim Instruments, Germania), equipaggiato con un sistema per la misura della melt strength. Il materiale è stato preconditionato a RH=15% e Tamb per 60h. La temperatura del reometro è stata settata a 102°C per il lotto A e a 115°C per gli altri lotti. Il barrel ha un diametro di 15mm mentre il diametro del die del capillare è di 2mm. Il polimero fuso è stato estruso dal die ad una velocità del pistone di 20mm/min. Il polimero fuso estruso dal capillare è stato serrato tra due ruote contro rotanti e la velocità di take-up è stata incrementata da 5m/min a 100m/min ad accelerazione costante. L' haul off force (in

cN) è stata misurata come una funzione della draw ratio ($v_{\text{stiro}}/v_{\text{uscita capillare}}$) fino alla rottura della fibra.

5.9 – Filmatura in bolla di materiali a base di zeina termoplastica (TPZe)

La tecnologia della filmatura in bolla consiste nell'estrusione di un tubo di diametro relativamente piccolo che, prima della solidificazione, viene letteralmente gonfiato; in tal modo si ottiene un aumento di diametro ed una forte riduzione dello spessore. In Figura 5.1 è mostrato lo schema di un impianto di filmatura in bolla.

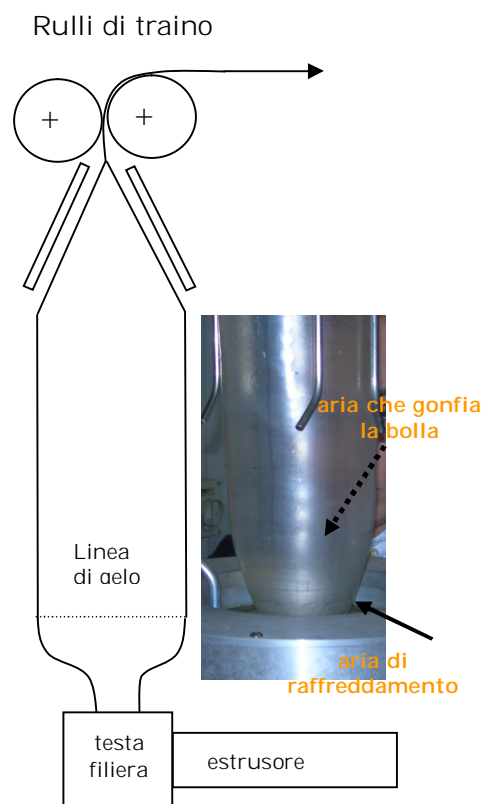


Figura 5.1: Filmatura in bolla.

Il livello di pressione (che è uno dei fondamentali parametri di lavoro) viene regolato insufflando o estraendo l'aria dal tubolare

per mezzo di un condotto realizzato nella testa di estrusione. Il tubolare, che si gonfia come se fosse una bolla di polimero, è contemporaneamente trainato dall'alto per mezzo di una coppia di rulli ben serrati tra loro in modo da garantire la perfetta tenuta dell'aria all'interno della bolla. Durante il processo, la bolla (vale a dire il film) si raffredda e solidifica. A causa dello stiro in direzione longitudinale e del soffiaggio, il fuso polimerico è sottoposto ad un flusso elongazionale biassiale. L'operazione è controllata dall'ammontare di aria di raffreddamento, dall'ammontare di aria all'interno della bolla, dalla velocità di rulli di traino, dalla temperatura del fuso, dal diametro del die ed anche dalle proprietà del polimero. Il processo di filmatura in bolla è infatti possibile solo se il polimero possiede i giusti requisiti, soprattutto reologici. Difatti, proprio perché il polimero, durante l'espansione della bolla deve subire una orientazione senza rompersi, è indispensabile un'alta resistenza del fuso (la cosiddetta *melt strength*). La zeina e il PEG400 (al 25%wt) sono stati premiscelati a mano e poi alimentati in un estrusore bivate controrotante (Haake model CTW100, Germania) a $T=(30,60,80,80^{\circ}\text{C})$ e a 80 rpm. La scelta di questa matrice e di questi parametri di processo è legata all'elevata deformabilità che il sistema presenta, quando è processato in queste condizioni e che lo rende particolarmente adatto alla produzione di film. Gli spaghetti estrusi sono stati allora pellettizzati e i pellets sono stati preconditionati per 60h in un essiccatore contenente una soluzione satura di cloruro di litio in modo da garantire un tenore di umidità del 15% ed ottenere un materiale adatto al processo di filmatura in bolla. La filmatura in bolla è stata realizzata con un impianto da laboratorio (Collin E 20T, Germania). Il profilo di temperatura (vedi Tabella 6.5 per i profili ottimali di temperatura dei differenti lotti di zeina), la velocità dei rulli di traino e la pressione all'interno della bolla sono

stati adattati durante il processo in modo da ottenere un buon risultato quando possibile (bolla stabile ed omogenea con spessori ridotti). La velocità di rotazione della vite dell'estrusore è stata invece settata ad un valore di 43rpm per tutti i TPZe.

5.10 – Caratterizzazione dei film-test meccanici

Un dinamometro Instron, modello 4204 (USA) è stato utilizzato per misurare le proprietà meccaniche dei film realizzati mediante il processo di filmatura in bolla in accordo al metodo standard ASTM D1708-02. Le curve di sforzo-deformazione, il modulo di Young, lo sforzo e la deformazione a rottura sono stati registrati impostando una velocità della traversa mobile pari a 10mm/min. Cinque campioni tagliati nella direzione macchina per ogni film sono stati testati e i risultati sono stati ottenuti come media dei valori ottenuti per ciascun campione.

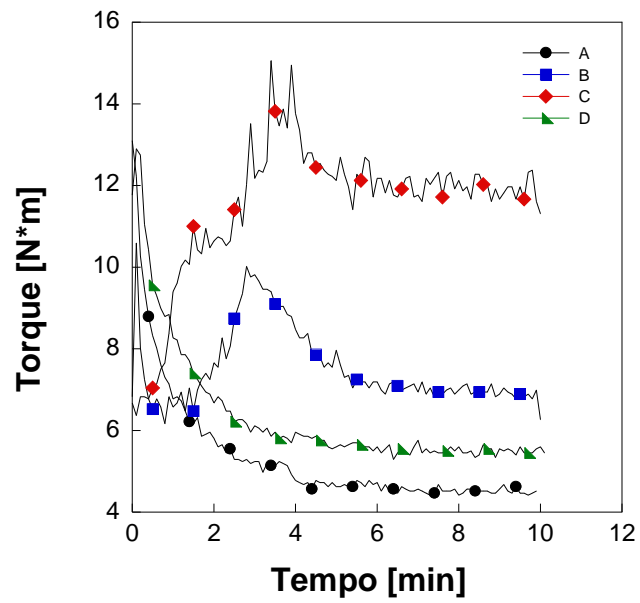
6

Analisi dei risultati e conclusioni

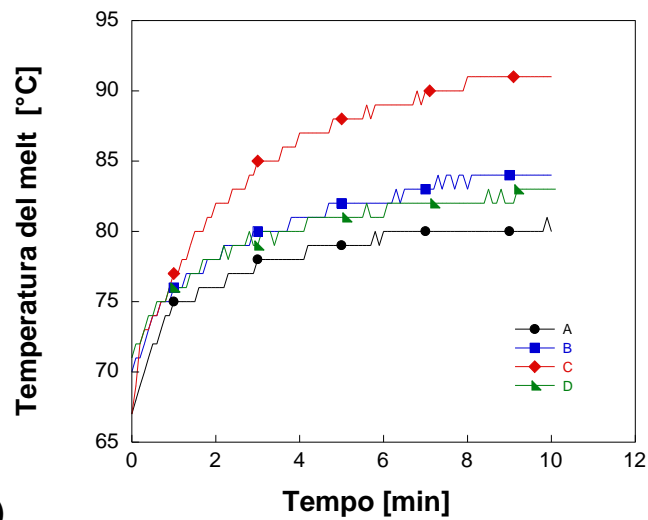
6.1 – Termoplastificazione (TPZm)

Le Figure 6.1a e 6.1b mostrano l'evoluzione della torque (coppia torcente) e della temperature del fuso (melt) nel tempo durante il processo di termoplastificazione della zeina con il PEG 400 al 25%wt per i lotti A, B, C and D.

Generalmente, le curve ottenute durante la termoplastificazione di sistemi proteina-plasticizzante [83] sono caratterizzate da un tempo di induzione iniziale seguito da uno step di incremento della torque ad un valore massimo e da un decremento continuo fino ad un valore stazionario ottenuto quando anche la temperatura del melt diventa costante (Figura 6.1b). Inoltre dopo che la plasticizzazione è completa la torque può diminuire indicando una degradazione, o può aumentare, indicando l'insorgere di un fenomeno di reticolazione o di perdita di plasticizzante [84-85]. Come mostrato in Figura 6.1a, questo comportamento è più evidente per i lotti B e C mentre, per i lotti A e D, l'incremento della torque è immediato, con assenza del tempo di induzione. Dopo la plasticizzazione, il valore della torque è costante; nessun fenomeno di perdita di plasticizzante, di reticolazioni o di degradazioni è stato osservato quindi per tutti i lotti di zeina. Questi risultati suggeriscono che la diffusione del plasticizzante all'interno della struttura proteica e la formazione di legami proteina-PEG 400 è più semplice per i lotti A e D con una conseguente riduzione del tempo necessario per avere una termoplastificazione completa.



a)



b)

Figura 6.1: Evoluzione della torque (1a) e della temperatura del melt (1b) durante il processo di miscelazione dei differenti lotti di zeina e PEG 400 (25%wt di plasticizzante, 50rpm, 70°C, 10 min.).

6.2 – Proprietà termiche

-TGA

La Figura 6.2 riporta i risultati TGA per il PEG 400 e per la zeina in polvere e TPZm del lotto A.

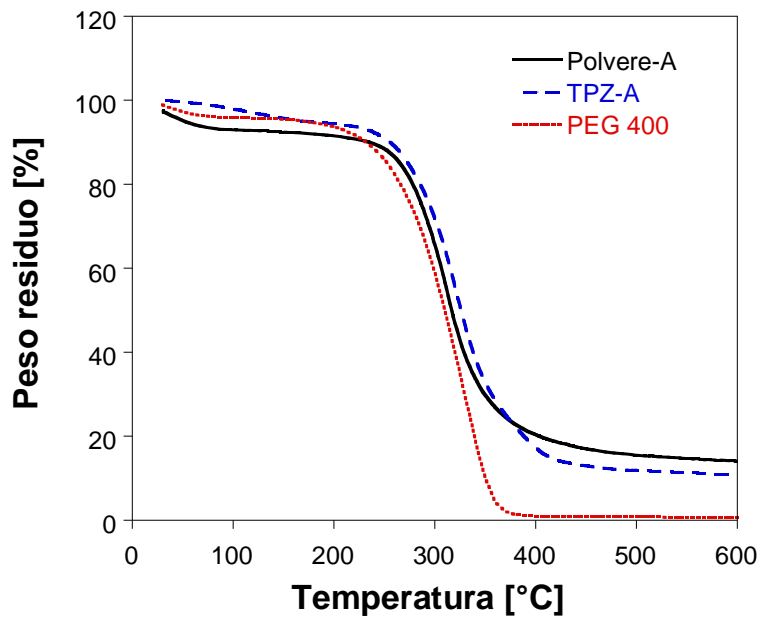


Figura 6.2: Curve TGA per il PEG 400 e per la zeina in polvere e TPZm del lotto A.

Le curve TGA degli altri lotti sono molto simili e quindi non riportate per semplicità. La curva TGA della polvere mostra una piccola perdita di peso nel range di temperatura che va da 30 a 170°C, associata all'evaporazione dell'acqua, mentre un decremento significativo del peso ha inizio a 270°C e può essere associato alla degradazione della proteina. I risultati della TGA della TPZm mostrano una perdita d'acqua come la polvere ma traslata a temperature più alte (range che va da 100 a 170°C) a causa dell'interazione che si determina tra le molecole d'acqua e la zeina

termoplastica. Inoltre, in questo caso la presenza del plasticizzante e, possibilmente, il processo di miscelazione sono responsabili di un anticipo del processo di degradazione, che in questo caso ha inizio a 240°C. Questi risultati indicano comunque che durante il processo di estrusione di questi materiali, bisogna stare attenti a fenomeni di perdita di umidità dal fuso polimerico e di fenomeni di degradazione sopra i 240°C.

-Temperatura di transizione vetrosa

La temperatura di transizione vetrosa della zeina in polvere del lotto A, B, C e D è stata calcolata mediante la DSC come temperatura media associata al cambio del segnale di heat flow. La Tg del TPZm è stata invece misurata sia con la DSC che con la DMA dal picco di $\tan\delta$. In particolare due picchi di $\tan\delta$ sono stati osservati per tutti i lotti eccetto che per il lotto C. A questi due picchi sono probabilmente associate le transizioni vetrose di due sottofrazioni di zeina con differenti pesi molecolari [86]. I risultati DSC e DMA per la zeina dei lotti A, B, C e D sono mostrati in tabella 6.1.

Polvere	DSC Tg (°C)	TPZm	DSC Tg (°C)	DMA Tg ₁ (°C)	DMA Tg ₂ (°C)
A	168	A	47	49	58
B	165	B	50	44	58
C	163, 170	C	48	--	58
D	163	D	54	47	58

Tabella 6.1: Tg per i differenti lotti di zeina in polvere e TPZm.

Entrambi i dati DSC e DMA evidenziano una significativa riduzione della Tg (pari circa a 100°C) per tutti i lotti di zeina in presenza del plasticizzante, suggerendo una buona compatibilità del PEG 400 con il biopolimero zeina e l'efficacia del processo di plasticizzazione per tutti i lotti studiati.

Beck et al. [87] hanno misurato una Tg di 90°C per il sistema zeina-20%wt di PEG 300 preparato mediante un processo di miscelazione in presenza d'acqua, pressatura ed essiccamento. Considerando la variabilità della risorsa del biopolimero e del metodo di plasticizzazione possiamo ritenere questo risultato in accordo con i nostri dati.

6.3 – Diffrazione ai raggi X

Le Figure 6.3a e 6.3b mostrano rispettivamente i pattern di diffrazione della zeina in polvere e termoplastica del lotto B. Anche in questo caso le curve per gli altri lotti sono simili e quindi non riportate per semplicità.

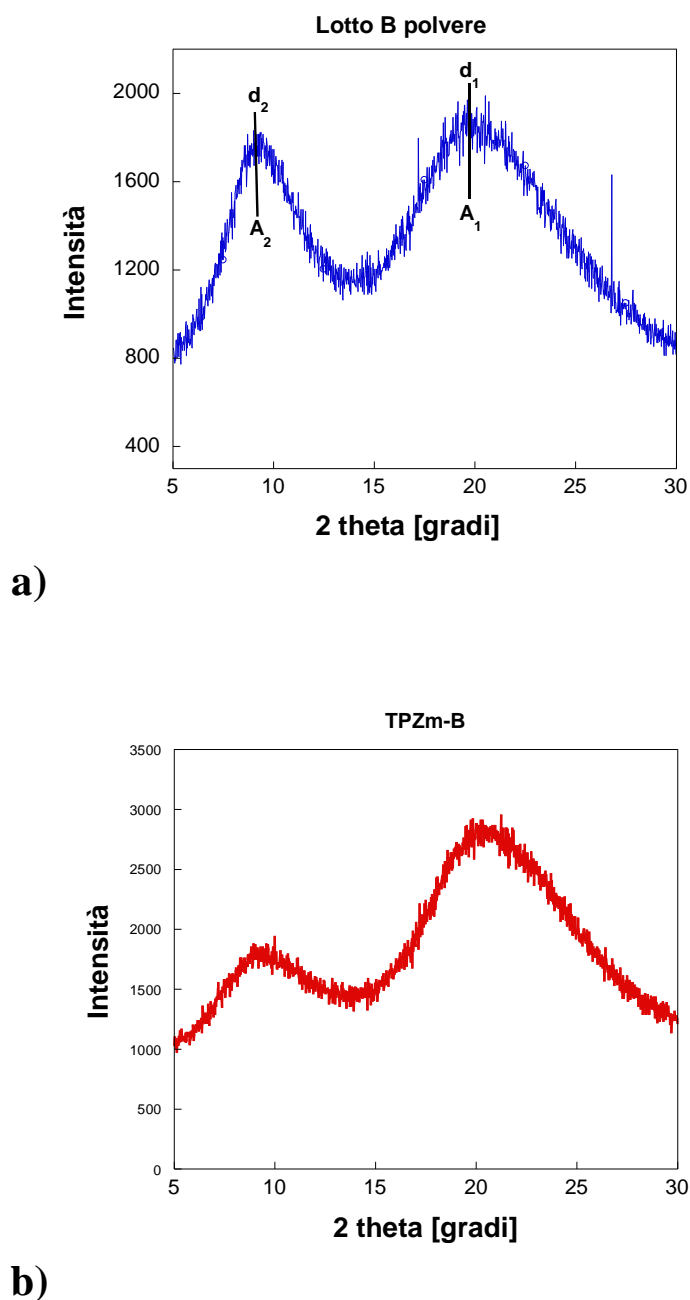


Figura 6.3: Diffrattogrammi della zeina in polvere a) e TPZm b) del lotto B.

In entrambi i diffrattogrammi sono presenti due picchi caratteristici a $2\theta=9.5$ e 20 . A questi due picchi corrispondono due d-spacing a 9.5 (d_2) e 4.5 Å (d_1) che sono state attribuite rispettivamente ad una distanza caratteristica dell'impacchettamento tra eliche (inter-helix packing) e una distanza lungo lo scheletro dell'elica (α -helix

backbone) in accordo ad Arndt e Riley [88], che studiarono la diffrazione ai raggi X di una serie di α -proteine naturali. Essi stabilirono che la d-spacing di α -eliche varia da 4 a 5 Å e quella relativa all'impacchettamento di eliche varia da 9.5 a 11.5 Å. La differenza sostanziale tra i pattern di diffrazione della zeina in polvere e termoplastica sta nell'intensità relativa del picco a $2\theta=9.5$. La Tabella 6.2 riporta le d-spacing e il rapporto tra le aree (A_2/A_1) per tutti i lotti di zeina sia in polvere che termoplastica.

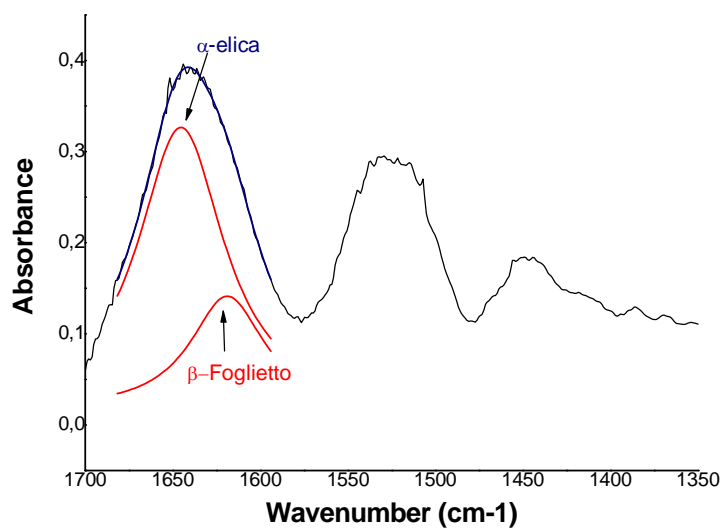
Polvere	d_1	d_2	A_2/A_1	TPZm	d_1	d_2	A_2/A_1
A	4.43	9.49	0.55	A	4.36	9.43	0.45
B	4.48	9.49	0.56	B	4.32	9.36	0.42
C	4.45	9.56	0.52	C	4.33	9.56	0.47
D	4.46	9.56	0.55	D	4.33	9.49	0.49

Tabella 6.2: d-spacings e rapporto A_2/A_1 per i lotti A, B, C e D in polvere e TPZm.

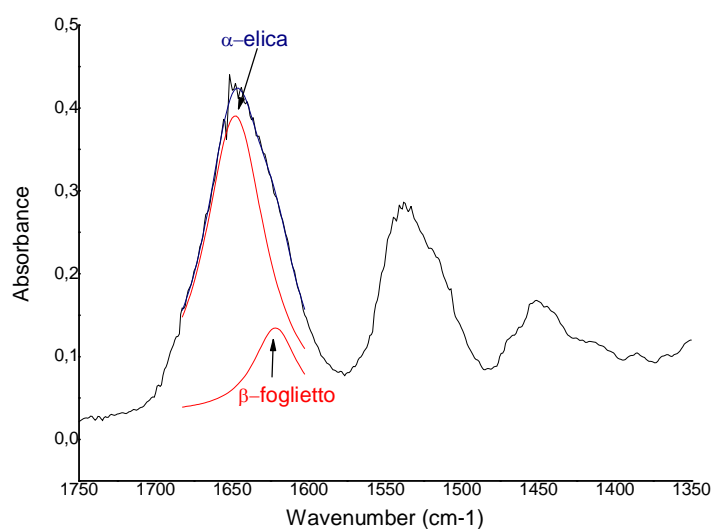
La riduzione di A_2/A_1 con il processo di miscelazione suggerisce che, mentre la struttura ad elica resiste al processo di termoplastificazione, gli aggregati molecolari (inter-helix packing) vengono distrutti. Simili conclusioni sono state riportate da Wang et al. [89], che studiarono l'effetto del metodo di formazione dei film sulla struttura di film di zeina-acido oleico. Nel nostro caso, tuttavia, la riduzione di A_2/A_1 è minore indicando una minore destrutturazione della proteina nel nostro processo di termoplastificazione. Inoltre, i valori di A_2/A_1 dopo la miscelazione sono simili per i differenti lotti di zeina studiati; pertanto possiamo affermare che non ci sono differenze sul grado di termoplastificazione fra i vari lotti così come confermato dai dati termici.

6.4 – Analisi spettroscopica FT-IR

Gli spettri deconvoluti della polvere e della TPZm del lotto A sono confrontati in Figura 6.4 a e 6.4 b.



a)



b)

Figura 6.4: Spettri deconvoluti della polvere a) e della TPZm b) del lotto A.

I risultati mostrano che ci sono differenze nella regione (1800-1600 cm^{-1}) chiamata regione ammidica I [90] tra la polvere e la zeina termoplastica. Cambiano sia le intensità relative dei picchi contenuti nella banda ammidica I che la larghezza di questa banda. Nella polvere, la banda è più ampia di quella della TPZm.

Questo può essere presa come un'indicazione che la distribuzione della conformazione proteica cambia durante il processo di miscelazione.

Solitamente, infatti, la banda ammidica I è utilizzata per valutare la porzione dei differenti tipi di struttura secondaria presenti nelle proteine. Gli spettri deconvoluti sia della polvere che del termoplastico, rivelano che la banda ammidica I (1800-1600 cm^{-1}) ha due picchi principali intorno a 1650 e 1620 cm^{-1} .

Il picco intorno a 1650 cm^{-1} può essere attribuito alle α -eliche [90] mentre il picco intorno 1620 cm^{-1} può essere attribuito ai β -foglietti intermolecolari [90-91], una struttura secondaria associata ad aggregazioni proteiche.

In tabella 6.3 sono riportate le aree sottese dai picchi relativi alle α -eliche e ai β -foglietti per le polveri e i termoplastici dei diversi lotti di zeina analizzati.

L'area sottesa dai picchi (A) è presa come indice del contenuto di α -eliche e di β -foglietti presenti nel campione in esame.

Zeina polvere				
	α-eliche		β-foglietti	
Lotto	Wavenumber (cm-1)	Area	Wavenumber (cm-1)	Area
A	1645	29.2	1618	10.2
B	1646	18.5	1616	7.9
C	1644	19.7	1613	9.2
D	1645	20.3	1616	8.9
TPZm				
	α-eliche		β-foglietti	
Lotto	Wavenumber (cm-1)	Area	Wavenumber (cm-1)	Area
A	1647	27.0	1621	5.7
B	1649	18.2	1625	6.8
C	1649	18.8	1625	6.2
D	1648	20.1	1625	7.3

Tabella 6.3: Aree sottese ai picchi relativi alle α -eliche e ai β -foglietti per i diversi lotti di zeina in polvere e termoplastica.

Questi risultati mostrano che, durante il processo di miscelazione la porzione di β -foglietti decresce mentre la struttura ad α -elica non cambia significativamente. Questo vuol dire che durante la miscelazione, la zeina subisce un cambiamento della sua struttura secondaria favorendo la creazione di una struttura disordinata. I risultati della Tabella 6.3 mostrano anche che i quattro lotti di zeina hanno strutture secondarie differenti nella proporzione dell' α -elica e dei β -foglietto. In effetti, la zeina in polvere e termoplastica del lotto A ha un più elevato contenuto di α -eliche rispetto ai β -foglietti delle altre.

Quindi il diverso comportamento dei diversi lotti di zeina è da attribuire al diverso numero di legami disolfuro e idrogeno in esse presenti che caratterizzano la struttura secondaria e terziaria della proteina. Evidentemente per i lotti B, C ed D alcuni di questi legami

sono stati "cancellati" da agenti riducenti durante l'estrazione o le commerciali operazioni di Wet Milling ed un minor contenuto di α -eliche è ottenuto.

6.5 – Analisi elettroforetica SDS-Page

In Figura 6.5 è riportato l' SDS-Page delle polveri di zeina A, B, C e D.

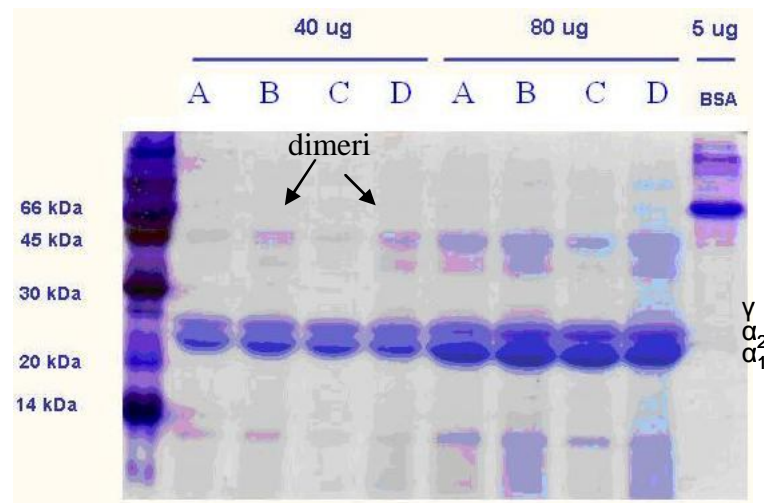


Figura 6.5: SDS-Page dei lotti di zeina in polvere A, B, C e D.

Mentre le polveri dei lotti A e C mostrano solo la presenza di monomeri α_1 - ($Mr=23 \times 10^3$) e α_2 -zeina ($Mr=25 \times 10^3$) [92], nelle polveri B e D sono presenti anche se in quantità meno significative i monomeri γ - ($Mr=27 \times 10^3$) e bande di alto peso molecolare (dimeri) [92].

6.6 – Proprietà reologiche elongazionali

Le curve di viscosità elongazionale transiente per i lotti di zeina termoplastica A, B, C e D a differenti strain rate $\dot{\epsilon}_0$, sono riportate in Figura 6.6 (a, b, c e d).

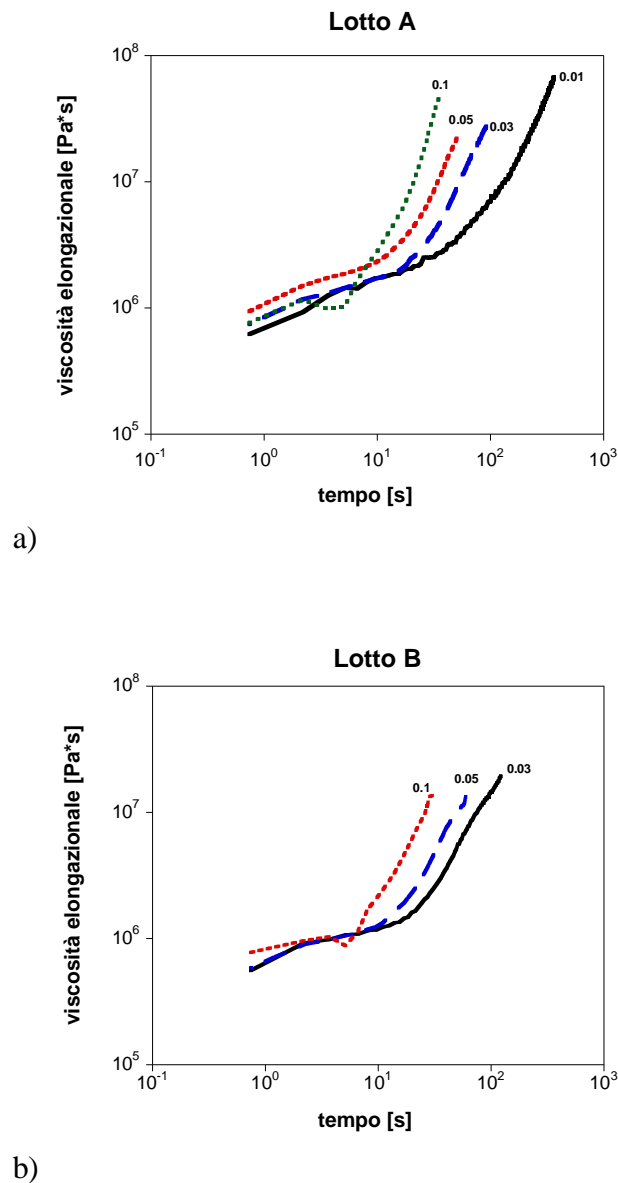
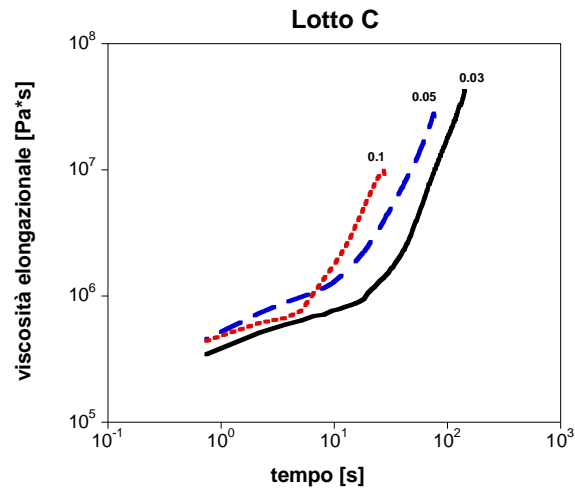
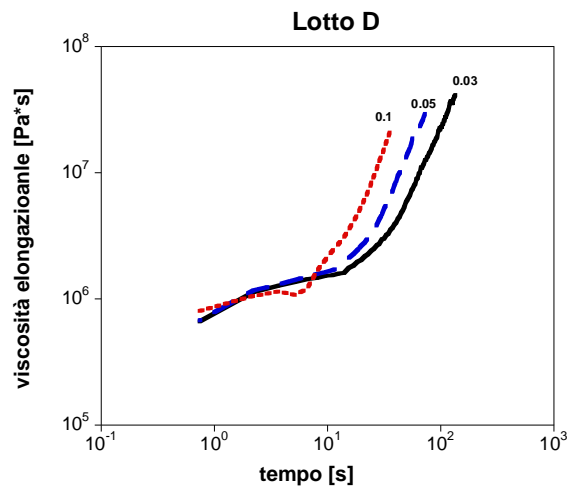


Figura 6. 6: Comportamento elongazionale a differenti strain rate: a) lotto A, b) lotto B, c) lotto C and d) lotto D.



c)



d)

Figura 6. 7: Comportamento elongazionale a differenti strain rate: a) lotto A, b) lotto B, c) lotto C and d) lotto D (continuo).

Per tutti i materiali investigati ed in un tutto il campo di velocità analizzato, la viscosità elongazionale transiente, definita come: $\mu(t) = \sigma(t) / \dot{\epsilon}_0$ aumenta nel tempo. In particolare tale aumento è inizialmente modesto nella regione chiamata "lineare" per poi diventare molto più rapido nella regione di deformazione nota come "strain hardening". Simile comportamento è stato osservato anche

da Oom et al. [93] per resine di zeina e cafirina plasticizzante con acido oleico. Essi osservarono, infatti, che queste resine presentavano un tempo di induzione iniziale solo dopo il quale è possibile osservare il fenomeno di strain hardening a differenza di quanto avviene invece per il glutine per il quale invece il fenomeno di strain hardening è immediato. Gli autori ipotizzano che questo comportamento dipenda dal fatto che il glutine ha un peso molecolare più alto se confrontato alla zeina e alla cafirina. In analogia a molti polimeri omogenei, per tutti i campioni studiati il fenomeno di strain hardening risulta più pronunciato a velocità di deformazione più alte. Lo stesso comportamento è stato osservato da Munstedt et al. [94] per polietileni di diverso peso molecolare. Le curve di viscosità elongazionale transiente per i differenti lotti, a $\dot{\epsilon}_0 = 0.1 \text{ s}^{-1}$, sono riportate in Figura 6.7 per confronto.

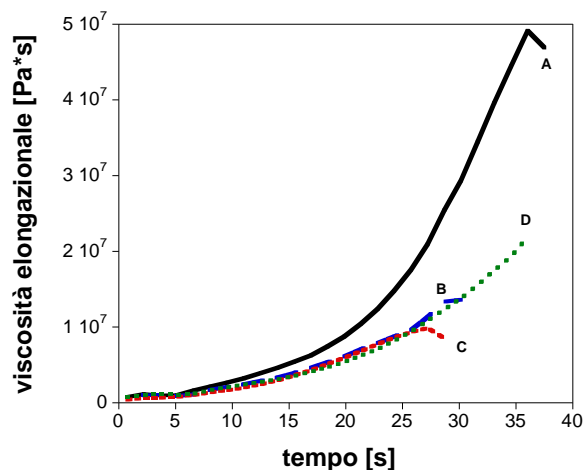


Figura 6.8: Comportamento elongazionale dei vari lotti di zeina a strain rate costante di 0.1.

I valori di viscosità elongazionale transiente e del tempo di rottura del lotto A sono significativamente più alti rispetto a quella degli

altri lotti (vedi figura 6.8), che mostrano invece valori di viscosità più o meno simili anche se con tempi di rottura differenti (il lotto D si rompe in tempi più lunghi rispetto ai lotti B e C). Questo differente comportamento potrebbe dipendere dalla differente struttura secondaria (contenuto di α -eliche e β -foglietti) dei vari lotti di zeina analizzati. La TPZm del lotto A, con un più alto contenuto di α -eliche e un più basso contenuto di β -foglietti ha, infatti, una struttura secondaria meno aggregata e quindi più estensibile.

In modo da valutare le caratteristiche di strain hardening dei diversi lotti ai diversi $\dot{\epsilon}_0$ un parametro di strain hardening (SHP) definito come rapporto della viscosità misurata dopo 25 secondi di prova (regione di strain hardening) sulla viscosità a 5 secondi di prova (regione lineare) è stato calcolato e riportato in tabella 6.4.

Parametro di Strain Hardening (SHP)				
Lotto	SHP a $0.01s^{-1}$	SHP a $0.03 s^{-1}$	SHP a $0.05 s^{-1}$	SHP a $0.1 s^{-1}$
A	1.83	2.5	4.1	17.7
B	--	2.3	3.1	9.7
C	--	2.0	3.8	9.7
D	--	1.9	2.6	9.7

Tabella 6.4 Parametri di strain hardening per i materiali analizzati a differenti strain rate.

I valori di SHP mostrati in tabella rivelano un modesto incremento delle caratteristiche di strain hardening con la velocità di deformazione fino ad un valore di $\dot{\epsilon}_0$ di $0.05s^{-1}$. Passando da $0.05 s^{-1}$ a $0.1 s^{-1}$ l'SHP subisce invece un forte incremento. Questo comportamento è osservato per tutti i lotti di zeina. È da evidenziare inoltre che la zeina termoplastica ottenuta dal lotto A presenta sempre un SHP più alto degli altri lotti. Questo

comportamento è ancora più evidente a 0.1 s^{-1} . In particolare il lotto A a 0.1 s^{-1} presenta un valore dell' HPS molto simile a quello misurato da Micic et al. per il polietilene a bassa densità (LDPE) comunemente utilizzato nei processi di filmatura in bolla [95].

6.7 – Haul off force

In figura 6.9 sono riportati gli andamenti dell'haul off force in funzione del draw ratio per i lotti di zeina termoplastica A, B, C ed D.

Tutti i campioni mostrano un significativo incremento dell'haul off force con il draw ratio ad eccezione del lotto D per il quale, invece, un valore di haul off force quasi costante è stato misurato al variare del draw ratio.

Nel range di draw ratio che va da 5 a 8 (range tipico del processo di filmatura in bolla) il valore di haul off force è sempre più alto per il lotto A.

I dati ottenuti sono in accordo con le prove elongazionali che forniscono valori di viscosità elongazionale più alti per il lotto A e suggeriscono che il lotto A potrebbe resistere bene alla forza di gravità durante la fase di avvio del processo di filmatura in bolla e produrre bolle stabili con bassi spessori finali.

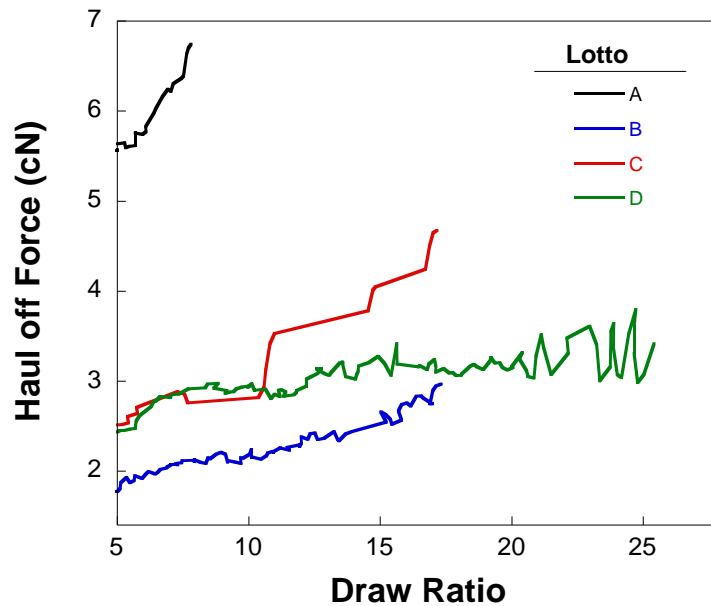


Figura 6.9: Andamento dell'haul off force in funzione del draw ratio per i diversi lotti di zeina.

6.8 – Filmatura in bolla

In Figura 6.10 sono riportate alcune fotografie della filmatura in bolla con l'impianto da laboratorio utilizzato in questo studio sui composti a base di zeina.

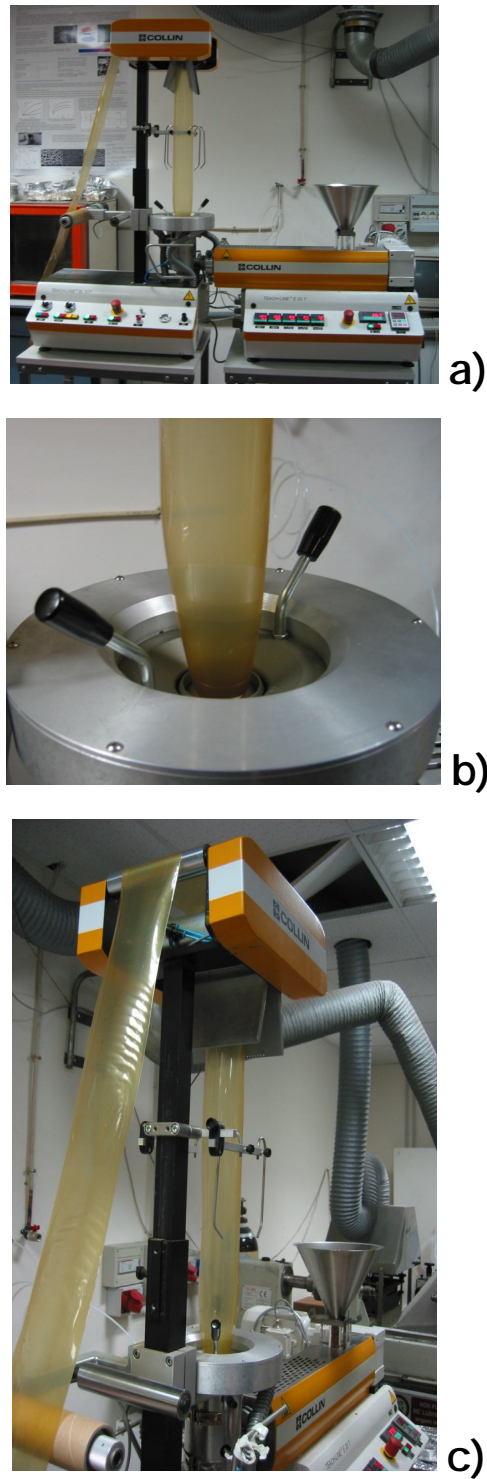


Figura 6.10: Fotografie dell'impianto di filmatura in bolla da laboratorio; a) estrusore monovite a sinistra e testa anulare con sistema di soffiaggio e raccolta; b) particolare della testa e della bolla; c) particolare del sistema di calibrazione e raccolta della bolla.

In Tabella 6.5 sono riassunte, per tutti i lotti di zeina, alcune delle condizioni di processo utilizzate, lo spessore finale con un commento generale sul processo di filmatura in bolla. Le caratteristiche di filmabilità sono difficili da riportare a causa della natura dell'esperimento. Per questa ragione, le informazioni riportate sulla stabilità della bolla e la qualità del film sono basate su osservazioni dell'operatore. Il profilo di temperatura è stato definito per i vari lotti di zeina in modo da ottenere una viscosità dell'estruso in grado di realizzare film di buona qualità. In particolare, per il lotto A, che mostrava una più bassa viscosità, temperature di processo più basse sono state utilizzate rispetto agli altri lotti.

Lotto	Profilo di temperatura zone 1/2/3/4/testa [°C]	Spessore [µm]	Commento
<i>A</i>	<i>70/80/85/95/100</i>	<i>80</i>	<i>Eccellente</i>
<i>B</i>	<i>85/100/120/115/115</i>	<i>150</i>	<i>Non buono</i>
<i>C</i>	<i>85/100/120/115/115</i>	<i>150</i>	<i>Non buono</i>
<i>D</i>	<i>85/1070/120/115/115</i>	<i>90</i>	<i>Buono</i>

Tabella 6.5: Parametri di processo, spessore e commento sintetico dei film di zeina prodotti con i lotti A, B, C e D.

Come mostrato in tabella, non tutti i materiali a base di zeina termoplastica sono filmabili e solo il processo di filmatura in bolla del lotto A, contenente una porzione maggiore di α -eliche ed avente un più alto valore di viscosità elongazionale e di haul off force, era continuo, la bolla era stabile e lo spessore finale del film

era di circa 80 μ m. Questi risultati sono in accordo con gli studi riportati in letteratura sui polimeri naturali e sintetici. Gao et al. [77] hanno riportato, infatti, in uno studio sull'effetto delle condizioni di estrazione sulla struttura proteica secondaria e sulla filmabilità della cahirina, che i film migliori si ottenevano a partire dalla cahirina avente il più elevato contenuto di α -eliche. Minoshima e White [78-79] hanno pubblicato invece due articoli sulla correlazione tra comportamento reologico elongazionale, proprietà di filmabilità e struttura molecolare di una varietà di LDPE, polietileni lineari a bassa densità (LLDPE) e polietileni ad alta densità (HDPE) in cui hanno stabilito che l'LDPE con il suo pronunciato strain hardening è il polimero più stabile nel processo di filmatura in bolla, mentre gli HDPE e LLDPE sono instabili a causa della loro stretta distribuzione di pesi molecolari. Più tardi, Mekhilef [82] ha studiato l'effetto dello strain hardening sul processo di filmatura in bolla del polivinilidene fluoride (PVDF). Egli osservò che lo strain hardening del PVDF ramificato amplia la finestra di processabilità rispetto a quella del PVDF non ramificato e permette di produrre bolle larghe e stabili e quindi film con ridotti spessori finali ed alta trasparenza.

6.9 – Proprietà meccaniche dei film di zeina termoplastica (TPZe)

I risultati delle prove meccaniche, sono descritti attraverso i seguenti parametri caratteristici del materiale: modulo di Young, sforzo a rottura e deformazione a rottura. Questi parametri sono stati calcolati come descritto nella Figura 6.11 che riporta l'andamento di una tipica prova di trazione.

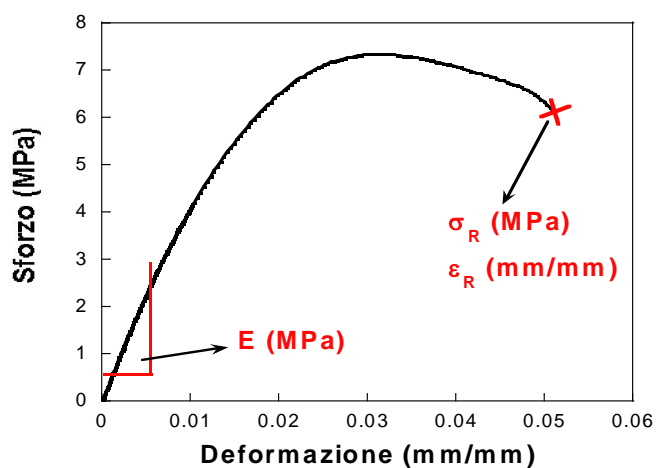


Figura 6.11: Prova di trazione, calcolo del modulo elastico e delle caratteristiche ultime del materiale.

Le proprietà meccaniche dei film ottenuti (TPZe) sono riportati in tabella 6.6.

TPZe	Modulo di Youngh [MPa]	Sforzo a rottura [MPa]	Deformazione a rottura %
A	383 ± 39	3.57 ± 0.22	42 ± 12
B	5.7 ± 1.2	0.04 ± 0.003	270 ± 20
C	4.1 ± 0.6	0.13 ± 0.02	242 ± 50
D	56.1 ± 6	0.73 ± 0.08	79 ± 2
[71]	81.3 ± 8.4	3.3 ± 0.2	79.2 ± 7.3

Tabella 6.6: Proprietà meccaniche dei film prodotti e di quelli realizzati in letteratura.

Il modulo elastico e lo sforzo a rottura sono più alti per i film prodotti a partire dal lotto A e D aventi un più elevato contenuto di α -eliche. Simile correlazione è stata determinata anche da Gao et al. nel 2005 per film di cahirina [77].

Nella stessa tabella per confronto sono riportati anche i valori di modulo elastico, sforzo e deformazione percentuale a rottura dei film di zeina realizzati da Wang [71] attraverso un processo di filmatura in bolla di una resina di zeina/acido oleico. Il nostro miglior film (lotto A) presenta valori di modulo e sforzo a rottura più alti ma valori di elongazione a rottura più bassi; tale comportamento è legato al effetto plasticizzante dell'acqua presente in quantità superiore nei materiali di Wang.

6.10 – Conclusioni

I polimeri naturali hanno una struttura molecolare complessa ed una scarsa stabilità termica rispetto ai polimeri sintetici e, per questa ragione, sono processati principalmente attraverso tecnologie utilizzando solventi. Tuttavia, la processabilità dei biopolimeri attraverso le tecnologie utilizzate solitamente per i polimeri termoplastici convenzionali è possibile se un plasticizzante opportuno e ben definite condizioni di processo sono utilizzate. Attraverso questo lavoro, è stato dimostrato, infatti, che le miscele zeina/PEG 400 possono essere processate attraverso la tecnologia di filmatura in bolla come i comuni polimeri sintetici, producendo film con spessori piuttosto bassi e proprietà meccaniche adatte all'utilizzo nel settore degli imballaggi alimentari. Tuttavia, questo non è possibile per tutti i lotti di zeina studiati. Solo la zeina termoplastica che mostrava un pronunciato strain hardening era filmabile. Il processo di filmatura in bolla della zeina termoplastica

del lotto A era continuo, la bolla era stabile e lo spessore finale del film era di circa 80 μ m. Il differente comportamento reologico non dipendeva da una differente termoplastificazione della zeina in esame, come confermato dalla DSC, TGA, DMA e analisi ai raggi X, o dalla presenza di polipeptidi di diverso peso molecolare (SDS-Page) ma da una differente struttura secondaria (contenuto di α -eliche rispetto ai β -foglietti). In conclusione, questo lavoro sembra indicare che i film migliori si ottengono a partire dalla zeina termoplastica con un elevato contenuto di α -eliche rispetto ai β -foglietti come confermato dalle proprietà reologiche elongazionali. Un'estrazione su scala industriale dovrebbe pertanto minimizzare l'aggregazione proteica e massimizzare la struttura ad α -elica se si vogliono ottenere film di buona qualità.

Bibliografia – Parte I

- [1] Petersen, K. Nielsen, P.V. Bertelsen, G. Lawther, M Olsen, M.B. Nilsson, N.H. and Mortensen, G., 1999 "**Potential of biobased materials for food packaging**". Trends in food science & technology, 10: 52-68.
- [2] Tuil van, R. Schennink, G. Beukelaer de, H. Heemst van, J. and Jaeger, R., 2000 "**Converting biobased polymers into food packagings**". In Proceedings of Food Biopack Conference, Copenhagen 27-29 August 2000, Copenhagen, Denmark, pp. 28-30.
- [3] Cuq B. et al., 1998, "**Proteins as agricultural biopolymers for packaging production**", Cereal Chem.,75, 1-9.
- [4] Gennadios A. et al., 1994, "**Edible coatings and films based on proteins**". In: Krochta, J.M., Baldwin, E.A. and Nisperos. Carriedo, M. (Eds.), Edible coatings and films to improve food quality. Lancaster, PA: Technomic Publishing Company, 201-277.
- [5] Krochta J.M. et al.,1997, "**Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities**". Food Thecnology, 51(2), 61-74.
- [6] Reiners R. A. et al., 1973 "**Corn proteins: Potential for their industrial use**", Pages 285-302 in: Industrial Uses of Cereals, Y. Pomeranz, ed. Am. Assoc. Cereal Chem.: St. Paul, MN.
- [7] Augustine, M. E., and Baianu, I.C., 1987 "**Basic studies of corn proteins for improved solubility and future utilization: A physicochemical approach**". J. Food Sci. 52:649-652.
- [8] Lia,H-M and Padua, G,W, 1998 "**Water Vapor Barrier Properties of Zein Films plasticized with Oleic Acid**"Cereal Chem.,75,194-199.
- [9] Rishi Shukia, Munir Cheryan, 2001 "**Zein: the industrial protein from corn**". Industrial Crops and Products, 13: 171-192.
- [10] Wall, J.S., Paulis, J.W., 1978 "**Corn and sorghum proteins**". In: Pomeranz, Y (Ed.), Advances in Cereal Science and echnology, vol.2. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.
- [11] Osborne, T.B., 1924 "**Vegetable proteins**". Second ed. Longmans, Green, New York.
- [12] Aristippos Gennadios, Tara H. McHugh, Curtis L. Weller and John M. Krochta "**Edible coatings and films based on protein**". In: Edible coatings and films to improve quality, pp. 201-277, edited by John M. Krochta, Elizabeth A. Baldwin and Myrna Nisperos-Corriedo.

- [13] Reiners, R.A., Wall, J.S. Inglett, G.E., 1973 "**Corn proteins: Potential for their industrial use**". In: Pomeranz, Y. (Ed.), Industrial uses of cereals, American Association of Cereal Chemistry, St. Paul, MN, pp.285-302.
- [14] Mc Kinnerg, L.L., 1958 "**Zein**". In: Clark, G.L. (Ed.), The Encyclopedia of chemistry. Reinhold, New York, pp.319-320.
- [15] Paulis, A.F., 1971 "**Zein**". In: Mark, H.(Ed.), Encyclopedia of Polymer Science and Technology, vol.15 Wiley, New York, pp.125-132.
- [16] Turner, J.E., Boundy, J.A., Dimler, R.J., 1965 "**Zein: A heterogeneous protein containing disulfide-linked aggregates**". Cereal Chemistry 42, 453-461.
- [17] Paulis, J.W., 1981 "**Disulfide structures of zein proteins from corn endosperm**". Cereal Chemistry 58, 542-546.
- [18] John W. Lawton "**Zein: A history of processing and use**". Review.
- [19] Argos, P., Parks, M.D., Larkins, B.A., 1982 "**A structural model for maize zein proteins**". Journal Biol. Chem. 257, 9984-9990.
- [20] P. Belton, J. Taylor "**Pseudocereals and less common cereals: grain properties and utilization potencial**", pp.6-12/25-81.
- [21] Takahashi H. 1995 "**Application of zein**". Food and Dev. 30:45-47.
- [22] Dejing Fu et al. "**Zein: properties, preparations and application**". In Food Science and Biotechnology.
- [23] Couchman PR. Karasz FE, 1978 "**Macromolecules**". 11(1) :117-9.
- [24] Gordon M., Taylor JS, 1952 "**J. Appl. Chem.**". 2:493-500.
- [25] Kwei TK, 1984 "**J. Polym. Sci.** " : Lett. Ed. 22:307-13.
- [26] YU.I. Matvev, V.Ya grinberg, V.B. Tolgstguzov, 2000 "**The plasticizing effect of water on proteins, polysaccharides and their mixtures. Glassy state of biopolymers, food and seeds**". Food Hydrocolloids, 14:425-437.
- [27] Hansen, D.W., 1938 "**Plasticized prolamine base composition**". U.S patent 2,115,716.
- [28] Evans, C.D., and Manley ; R.H., 1941 "**Solvents for zein: Primary solvents**". Ind. Eng. Chem. 33:1416-1417.
- [29] Mossè, J., 1961 "**Monographie sur una proteine du mais: la zein**". Ann. Physiol. Vèg. 3,105-139 (in French).
- [30] Evans, C.D., and Manley, R.H., 1943 "**Stabilizing zein dispersions against gelation**". Ind. Eng. Chem. 25:230-232.

- [31] Galeotti, E., and Giampalmo G., 1909 "**Solubility of zein in mixtures solvents**". Ind. Kolloide 3:118-125.
- [32] Evans, C.D., and Manley, R.H., 1994, "**Ternary solvents for zein**". Ind. Eng. Chem. 36:408-410.
- [33] Wilson, C.M., 1988 "**Electrophoretic analysis of various commercial laboratory-prepared zeins**". Cereal Chem. 65:72-73.
- [34] Hosenev, R.C., Zeleznak, K., and Lai, C.S., 1986 "**Wheat gluten: A glassy polymer**". Cereal Chemistry 63:285-286.
- [35] Paulis, J.W., Wall, J.S., 1977 "**Fractional and Characterization of alcohol-soluble reduced corn endosperm glutelin proteins**". Cereal chem. 54,1223-1228.
- [36] Morris, L., Unger, L.G., Wilson, A.L., 1956 "**Purification and recovery of zein**". US Patent 2733234.
- [37] Mahan-Myers "**Chimica**". Casa editrice Ambrosiano, Milano pp. 811-822.
- [38] T.W. Graham Solomons "**Chimica organica**", ed. Zanichelli, pp 981-1012.
- [39] Leontine A. De Graaf, 2000 "**Denaturation of protein from a non food perspective**". Journal of Biotechnology, 79:299-306.
- [40] Di gioia, CUQ, Gulbert, 1999 "**Thermal properties of corn glutean meal and its proteic componenty**". International Journal of Biological Macromolecules, 24:341-350.
- [41] Trezza, T:A:, and Vergano, P.J, 1994 "**Grease resistance of corn zein coated paper**". J. Food Sci. 59:912-915.
- [42] Hadley, D.W, 1993 "**An introduction to The Mechanical properties of solid polymers**". Wiley: New York.
- [43] Ferry, J.D., 1980 "**Concentrated solution, plasticized polymers, and gels**". In : Viscoelastic properties of polymers, 3rd ed., Wiley: New York pp.486-598.
- [44] Briston J.H., Katan, L.L, 1974 "**Plastics in contact with food**". Food Trade Press London U.K:chapter 4 and 5.
- [45] Chatfield, H.W. Varnish, 1953 "**Constituents**". Leonard Hill: London U.K.
- [46] Roos Y.H, 1995 "**Food Components and polymers**". In: Phase transitions in Foods, Academia Press: San Diego, CA 109-156.
- [47] Doolittle A.K., 1965 "**Mechanism of plasticisation**". In: Plasiciser technology vol.1, chp. 1, pp.1-20 P.F. Bruins (Ed.), Reinhold Publishing Corporation, New York.

- [48] Pouplin M., Redl A., Gontard, 1999 "**Glass transition of wheat gluten plasticised with water, glycerol and sorbitol**". Journal of Agricultural and Food Chemistry.
- [49] Guilbert, Graille, 1994 "**Valorisations non-alimentaires des grandes productions agricoles**". Les Colloques 71, INRA editions, Paris, pp.195.
- [50] Lai and Padua "**Properties and microstructure of plasticized zein films**". In: Cereal Chemistry.
- [51] Kanig, J.L., and Goodman; H., 1962 "**Evalutative procedures for forming material used in pharmaceutical applications**". J.51:77.
- [52] Takenaka, H., Ito, H., Asano, H., and Hattori, H.1967 "**On some physical properties of film forming materials**". Gifuyakka Delgake 17:142-146.
- [53] Mendoza, M., 1975 "**Preparation and physical properties of zein films**". M.S. Thesis, University of Massachusetts, Amherst, MA.
- [54] Gulbert, S.G., 1986 "**Technology and application of edible protective films**". Pages 371-394 in: Food packaging and preservation-theory and practice, Burea and J.J. Multo, ed Elseviers, London.
- [55] Aydt, T.P., Weller, C.L., and Testin, R.F., 1991 "**Mechanical and barrier properties of edible corn and wheat protein films**". Trans. ASAE 34:207-211.
- [56] Park, H.J., Bunn, J.M., Weller, C.L., Vergano, P.J., and Testin, R.F., 1994 "**Water vapor permeability and mechanical properties of grain protein- based films as affected by mixtures of polythylene glicol and glycerin plasticizers**". Trans, ASAE 37:1281-1285.
- [57] Gennadios, A., Park, H.J., and Weller, C.L.,1993 "**Relative humidity and temperature effect on tensile strength on edible protein and cellulose ether films**". Trans ASAE 36:1867-1872.
- [58] Herald, T.J., and Bowers, 1996 "**Corn zein packaging materials for cooked turkey**". J. Food Sci. 61:415-417.
- [59] Buffo, R.A., Weller, C.L., and Gennadios, 1997 "**Film from laboratory-extracted sorghum kafirin**". Cereal Chem. 74:473-475.
- [60] Parris, N., Dickey, L.C., Kurantz, M.J., Moten, R.O., Craig, J.C.,1997 "**Water vapor permeability and solubility of zein/starch hidrophilic films prepared from dry milled corn extract**". J. Food Eng. 32,199-207.
- [61] Weller, C.L., Gennadios, A., 1998 "**Edible bilayerfilm from zein and grain sorghum wax or carnauba wax**". Lebeusnn. Techn. 31:279-285.
- [62] Santosa, F.X.B., and Padua, G.W., 1999 "**Tensile properties ad water absorption of zein sheets**". Food Chem. 47:2070-2074.

- [63] Tillekeratne, M., and Eastral, A.J., 2000 "**Modification of zein films by incorporation of poly(ethyleneglicol)**". Polym. Int. 49:127-134.
- [64] Smith, S.A., 1986 "**Polyethylene, low density**". In: The Wiley Encyclopedia of Packaging Technology, ed., M. Bakker, New York: John Wiley & Sons, pp514-523.
- [65] McHugh, T.H. and Krochta, J.M., 1994b "**Water vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films**". JAOCS, 71:307-312.
- [66] Park, H.J., Chinnan, M.s., 1995 "**Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials**". J. Food Eng., 25:497-507.
- [67] Seymour, R.B., and Carraher C.E., 1984 "**Structure-property relationships**". In: Polymers, New York, pp.107-111.
- [68] Cherian, G.,Gennadios, A., Weller, C.L. and Chinachoti, 1995 "**Thermochemical behavior of wheat gluten films: effect of sucrose, glycerin and sorbitol**". Cereal Chem., 72:1-6.
- [69] Lim, L.-T., Mine, Y. and Tung, M.A.,1998 "**Transglutaminase cross-linked egg white protein films: tensile properties and oxygen permeability**". J.Agric. Food Chem.,46:4022-4029.
- [70] Salame, M., 1986 "**Barrier polymers**". In: The wiley Encyclopedia of packaging Technology, ed., M. Bakker, New York: John Wiley & Sons, pp48-54.
- [71] Wang and Padua, 2003 "**Tensile properties of extruded zein sheets and extrusion blown films**". In: Macromolecular Materials and Enginery 288:886-893.
- [72] Wang and Padua, 2004 "**Water sorption properties of extruded zein films**". In: Journal Food Chemistry, 52(10):3100-3105.
- [73] D.H. morton-Jones "**Polimer processing**". Polymer Research Group, Chemisry Department University of Lancaster.
- [74] Robbert A. De Graafa, R.A.; Karmanb, A.P; Janssenb, L.P.B.M., 2003 "**Material Properties and Glass Transition Temperatures of Different Thermoplastic Starches After Extrusion Processing**", Starch, 55, 80-86.
- [75] Baird D.G., 1999 "**The role of extensional rheology in polymer processing**", Rheology Journal, 4, 305-311.
- [76] Di Maio,E.; Mali,R.; Iannace, S. *Polymer*, submitted.
- [77] Gao C., et al., 2005 "**Effect of Preparation Conditions on Protein Secondary Structure and Biofilm Formation of kafirin**", Journal of agricultural and Food Chemistry, 53, 306-312.

- [78] Minoshima W. et al., 1986a "***Instability phenomena in tubular film and melt spinning of rheologically characterized high density, low density and linear low density polyethylenes***", J. Non Newton fluid Mech., 19, 275-302.
- [79] Minoshima W. et al., 1986b "***A comparative experimental study of the isothermal shear and uniaxial elongational rheological properties of low density, high density and linear low density polyethylenes***", J. Non Newton fluid Mech., 19, 215-274.
- [80] Munstedt H., 1980 "***Dependence of elongational behaviour of polystyrene melts on molecular weight and molecular weight distribution***", J. Rheol., 29, 847-868.
- [81] Kobayashi M. et al., 1996 "***Influence of glass beads on the elongational viscosity of polyethylene with anomalous strain rate dependence of the strain-hardening***". Polymer, 37 (16), 3745-3747.
- [82] Mekhilef N. et al, 2007 "***Effect of Rheological Strain Hardening on Extrusion Blown Film of Polyvinylidene Fluoride***", Journal of Plastic Film and Sheeting", 23, 203-219.
- [83] Redl A., et al., 1999 "***Rheological Properties of Gluten Plasticized with Glycerol: Dependence on Temperature, Glycerol Content and Mixing Conditions***", Rheol. ACTA, 38, 311–320.
- [84] Selling G.W., et al., 2004 "***Effect of Water and Tri(ethylene)glicol on the Rheological Properties of Zein***", Polym., 45, 4249–4255.
- [85] Corradini E., 2006 "***Preparation and Characterization of Thermoplastic Starch/Zein blends***" 17° CBECIMat, Foz do Iguacu, PR, Brazil.
- [86] Wu Q. et al., 2003 "***Chemical modification of zein by bifunctional polycaprolactone (PCL)***", Polymer, 44, 3909
- [87] Beck, M. I., Tomka, I., Waysek, E., 1996: Int. J. Pharm. 141, p. 137
- [88] Arndt U.W., "***The Structure of Some Proteins as Revealed by an X-Ray Scattering Method***", Philosophical Transactions of the Royal Society London, 247-409 (1955).
- [89] Wang Y., et al., "***Effects of processing on Structure of Zein/Oleic Acid Films Investigated by X-ray Diffraction***", Macromolecular Bioscience, 5, 1200-1208 (2005).
- [90] Rahmelow K., et al., 1996 "***Fourier self-deconvolution: Parameter determination and analytical band shapes***", Appl. Spectrosc., 50, 795-804.
- [91] Taylor J.R.N., 2002 "***Sorghum***" In Pseudocereals and Less Common Cereals; Belton P.S., Taylor J.R.N. eds., Springer: Berlin, Germany, 25-38.

- [92] Esen A., 1987 "**A proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize (Zea Mays L.)**" J. Cereal. Sci., 5, 117-128.
- [93] Oom A., 2008 "**Rheological properties of kafirin and zein prolamins**", Journal of Cereal Science, 47, 109-116.
- [94] Munstedt H., 2005 "**Correlation between rheological behaviour in uniaxial elongation and film blowing properties of various polyethylenes**". In: Rheological Acta, 45, 14-22.
- [95] Micic P., 1998 "**Transient Elongational Viscosity Of LLDPE/LDPE Blends and its Relevance to Bubble stability in the Film blowing process**", Polymer Engineering and Science, 38, 1685-1693.

Parte II

Nuovi “sistemi da imballaggio”

Multistrato biodegradabile a base di zeina termoplastica

1.1 – Introduzione

Il problema dell'esaurimento dei giacimenti fossili (non rigenerabili), oltre a quello dello smaltimento dell'enorme quantità di materie plastiche di rifiuto, ha indotto la ricerca a cercare possibili materie prime alternative.

La zeina è un materiale biodegradabile, rinnovabile che ha buone potenzialità in applicazioni non alimentari. Abbiamo visto, infatti, nella parte I che la zeina quando plasticizzata con il PEG 400 può essere processata con le tecniche classiche dei polimeri sintetici, come l'estrusione e la filmatura in bolla. Sfortunatamente, i prodotti a base di zeina, presentano proprietà meccaniche e di barriera all'umidità più scadenti rispetto ai materiali sintetici, che ne limitano l'utilizzo. Una strategia per migliorare tali caratteristiche sarebbe quella di associare alla zeina un polimero con una buona resistenza all'umidità e buone proprietà meccaniche, mantenendo intatta la biodegradabilità del prodotto finale. Martin et al. hanno realizzato miscele di amido termoplastico con vari poliesteri come il policaprolattone (PCL) [1], l'acido polilattico (PLA) [2], il polibutilene succinato adipato (PBSA) [3] e la poliesteramamide (PEA) [4]. Essi hanno osservato però che sebbene le proprietà dell'amido termoplastico miglioravano, la sensibilità all'umidità rimaneva pressoché invariata. Abbiamo deciso pertanto per promuovere l'utilizzo della zeina, di rivestire la zeina termoplastica con strati di un poliestere idrofobico biodegradabile avente una temperatura di processo simile a quella della zeina termoplastica come il PCL (Figura 1.1). In letteratura sono presenti numerose pubblicazioni di multistrati realizzati per combinare le proprietà di due o più polimeri in una singola struttura multistrato. In particolare, in molte applicazioni commerciali vengono utilizzati multistrati caratterizzati da strati esterni di un polimero più economico con buone proprietà meccaniche e di barriera all'umidità e da uno strato interno più costoso avente buone proprietà a barriera ai gas [5]. Nel nostro caso

specifico abbiamo associato le proprietà a barriera all'ossigeno e ai gas della zeina termoplastica (più costosa) con le proprietà a barriera all'umidità e le caratteristiche meccaniche del PCL (più economico) per ottenere un multistrato biodegradabile al 100% da utilizzare nel settore degli imballaggi alimentari.

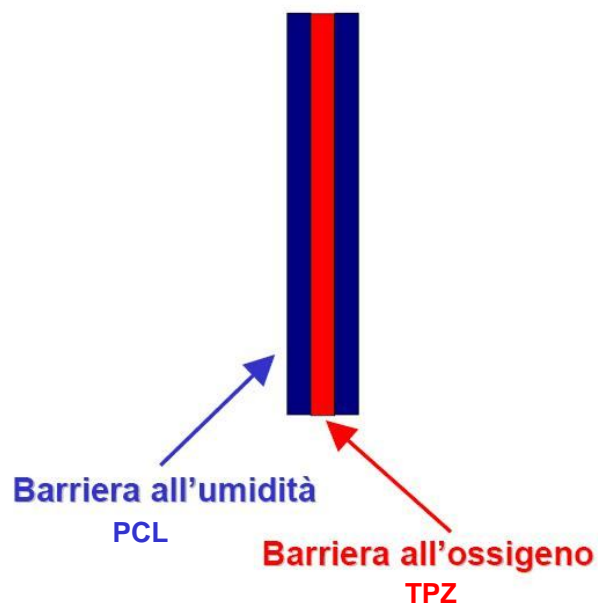


Figura 1.1: Multistrato a base di TPZ.

La preparazione di multistrati a base di zeina termoplastica è stata realizzata attraverso un processo di compression moulding (pressatura) a più step di zeina termoplastica e PCL. Accoppiare la zeina termoplastica con il PCL non è però semplice vista la scarsa affinità dei due polimeri. La strategia utilizzata per migliorare l'adesione dei due polimeri è consistita nell'introdurre percentuali differenti di PCL (range

che va dal 5 al 60%) nello stato interno di zeina termoplastica. L'effetto della percentuale di PCL sulle proprietà di adesione è stato valutato in modo da realizzare un multistrato ottimale. Per il multistrato realizzato si sono valutate le proprietà meccaniche, le proprietà di permeabilità all'ossigeno, di bagnabilità e di solubilità in acqua. Pubblicazioni su tale argomento non sono presenti in letteratura.

1.2 – Materiali

Zeina

La zeina di mais (cod.: Z3625, numero di lotto: 093K1055) è stata acquistata dalla Sigma-Aldrich (Italia). Il Polietilenglicole 400 (PEG 400) è stato utilizzato come plasticizzante per la zeina ed è stato acquistato dalla Fluka (Italia).

PCL

Il PCL (CAPA 680), la cui formula chimica è rappresentata in Figura 1.2, è stato acquistato dalla Solvay (Belgio).

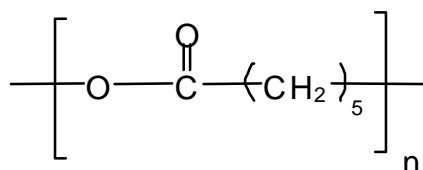


Figura 1.2: Formula chimica del PCL.

Il PCL è un poliestere termoplastico parzialmente cristallino che viene sintetizzato con una reazione di polimerizzazione per apertura dell'anello di ϵ -caprolattone, un estere ciclico, per mezzo di un opportuno iniziatore alcolico (Figura 1.3).

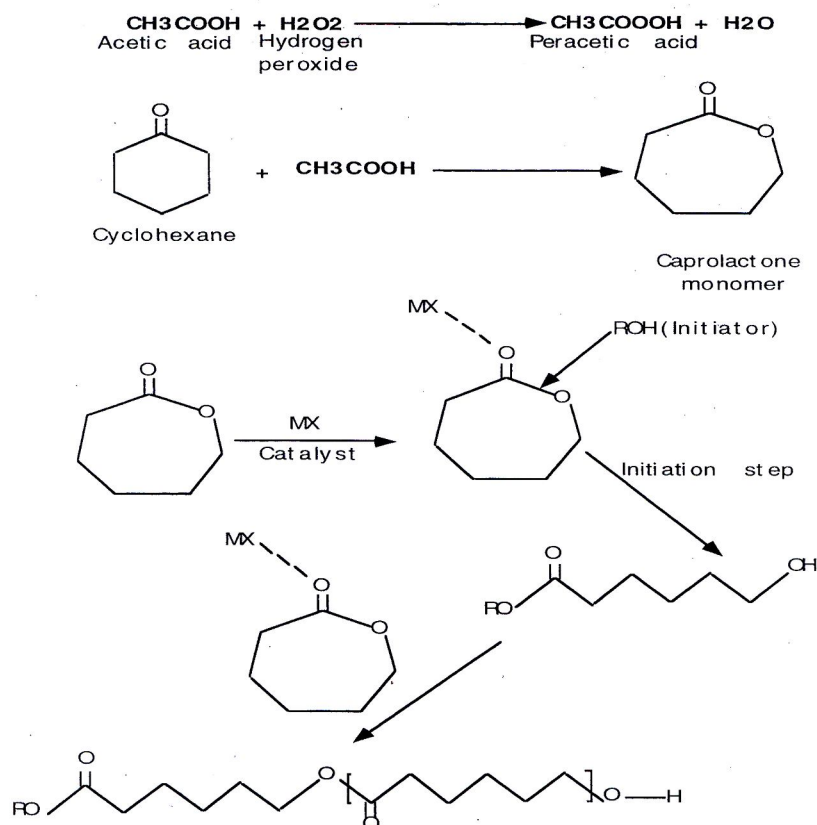


Figura 1.3: Schema di sintesi del PCL.

Il PCL è solubile in molti comuni solventi quali gli idrocarburi aromatici ed alogenati ed è compatibile con molti altri polimeri termoplastici, ciò ne aumenta le caratteristiche di ecosostenibilità.

Tra i maggiori ostacoli nella produzione di polimeri biodegradabili sono da considerare, in genere, l'alto consumo energetico legato alla lavorazione e le scarse proprietà meccaniche del prodotto finito.

Il PCL supera brillantemente il primo ostacolo; infatti, con una temperatura di fusione relativamente bassa (circa 60°C), non dà particolari problemi in fase di processo. Per quanto riguarda le proprietà meccaniche del prodotto finito, invece, queste non sono certo eccezionali ma vanno comunque guardate in relazione a quelle richieste dal tipo di prodotto finito che si vuole realizzare (imballaggio alimentare) e tenendo conto dei vantaggi derivanti dall'agevole lavorabilità e dalla buona biodegradabilità.

1.3 – Procedura di preparazione dei materiali costituenti il multistrato

La procedura utilizzata per preparare la zeina termoplastica (TPZm) è quella descritta nella parte I, paragrafo 5.2.

Le varie miscele di TPZm e PCL (TPZm+x%PCL) sono state realizzate anch'esse utilizzando un miscelatore controrotante (Rheomix 600 Haake, Germania).

I granuli di TPZm, costituenti la fase maggiore, sono stati prima miscelati a 70°C, 20rpm per 2 min. e successivamente il PCL è stato aggiunto nella camera di miscelazione e miscelato con la TPZm a 80 rpm per 6 min.

1.4 – Procedura di realizzazione del multistrato

I multistrati sono stati prodotti attraverso un processo di compression moulding a due step.

Il primo step consisteva nel preparare separatamente dischetti di zeina termoplastica (o TPZm+x%PCL) e di PCL attraverso l'utilizzo di una pressa a caldo (Collin, Germania).

In un secondo step, i dischetti di TPZm (o TPZm+x%PCL) e il PCL sono stati sovrapposti e pressati utilizzando la stessa pressa per ottenere il multistrato finale. Lo schema di preparazione del bistrato TPZm/PCL utilizzato per valutare le proprietà di adesione è riportato in Figura 1.4.

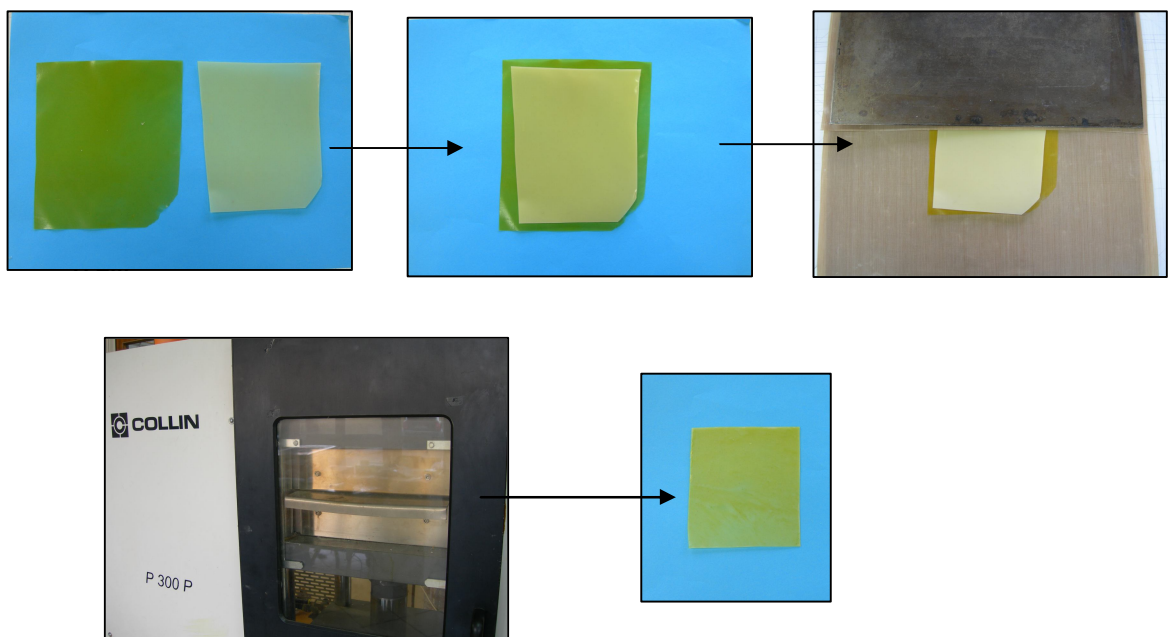


Figura 1.4: Schema di preparazione del bistrato TPZm/PCL.

Le condizioni di pressatura del PCL e dei materiali a base di zeina termoplastica sono riportate in Tabella 1.1, mentre quelle relative al multistrato in Tabella 1.2.

Singolo strato	Pressione (bar)	Temperatura (°C)	tempo (min.)
PCL	100	80	5
TPZm	50	75	5
TPZm+x%wt PCL	50	75	5

Tabella 1.1: Condizioni di pressatura per i singoli strati.

Multistrato	Pressione (bar)	Temperatura (°C)	Tempo (min.)
Step 1	1	95	3
Step 2	30	95	5
Step 3	30	raffreddamento	-

Tabella 1.2: Condizioni di pressatura per i multistrati.

Le temperature settate nella pressa sono sopra la temperatura di fusione dei rispettivi materiali per i singoli materiali e sopra la temperatura di fusione del polimero a più alta temperatura di fusione nel caso dei multistrati. Dopo il raffreddamento i film ottenuti sono stati condizionati a temperatura ed umidità controllata prima di essere successivamente testati.

1.5 – Prove di adesione

L'adesione degli strati PCL/TPZm e PCL/TPZm+x%PCL è stata valutata attraverso prove di peeling realizzate con un dinamometro Sans (modello CMT 4304) alla velocità di 50mm/min. I campioni sono stati condizionati a temperatura ambiente e al 50% di umidità relativa per 48 ore e tagliati dai film multistrati in strisce di 100x20 mm² prima di essere testati. Gli strati singoli di ciascun bistrato venivano aggraffati ai morsetti dello strumento come mostrato in Figura 1.5 e testati nelle condizioni precedentemente definite.

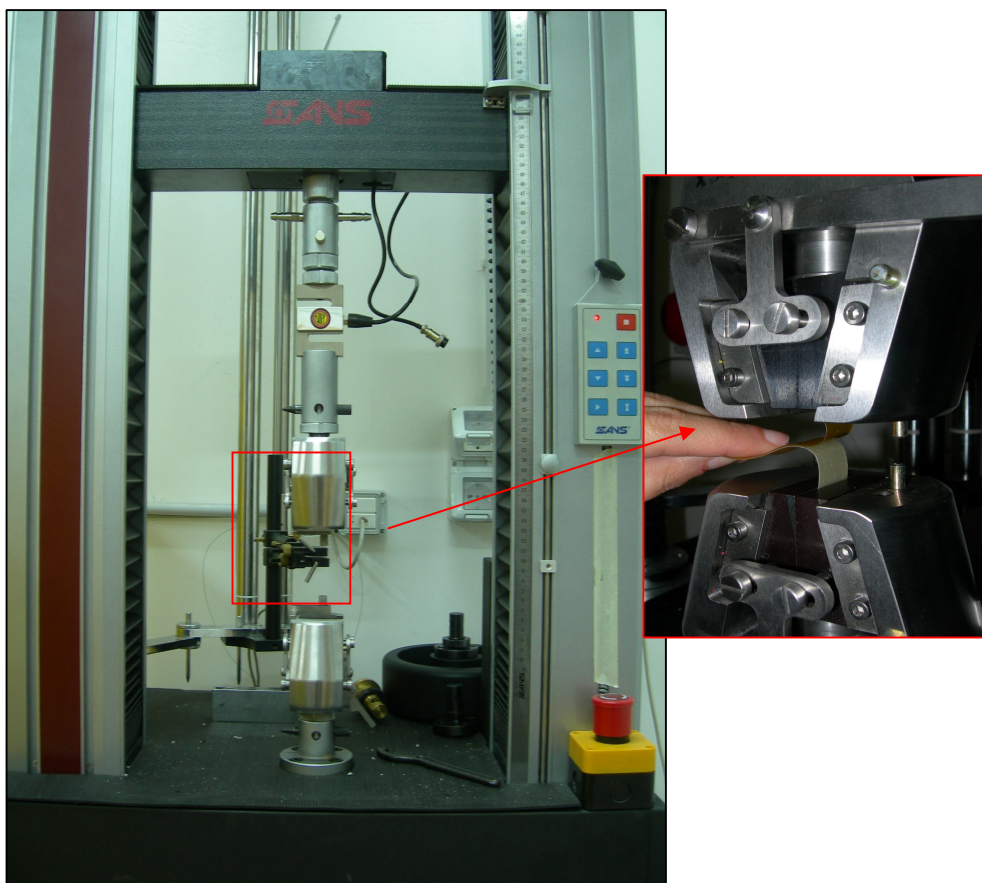


Figura 1.5: Test di peeling.

Sono stati testati cinque campioni per ogni bistrato e i risultati sono stati ottenuti come media dei valori ottenuti per ciascun campione. In particolare è stata valutata la forza di adesione (o peel strength) come rapporto tra il valore del carico medio in corrispondenza del quale ho la separazione degli strati (vedi Figura 1.6) e il valore della larghezza del campione.

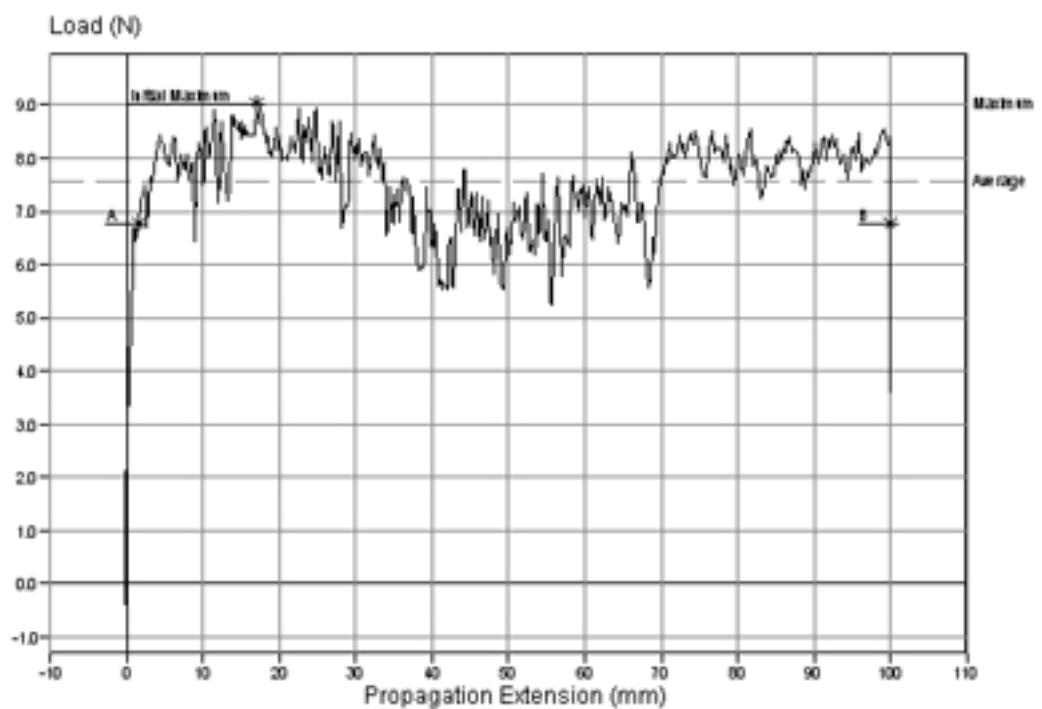


Figura 1.6: Grafico tipico di un test di peeling.

..

In Tabella 1.3 sono riportati i valori di peel strength per i differenti bistrati analizzati.

Multistrato	Peel strength (N/mm)
TPZm/PCL	0.0089
TPZm+5%PCL/PCL	0.0088
TPZm+10%PCL/PCL	0.01
TPZm+20%PCL/PCL	0.018
TPZm+40%PCL/PCL	Adesione ottimale
TPZm+50%PCL/PCL	Adesione ottimale
TPZm+60%PCL/PCL	Adesione ottimale

Tabella 1.3: Effetto della percentuale di PCL nella TPZm sul valore di peel strength.

Il valore di peel strength del multistrato TPZm/PCL indica una bassa adesione degli strati dovuta alla scarsa compatibilità dei rispettivi materiali. Un incremento dell'adesione è ottenuto solo se una percentuale di PCL pari al 40% è aggiunto allo strato interno di TPZm. In particolare, per tale formulazione si osserva durante il test di peeling l'allungamento dello strato singolo senza il verificarsi della delaminazione. Questo è indice di un'ottima adesione degli strati. Tale formulazione è stata pertanto utilizzata per produrre i multistrati biodegradabili a base di zeina.

1.6 – Caratteristiche meccaniche del multistrato

Le caratteristiche meccaniche sono state misurate con un dinamometro Instron, modello 4204 (USA) in accordo al metodo standard ASTM D1708-02. Le curve di sforzo-deformazione, il modulo di Young, lo sforzo e la deformazione a rottura sono stati registrati impostando una velocità della traversa mobile pari a 10mm/min. Cinque campioni per ciascun film sono stati testati e i risultati sono stati ottenuti come media dei valori ottenuti per ciascun campione.

La Tabella 1.4 riporta i valori del modulo di Young, dello sforzo e della deformazione a rottura per i film di PCL e di TPZm e per il multistrato PCL/TPZm+40%PCL/PCL.

Materiale	Modulo di Young E [MPa]	Sforzo a rottura σ_r [MPa]	Deformazione a rottura ϵ_r [mm/mm]
PCL	521±23.6	44.4±3.1	9.17±1.5
TPZm	310±9.3	3.5±0.43	0.72±0.11
Multistrato	356±16.4	9.3±1.3	0.99±0.006

Tabella 1.4: Proprietà meccaniche del multistrato.

I risultati mettono in evidenza che le caratteristiche meccaniche del multistrato sono intermedie a quelle dei singoli polimeri anche se più vicine a quelle della zeina termoplastica.

Il modulo elastico e le proprietà di deformazione quindi non cambiano molto quando combiniamo la zeina termoplastica con un poliestere duttile come il PCL. Questo comportamento potrebbe probabilmente dipendere dal fatto che il PCL costituisce una percentuale bassa della massa totale del prodotto. Durante la fase di preparazione del multistrato, dischetti di PCL piuttosto sottili vengono infatti utilizzati in modo da costituire la fase minore del film prodotto.

Un comportamento simile è stato riportato da Wang et al. [6] per laminati a base di amido termoplastico.

1.7 – Proprietà di trasporto

Generalmente l'efficienza di un film per l'imballaggio alimentare viene valutata principalmente sulla base delle sue proprietà di barriera. Volendo pertanto destinare il multistrato ottenuto ad un uso alimentare si è proceduto ad una sua caratterizzazione dal punto di vista della permeabilità all'ossigeno e da un punto di vista della solubilità al vapor d'acqua. Sono stati testati anche la zeina termoplastica, il PCL e la blend TPZm+PCL (60/40) in modo da verificare se la soluzione del multistrato è quella ottimale per avere un film con buone proprietà a barriera all'ossigeno e al vapor d'acqua.

- Misure di permeabilità all'ossigeno

Le prove di permeabilità all'ossigeno sono state condotte a diverse temperature e a diverse pressioni di 1 atm.

L'apparecchiatura utilizzata è un circuito costituito da due zone

1. una zona ad alta pressione, posta a monte del film polimerico.
2. una zona a bassa pressione, posta a valle del film.

Tra di esse si trova la cella contenente il campione da analizzare. La zona ad alta pressione è dotata di un polmone, in cui si accumula il gas di prova e un trasduttore di pressione con fondoscala pari a 1000 torr; nella zona di valle, invece, è posto un trasduttore più sensibile, con un fondoscala pari a 0.001 torr.

La cella è divisa in due parti tra le quali va posizionato il film polimerico su cui si vuole effettuare la misura. Ciascun componente della cella è internamente dotato di due guarnizioni che consentono la tenuta della cella. Il flusso di gas raggiunge il campione attraverso un setto metallico microforato (Figura 1.7). Il sistema è, inoltre, dotato di un trasduttore differenziale di pressioni, di alcune termocoppie che controllano la temperatura dell'intero circuito, di un opportuno sistema di termostatazione a resistenze elettriche e di un collegamento ad una pompa per realizzare il vuoto nel circuito per consentire il desorbimento del campione.

Il software, sviluppato in ambiente Labview, è in grado di fornire la variazione nel tempo della pressione a valle della cella, da cui si può dedurre l'ammontare di gas permeato attraverso la membrana polimerica.

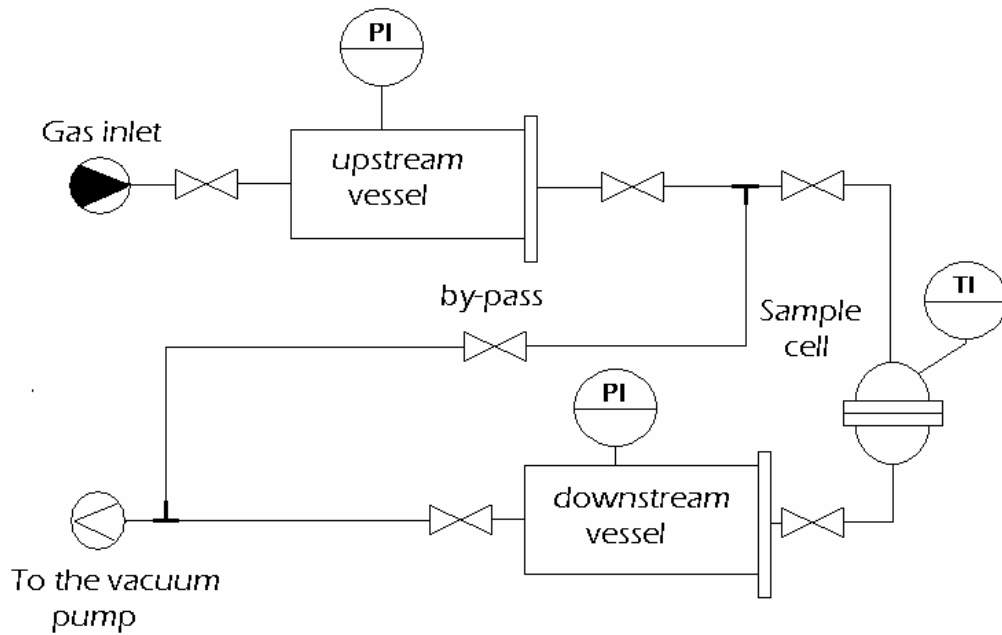


Figura 1.7 Schema dell'apparecchiatura utilizzata per effettuare prove di permeabilità all'ossigeno.

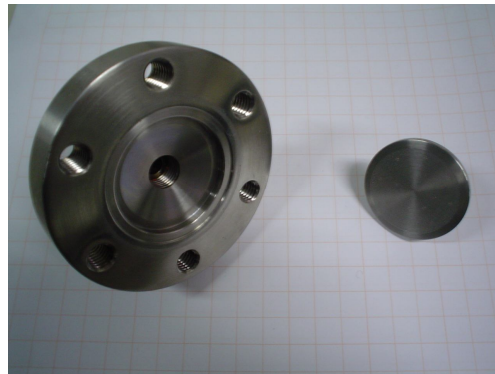


Figura 1.8 Particolare della cella del permeabilmetro.

Prima di ogni prova di permeabilità, sono state condotte prove a diverse pressioni e alla stessa temperatura, allo scopo di verificare l'esistenza di un'eventuale interazione tra materiali testati e gas permeante. Tali prove hanno mostrato l'indipendenza dei coefficienti di diffusione mutua D e di assorbimento S dalla concentrazione di penetrante.

Una prova di permeabilità viene condotta imponendo condizioni al contorno di attività del penetrante costanti nel tempo, a_0 a monte e a_1 a valle della membrana e riportando la quantità di diffondente permeata in funzione del tempo, si ottiene una curva di permeabilità che in genere si presenta come in Figura 1.9.

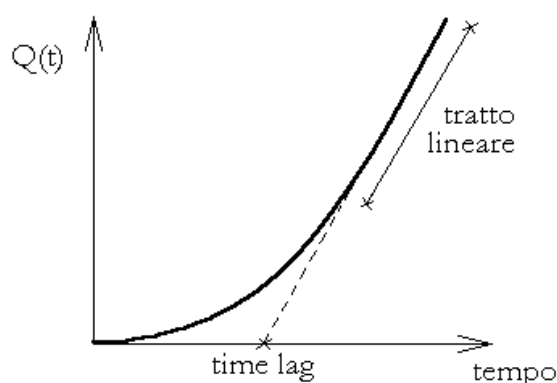


Figura 1.9: Curva di permeabilità.

Nella curva di permeabilità si distinguono due zone: il transitorio iniziale caratterizzato da un continuo aumento della pendenza e il tratto rettilineo di regime. Dal tratto finale è possibile stimare il coefficiente di permeabilità, mentre dall'intercetta di tale tratto con l'asse delle ascisse, "time lag", si ottiene una valutazione del coefficiente di diffusione. Nella Figura 1.10 sono riportate le curve di permeabilità all'ossigeno per il PCL, la blend TPZm+PCL (60/40) e il multistrato PCL/TPZm+PCL (60/40)/PCL.

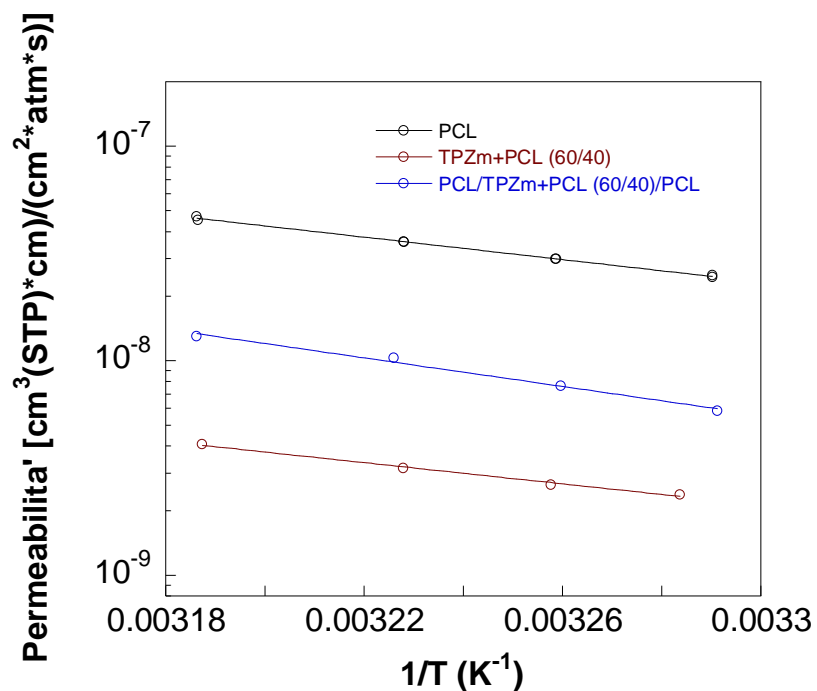


Figura 1.10: Curve di permeabilità all'ossigeno per il PCL, la blend TPZm+PCL (60/40) e il multistrato PCL/TPZm+PCL (60/40)/PCL.

Nelle Tabelle 1.5, 1.6 e 1.7 sono riportati invece i valori della diffusività e della permeabilità al variare della temperatura per gli stessi materiali..

Temperatura [°C]	Diffusività [cm ² /s]	Permeabilità [(cm ³ (STP) cm)/(cm ² s atm)]
30	8.3500e-07	2.5047e-08
33	8.6200e-07	2.9796e-08
36	9.3000e-07	3.5992e-08
40	1.0800e-06	4.5364e-08

Tabella 1.5: Diffusività e permeabilità del PCL al variare della temperatura.

Temperatura [°C]	Diffusività [cm ² /s]	Permeabilità [(cm ³ (STP) cm)/(cm ² s atm)]
30	2.4538e-08	2.3806e-09
33	3.4758e-08	2.6462e-09
36	3.8631e-08	3.1550e-09
40	4.7849e-08	4.0894e-09

Tabella 1.6: Diffusività e permeabilità della blend TPZm+PCL (60/40) al variare della temperatura.

Temperatura [°C]	Diffusività [cm ² /s]	Permeabilità [(cm ³ (STP) cm)/(cm ² s atm)]
30	1.7386e-05	6.0707e-09
33	1.7514e-05	7.6933e-09
36	1.7889e-05	1.0210e-08
40	2.3040e-05	1.3243e-08

Tabella 1.7: Diffusività e permeabilità del multistrato PCL/ TPZm+PCL (60/40)/PCL al variare della temperatura.

Per tutti i materiali analizzati la permeabilità all'ossigeno e la diffusività aumenta all'aumentare della temperatura e quindi al diminuire di 1/T. All'aumentare della temperatura aumenta infatti il volume libero del sistema e la permeazione delle molecole di ossigeno è facilitata. Il PCL mostra, come ci aspettavamo valori alti della permeabilità all'ossigeno e della diffusività. L'aggiunta di TPZm abbatta tali valori di permeabilità e di diffusività. La blend TPZm+PCL (60/40) presenta infatti in tutto il range di temperature analizzato valori di permeabilità all'ossigeno e di diffusività più bassi del PCL. I valori di permeabilità all'ossigeno e di diffusività del multistrato PCL/TPZm+PCL (60/40)/PCL sono invece più bassi

del PCL puro ma più alti della blend TPZm+PCL (60/40) essendo presente un quantitativo più alto di PCL.

- *Misure di assorbimento al vapor d'acqua*

Le misure di assorbimento al vapor d'acqua dei film studiati sono state effettuate con lo strumento Q 5000SA (Sorption analyzer) della TA Instruments (Figura 1.11).



Figura 1.11: Q5000 SA della TA Instruments.

La Q5000 SA è un sistema simmetrico dove il campione ed il riferimento sono esposti alle stesse condizioni ambientali (temperatura ed umidità) mediante un apposito sistema di controllo alloggiati in una "camera di umidità".

I principali componenti del sistema sono la temperatura controllata da una microbilancia, una camera ad umidità ed un autocampionatore: la camera ad umidità mantiene costante la temperatura e le condizioni di umidità per il campione ed il riferimento.

Nella camera d'umidità (Figura 1.12), trovano posto le celle per il campione ed il riferimento, il sistema di diffusione del gas, la linea di mescolamento per il vapor d'acqua e due sensori indipendenti per la misura del valore di umidità relativa in ciascuna cella. Tutto il sistema viene mantenuto alla stessa temperatura, che può variare in un intervallo tra i 5°C e gli 85°C.

Il valore di umidità relativa può essere monitorato attraverso una coppia di controllori di flusso di massa (*mass flow controller*, MFC) ed è possibile impostare un valore di umidità compreso tra 0 e 98%. I sensori posti nella cella di riferimento e quella del campione garantiscono che il valore di umidità sia quello effettivamente richiesto.

La bilancia (a cui sono agganciati i contenitori di riferimento e del campione) stabilisce la quantità di vapor d'acqua assorbita o desorbita dal campione in funzione dei diversi valori di umidità temperatura e tempo. Il trasporto del vapor d'acqua all'interno della camera di umidità è affidato ad un flusso di azoto (definito appunto *gas carrier*, come precedentemente visto per i permeabilimetri) che, prima di entrare nelle due camere, viene miscelato all'interno dell'umidificatore fino al raggiungimento del valore di umidità voluto.

La camera di umidità è totalmente motorizzata potendosi spostare verticalmente; i contenitori per i samples vengono automaticamente caricati attraverso un autocampionatore su cui si possono sistemare sino a dieci pan, in modo da poter stabilire a priori la sequenza dei test che si vogliono effettuare. I pan sono degli emisferi di quarzo che fungono da contenitori per il materiale di prova e quello di riferimento: presentano la particolare caratteristica di non subire

variazioni dimensionali o di peso in quanto non assorbono umidità e resistono adeguatamente al calore (nell'intervallo di temperature in cui vengono impiegati in queste analisi). Una volta calibrata la bilancia per il peso del campione e il valore di umidità si procede con la misura.

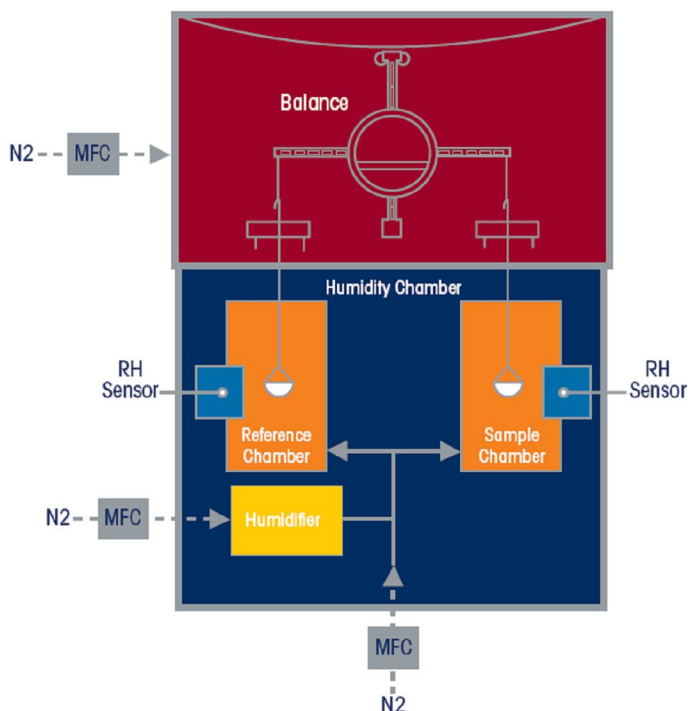


Figura 1.12: Schema della camera d'umidità della Q5000 SA (fonte TA Instruments).

Misure di assorbimento al vapor d'acqua sono state condotte sulla TPZm, sul PCL, sulla blend TPZm+PCL (60/40) e sul multistrato PCL/ TPZm+PCL (60/40)/PCL al variare del coefficiente di umidità e quindi dell'umidità relativa ($a_w = \%RH/100$) alla temperatura costante di 30°C.

In Figura 1.13 sono riportate le curve di assorbimento al vapor d'acqua in funzione del coefficiente di attività per i materiali analizzati.

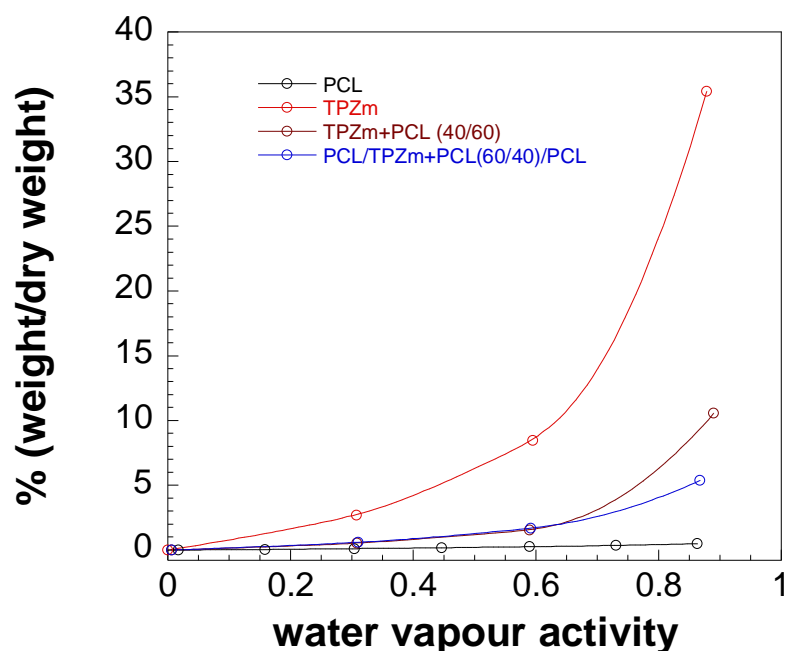


Figura 1.13: Curve di assorbimento al vapor d'acqua per la TPZm, il PCL, la blend TPZm+PCL (60/40) e il multistrato PCL/TPZm+PCL (60/40)/PCL.

Come ci aspettavamo l'assorbimento è nullo per il PCL e più significativo per la TPZm. In particolare, per la TPZm i valori di assorbimento al vapor d'acqua crescono con legge di tipo esponenziale all'aumentare del coefficiente di attività dell'acqua e quindi dell'umidità relativa. L'umidità relativa, infatti, da origine ad un effetto plasticizzante o di rigonfiamento del polimero, con conseguente incremento dell'assorbimento.

L'aggiunta di PCL alla TPZm determina un abbattimento dei valori di assorbimento al vapor d'acqua sia per blend TPZm+PCL (60/40) che per il multistrato PCL/TPZm+PCL (60/40)/PCL.

La cosa interessante da osservare è che fino a valori del coefficiente di attività pari a 0.6 (corrispondenti ad un valore dell'umidità relativa del 60%) i valori di assorbimento della blend e del multistrato coincidono. Solo per valori più alti di umidità il multistrato è una migliore barriera all'umidità rispetto alla blend.

1.8 – Bagnabilità

La natura idrofillica o idrofobica dei film di TPZm, PCL, TPZm+PCL (60/40) e del multistrato PCL/TPZm+PCL (60/40)/PCL è stata valutata anche attraverso misure di bagnabilità. Solitamente la bagnabilità di una superficie solida viene determinata attraverso misure di angolo di contatto.

L' **angolo di contatto** è una grandezza termodinamica descritta dall'angolo formato dall'incontro di un'interfaccia liquido-vapore con un'interfaccia liquido solido o, meno tipicamente, un'interfaccia liquido-liquido.

Tale grandezza è definita per una superficie ideale, ossia liscia ed omogenea, dalla relazione di Young, qui rappresentata in Figura 1.14, ove γ_{gs} è la tensione interfacciale gas-solido, γ_{ls} è la tensione interfacciale liquido-solido e γ_{lg} quella liquido-gas; nella sezione di una goccia di liquido depositata su un solido, esso è l'angolo compreso tra la direzione della tensione solido-liquido e la direzione della tensione liquido-gas, tangente alla superficie esterna della goccia, con il vertice nel punto trifase liquido-solido-gas. L'angolo di contatto, con queste ipotesi, corrisponde alla grandezza termodinamica che minimizza l'energia libera

superficiale del sistema ed è fisicamente descritto dalla legge di Young, che corrisponde al bilancio delle forze orizzontali agenti su una goccia di volume trascurabile deposta su una superficie ideale.

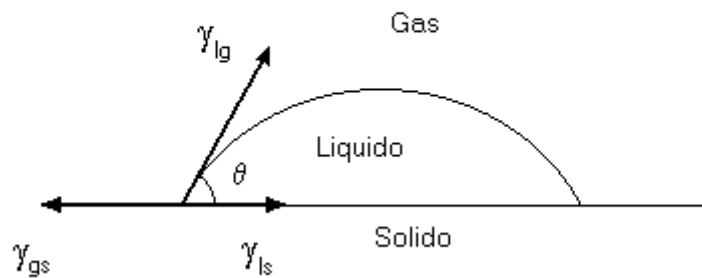


Figura 1.14: L'angolo di contatto θ di un liquido su una superficie.

Per convenzione si parla di scarsa bagnabilità quando la superficie ha un angolo di contatto maggiore di 90° e di elevata bagnabilità quando la superficie ha un angolo di contatto minore di 90° (vedi Figura 1.15).

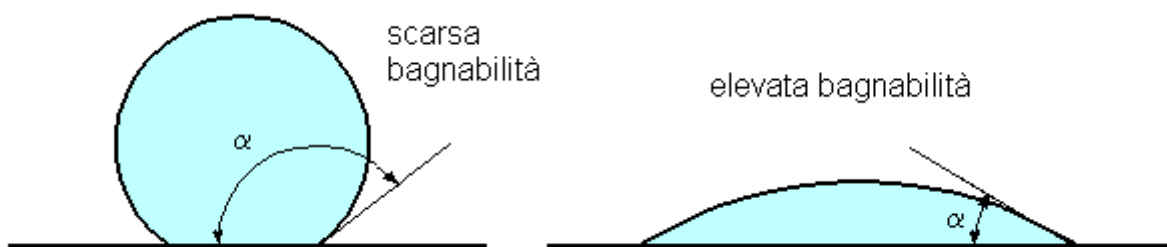


Figura 1.15: Correlazione angolo di contatto e bagnabilità.

Le superficie poco bagnabili spesso sono caratterizzate anche da un basso assorbimento capillare di acqua. Da qui la necessità di studiare tale proprietà per film da utilizzare nel settore degli imballaggi alimentari.

Le misure di angolo di contatto sono state realizzate con un sistema di misura di angolo di contatto OCA20 (Dataphysics, Italia).

Una goccia di acqua (1 μ L) è stata dispensata sulla superficie del film e l'angolo di contatto è stato misurato attraverso l'utilizzo del Software SCA20 (Dataphysics, Italia).

Dieci misure su differenti regioni del film per ciascun materiale sono state realizzate. I risultati ottenuti sono riportati in Figura 1.16.

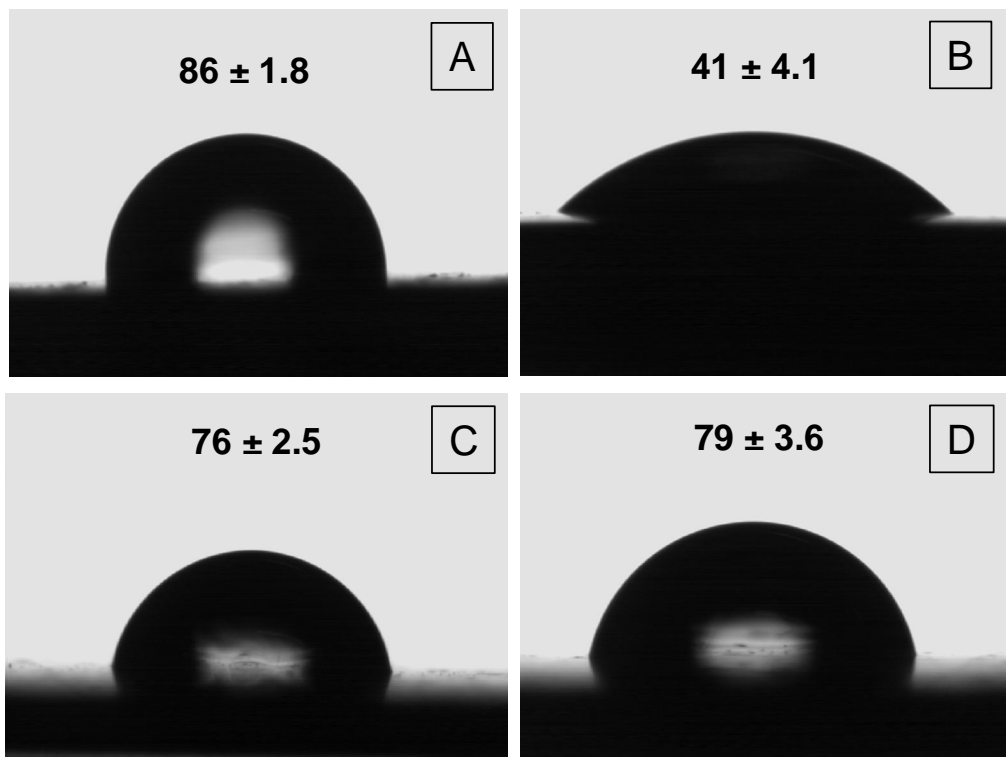


Figura 1.16: Misure di angolo di contatto del A) PCL, B) TPZm, C) TPZm+PCL (60/40), D) PCL/TPZm+PCL (60/40)/PCL.

L'aggiunta di PCL alla TPZm determina un incremento significativo del suo angolo di contatto. La blend TPZm+PCL (60/40) diventa pertanto meno bagnabile della zeina termoplastica tal quale. Non si osservano differenze significative nel valore dell'angolo di contatto se si riveste lo strato di TPZm+PCL (60/40) con due strati di PCL. Il multistrato presenta infatti un valore dell'angolo di contatto molto simile a quello della blend. Questo comportamento potrebbe essere spiegato ipotizzando che nella fase di pressatura della blend TPZm+PCL (60/40) il PCL va a creare uno skin esterno che simula la funzione degli strati esterni di PCL nel multistrato. I valori di angolo di contatto sono forniti

insieme alle loro deviazioni standard. Tali deviazioni sono definite a causa della rugosità ed eterogeneità della superficie su cui si effettuano le misure.

1.9 – Conclusioni

L'idea di associare alla zeina termoplastica un materiale polimerico biodegradabile con buone proprietà barriera all'umidità e buone proprietà meccaniche, sia in forma di blend che di accoppiato, ci permette di realizzare film per imballaggi alimentari aventi discrete proprietà meccaniche e buone proprietà a barriera all'ossigeno e al vapor d'acqua. In particolare è stato osservato che la blend da sola può anch'essa essere utilizzata come imballaggio alimentare se la si utilizza in condizioni ambientali di umidità relativa non superiori al 60%., mentre il multistrato risulta più efficace e conveniente in condizioni di umidità relativa più drastiche (>60%).

2

Film “attivi” a base di zeina termoplastica e PCL

2.1 – Introduzione

Gli attuali sistemi d’imballaggio esplicano la funzione di protezione nei confronti dell’alimento regolando la velocità con cui sostanze a basso peso molecolare, responsabili del deterioramento del prodotto confezionato, permeano attraverso la confezione.

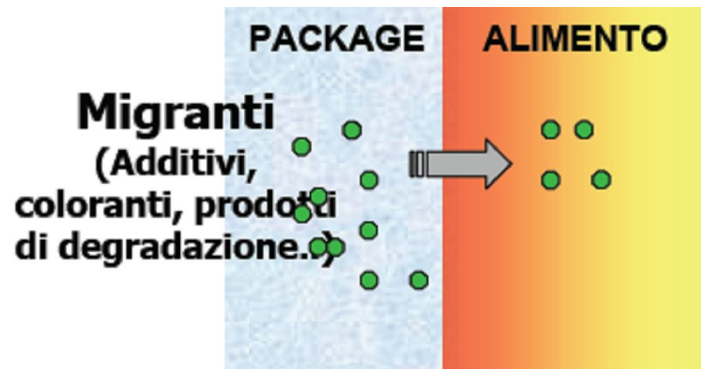


Figura 2.1: Interazione imballaggio (package)-alimento.

In molti casi un approccio di questo tipo non consente di ottenere il desiderato prolungamento della vita commerciale (shelf life) del prodotto. Questo è in parte dovuto alla scarsa selettività dei materiali utilizzati. Si consideri ad esempio il caso di prodotti contenenti grasso, per i quali la causa principale di deterioramento è legata all'ossidazione di acidi grassi insaturi. Il materiale utilizzato per realizzare la confezione dovrebbe essere caratterizzato da un'elevata barriera all'ossigeno e una scarsa barriera ai prodotti secondari della reazione di ossidazione. Nei fatti, non è possibile trovare un materiale in grado di conciliare in maniera soddisfacente entrambe le esigenze.

Per questo motivo sono stati proposti sistemi d'imballaggio “attivi” che operano in maniera del tutto diversa da quelli tradizionali.

Gli imballaggi attivi agiscono direttamente sulla causa principale del deterioramento dell'alimento eliminando dalla confezione le sostanze indesiderate o rilasciando quelle utili al fine di prolungare la shelf-life degli alimenti confezionati. .

In questo caso la sicurezza e la qualità del prodotto alimentare confezionato è il risultato di interazioni complesse tra l'alimento, la confezione e l'ambiente (Figura 2.2).

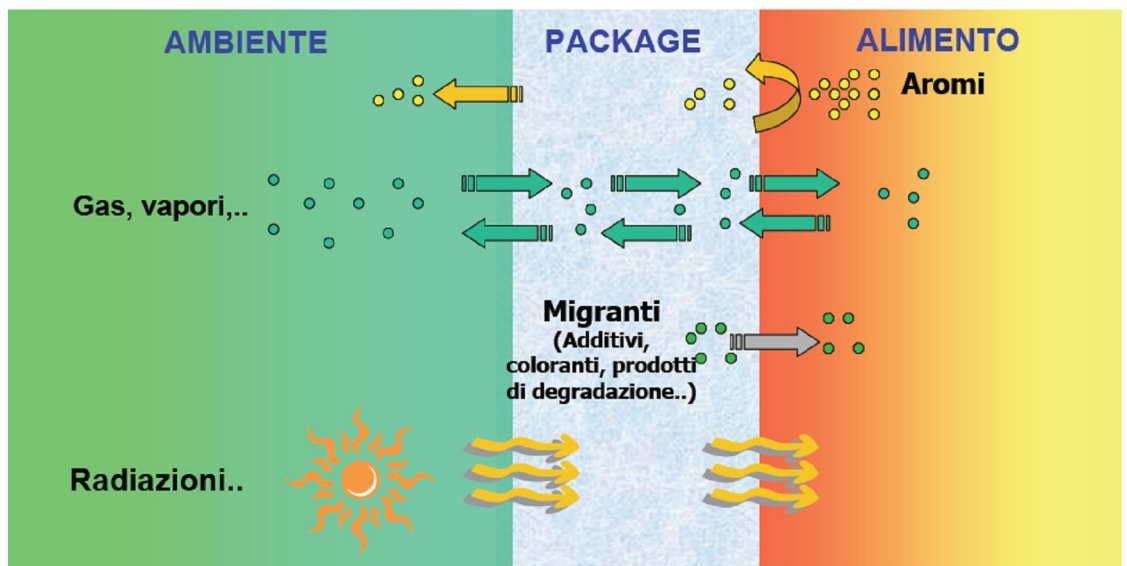


Figura 2.2: Interazione ambiente-package-alimento.

In Tabella 2.1 sono riassunte le principali funzioni dei film attivi.

FUNZIONE	AZIONE	APPLICAZIONE
Assorbitori di ossigeno	+shelf life/-reaz ossidazione/antimicrobica	Carne, pesce, latte in polvere, ecc
Emettitori/Assorbitori di CO2	+shelf life/ antimicrobico/ coadiuvante MAP	Carne, pesce, formaggi, ecc
Assorbitori di umidità (acqua libera e vapori)	+shelf life/+ prest. sensoriali/antimicrob.	Prodotti con essudati (carne, pesce, ecc.); alimenti secchi
Assorbitori di etilene	+shelf life/-maturazione	Frutta e ortaggi
Emettitori di etanolo	-raffermimento/antimicrob.	Prodotti da forno
Antimicrobici	+shelf life/antimicrobici	Prodotti ad elevata aw

Tabella 2.1: Possibili funzioni dei film attivi.

Tra gli imballaggi attivi, una delle tipologie più interessanti è quella relativa ai materiali di confezionamento che esplicano una funzione antimicrobica. Tali materiali sono realizzati inglobando nella matrice polimerica una sostanza attiva che, a contatto con l'alimento (sia esso liquido o solido), esplica una azione antimicrobica ovvero è in grado di ritardare o addirittura inibire la crescita di quei microrganismi responsabili del deterioramento del prodotto confezionato.

Differenti sostanze chimiche come acidi organici e inorganici, metalli, alcoli e ammine possono essere incorporate negli imballaggi alimentari come sostanze antimicrobiche [7-8].

Tuttavia, a causa della diffidenza dei consumatori, oggi la ricerca si sta interessando sempre di più all'utilizzo di sostanze attive di origine biologica per la realizzazioni di film per imballaggio alimentare antimicrobici.

Le sostanze attive di origine biologica includono battericidi come la nisina, pediocina e latticina e enzimi come il lisozima, la chitinase e il glucosio ossidasi [9].

Inglobare queste sostanze in film biodegradabili risulta più semplice di quanto non lo sia per i film polimerici commerciali. Le condizioni di processo dei film biodegradabili sono più dolci e non inducono pertanto la disattivazione delle sostanze attive come può accadere nei processi di miscelazione ed estrusione della maggior parte dei polimeri commerciali [7- 8-10]. Differenti film biodegradabili edibili sono stati utilizzati per la realizzazione di film attivi con sostanze di origine biologica come i derivati della cellulosa, alginati e le proteine del frumento [8-10-11-12].

Recentemente, un particolare interesse è stato rivolto sulla possibilità di inglobare sostanze attive come il lisozima e la nisina [13-14-15-16] in film di zeina. Questi film vengono ottenuti generalmente per casting e utilizzati in generale per confezionare alimenti [15-17] e più in particolare come imballaggi ad atmosfera modificata per confezionare i vegetali [18].

Da qui l'idea di realizzare film attivi per imballaggi alimentari a base di zeina termoplastica e PCL utilizzando come sostanza antimicrobica il lisozima. Si è voluto però studiare la possibilità di inglobare tale sostanza attiva nella matrice polimerica attraverso un processo di miscelazione solitamente utilizzato per i polimeri convenzionali fornendo un ulteriore valore aggiunto al film prodotto.

Tenendo in considerazione che la concentrazione della sostanza attiva rilasciata deve essere mantenuta entro certi limiti per annullare eventuali rischi di tossicità per l'organismo umano e per evitare problemi di tipo organolettico, sono state controllate le cinetiche di rilascio dell'agente attivo a temperatura ambiente.

2.2 – Materiali

Zeina

La zeina di mais (cod.: Z3625, numero di lotto: 093K1055) è stata acquistata dalla Sigma-Aldrich (Italia). Il Polietilenglicole 400 (PEG 400) è stato utilizzato come plasticizzante per la zeina ed è stato acquistato dalla Fluka (Italia).

PCL

Il PCL (CAPA 680), la cui formula chimica è rappresentata in Figura 2.3, è stato acquistato dalla Solvay (Belgio).

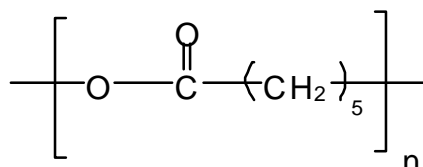


Figura 2.3: Formula chimica del PCL.

Lisozima

Il lisozima (125 aminoacidi, PM = 14000 Da) è uno dei più diffusi antimicrobici di origine biologica utilizzati nel settore degli imballaggi alimentari [10-12].

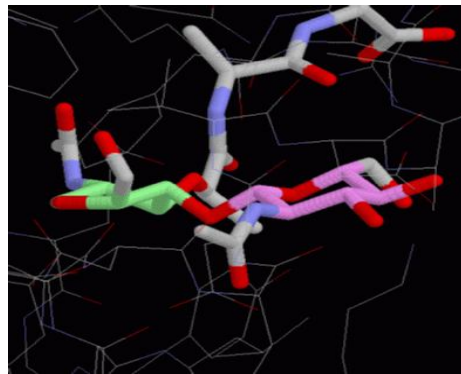


Figura 2.4: Il lisozima.

Essa si trova in molti tessuti animali ed umani ma la più importante risorsa commerciale per ricavarla è il bianco d'uovo della gallina.

Questo enzima presenta effetti antimicrobici nei confronti essenzialmente di batteri Gram-positivi e contro qualche Gram-negativo, ma naturalmente, minore è la specificità d'azione, minore risulta essere anche l'efficacia.

Il lisozima è un enzima che esplica la sua azione rompendo la parete cellulare delle cellule batteriche. Esso presenta un'attività di tipo batteriolitico che causa la distruzione della parete cellulare e quindi la morte delle cellule per fattori osmotici.

Benkerroum e Sandine [19] hanno mostrato che il lisozima è efficace anche nei confronti di un pericoloso agente patogeno dei cibi, la *Listeria monocytogenes*. E' importante evidenziare come studi tossicologici condotti sul lisozima hanno dimostrato che è una sostanza non dannosa per l'organismo umano e, come tale, approvata per l'uso alimentare.

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato il lisozima ricavato dal bianco d'uovo della gallina ed è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich (Italia) con il codice L-6876.

2.3 – Procedura di preparazione del film attivo

La procedura utilizzata per preparare la zeina termoplastica (TPZm) è quella descritta nella parte I, paragrafo 5.2.

La miscela TPZm+PCL (60/40) + 3%wt di lisozima sul peso totale della blend è stata realizzata anch'esse utilizzando un miscelatore controrotante (Rheomix 600 Haake, Germania).

I granuli di TPZm, costituenti la fase maggiore, sono stati prima miscelati a 70°C, 20rpm per 2 min. e successivamente il PCL è stato aggiunto nella camera di miscelazione e miscelato con la TPZm a 80 rpm per 6 min. A questo punto il lisozima è stato aggiunto alla blend e miscelato a 20rpm per 3 minuti in modo da realizzare una sua uniforme distribuzione.

Una pressa a caldo P300P (Collin, Germania) è stata poi utilizzata per preparare film di zeina termoplastica. I materiali

raccolti dal miscelatore sono stati riscaldati alla stessa temperatura di miscelazione e pressati a 50 bar per 10 minuti e successivamente raffreddati a 30°C sotto pressione. Dalla zona centrale dei film sono stati ricavati i campioni per le prove di rilascio.

2.4 – Prove di rilascio

Le cinetiche di rilascio sono state effettuate per determinare la quantità di agente antimicrobico rilasciata dalla matrice polimerica una volta che questa veniva messa in contatto con una soluzione acquosa. In particolare, sono stati preparati campioni della dimensione di 8cmx8cm e sono stati posti in vaschette contenenti 200 ml di acqua distillata, a temperatura ambiente. Sono stati effettuati prelievi dalla soluzione acquosa a diversi tempi per misurare la quantità di agente antimicrobico (lisozima) rilasciato nel tempo. La curva che rappresenta la cinetica di rilascio dell'agente antimicrobico dal film è data dalla media di almeno tre ripetizioni.

2.4.1 – Determinazione del lisozima rilasciato

Per determinare la quantità di lisozima rilasciata in soluzione acquosa è stato utilizzato uno spettrofotometro Vary Carian. Il metodo scelto fa riferimento a quello proposto da [20]. Sono stati registrati i valori di assorbanza in corrispondenza della lunghezza d'onda di 280 nm. e la quantificazione del

lisozima rilasciato in soluzione è stata effettuata facendo riferimento alla curva di calibrazione ottenuta riportando le assorbanze dei picchi ottenuti per soluzioni a concentrazioni note di lisozima in acqua.

-Retta di calibrazione

In Figura 2.5 sono riportati i valori di assorbanza letti a 280nm in funzione delle diverse concentrazioni di lisozima.

La retta ottenuta è:

$$Y=0.0025x+0.017$$

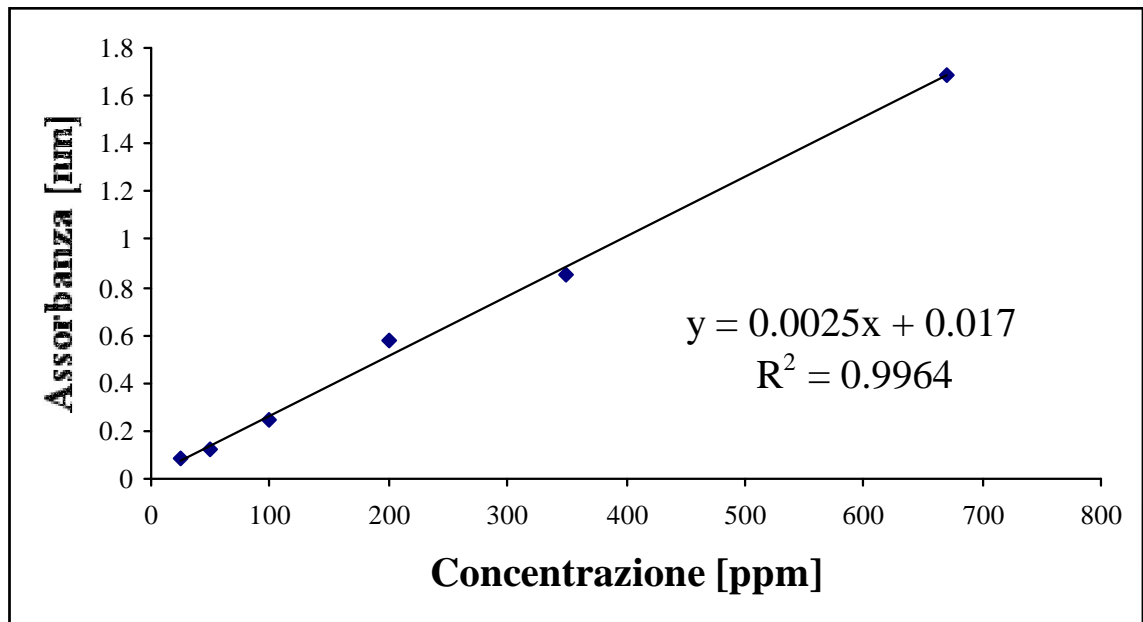


Figura 2.5: Retta di calibrazione.

La concentrazione di lisozima rilasciato dal film in un certo tempo t è ottenuta in questo modo:

$$C_{\text{lisozima}}(t) = (\text{Assorbanza}(t) - 0.017) / 0.0025$$

-Cinetica di rilascio

In Figura 2.6 è riportata la cinetica di rilascio del lisozima in acqua per il film TPZm+PCL (60/40) +3%lisozima.

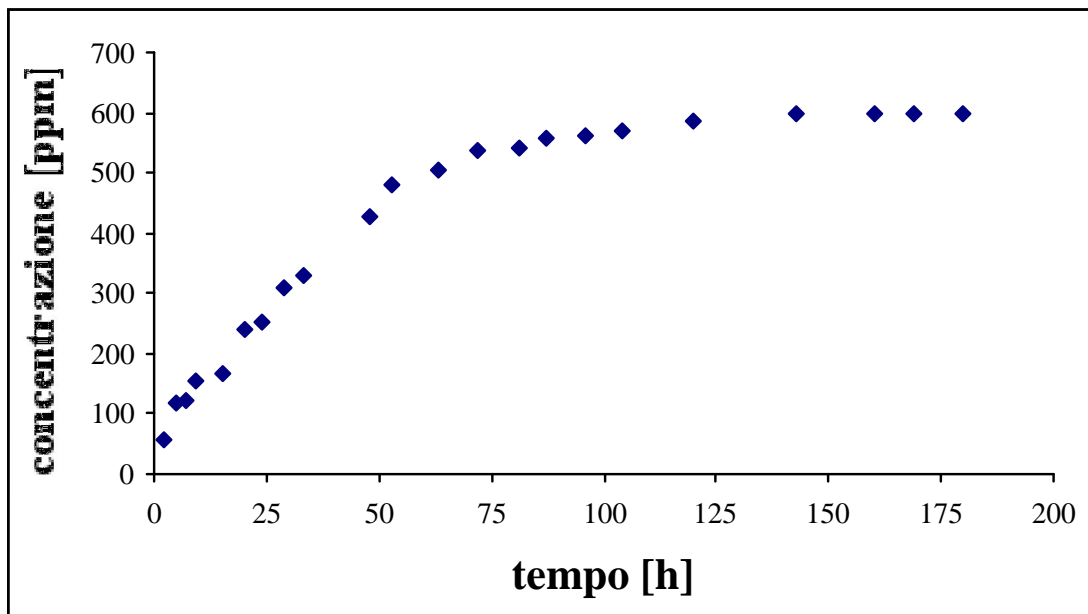


Figura 2.6: Cinetica di rilascio del lisozima per il film TPZm+PCL (60/40) +3%lisozima.

La quantità di lisozima rilasciata aumenta nel tempo fino a raggiungere un valore asintotico dopo circa 130 ore. Il valore di equilibrio raggiunto è pari al valore di lisozima presente nel

campione in prova. Questo vuol dire che non si viene a creare durante la fase di miscelazione e pressatura nessun tipo di interazione tra la matrice polimerica TPZm+PCL e il lisozima. Quest'ultimo pertanto è libero di essere rilasciato completamente durante il test.

Se si confronta la cinetica di rilascio della blend TPZm+PCL con quella ottenuta da Mecitoglu et al. [21] per film attivi di zeina e lisozima ottenuti per casting, si osserva come l'effetto concomitante del processo di miscelazione, che favorisce una maggiore uniformità di distribuzione della sostanza attiva nella matrice polimerica, e della presenza di PCL che è un polimero come sappiamo meno sensibile all'acqua, determina un rallentamento della cinetica di rilascio.

Per i film di zeina di Mecitoglu il valore asintotico di concentrazione rilasciata è raggiunto solo dopo circa 200 min., mentre per il nostro film come abbiamo detto poc'anzi tale valore è raggiunto dopo circa 130h.

Questo è molto promettente da un punto di vista applicativo, in quanto ci permette di utilizzare il nostro imballaggio per confezionare alimenti con una shelf life più lunga ed in particolare pari circa a 5 giorni.

Bibliografía – Parte II

- [1] Avérous L., Moro L., Dole P., Fringant C., 2000, "**Properties of thermoplastic blends: starch-polycaprolactone**". *Polymer*, 41: 4157–4167.
- [2] Martin O., Avérous L., 2001, "**Poly(lactic acid): plasticization and properties of biodegradable multiphase systems**". *Polymer*, 42: 6209–6219.
- [3] Avérous L., Fringant C., 2001, "**Association between plasticized starch and polyesters: processing and performances of injected biodegradable systems**". *Polym. Eng. Sci.*, 41: 727–734.
- [4] Avérous L., Fauconnier N., Moro L., Fringant C., 2000, "**Blends of thermoplastic starch and polyestamide: processing and properties**". *J. Appl. Polym. Sci.*, 76: 1117–1128.
- [5] Vidal R., Martí´nez P., Mulet E., Gonza R., Lo´pez-Mesa B., Fowler P., Fang J. M., 2007, "**Environmental assessment of biodegradable multilayer film derived from carbohydrate polymers**". *J Polym Environ*, 15:159–168.
- [6] Wang L., Shogren R.L., Carriere C., 2000, "**Preparation and properties of thermoplastic starch-polyester laminate sheets by coextrusion**", *Polym. Eng. Sci*, 40: 499-506.
- [7] Appendini, P., Hotchkiss, J. H., 2002, "**Review of antimicrobial food packaging**". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3:113–126.
- [8] Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., & Bigger, S. W., 2003, "**Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications**". *Journal of Food Science*, 68(2): 408–420.
- [9] Labuza, T. P., & Breene, W. M., 1989, "**Applications of "active packaging" for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods**". *Journal of Food Processing and Preservation* 13:1–69.
- [10] Han, J. H., 2000, "**Antimicrobial food packaging**". *Food Technology*,54(3): 56–65.
- [11] Cha, D. S., Choi, J. H., Chinnan, M. S., & Park, H. J., 2002, "**Antimicrobial Wlms based on Na-alginate and k-carrageenan**". *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 35(8): 715–719.
- [12] Quintavalla, S., & Vicini, L., 2002, "**Antimicrobial food packaging in meat industry**". *Meat Science* 62: 373–380.

- [13] Dawson, P., HoVman, K., & Han, I., 2000, "**Biocide-impregnated food Wlms to inhibit food pathogens**". In Second NSF international conference on food safety, Savannah, GA pp.: 11–13.
- [14] HoVman, KL., Han, I. Y., & Dawson, P. L., 2001, "**Antimicrobial eVects of corn zein Wlms impregnated with nisin, lauric acid, and EDTA**". Journal of Food Protection 64(6): 885–889.
- [15] Janes, M. E., Kooshesh, S., & Johnson, M. G., 2002, "**Control of Listeria monocytogenes on the surface of refrigerated, ready-to-eat chicken coated with edible zein Wlm coatings containing nisin and/or calcium propionate**". Journal of Food Science 67(7): 2754–2757.
- [16] Teerakarn, A., Hirt, D. E., Acton, J. C., Rieck, J. R., & Dawson, P. L., 2002, "**Nisin diVusion in protein Wlms: eVects of Wlm type and temperature**". Journal of Food Science 67(8): 3019–3025.
- [17] Herald, T. J., Hachmeister, K. A., Huang, S., & Bowers, J. R., 1996, "**Corn zein packaging materials for cooked turkey**". Journal of Food Science 61(2): 415–418.
- [18] Rakotonirainy, A. M., Wang, Q., & Padua, G. W., 2001, "**Evaluation of zein Wlms as modiWed atmosphere packaging for fresh broccoli**". Journal of Food Science 66(8): 1108–1111.
- [19] Benkerro, N., Sandine, W.E., 1988, "**Inhibitory action of nisin on Listeria monocytogenes**". Journal of Dairy Science. 71: 3237-3245.
- [20] Genili, S., Yemenicio glu, A., Altinkaye, S.A., 2009, "**Development of cellulose acetate based antimicrobial food packaging materilas for controlled release of lysozyme**", Journal of Food Engineering 90(4): 453-462.
- [21] Mecitoglu, C., Yemennicioglu, A., Arslanoglu, A., Emaci, Z.S., Korel, F., Cetin, A.E., 2005, "**Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging**". Food research International 39: 12-21.

Parte III

Nuove tecnologie di sterilizzazione/ pastorizzazione

Effetto del trattamento ad alta pressione sul multistrato a base di zeina

1.1 – Introduzione

Nel settore del packaging alimentare, la sterilizzazione rapida ed economicamente produttiva di ingenti quantità di confezioni in macchine altamente specializzate rappresenta l'obiettivo principale, e la totale disattivazione di tutte le spore¹ non è strettamente necessaria.

¹ Le **spore** sono cellule disidratate. Esse sono in grado di disperdersi nell'ambiente per resistere a condizioni avverse e, successivamente, generare (o rigenerare) un individuo vitale, in habitat più adatti alle loro condizioni di vita (temperatura ottimale, presenza di acqua e di sostanze nutrienti).

Attualmente la sterilizzazione delle confezioni è eseguita con l'uso di alta temperatura, agenti chimici o radiazioni. Questi metodi presentano numerosi svantaggi.

I prodotti chimici spesso lasciano un residuo che può intaccare la sicurezza ed il gusto del prodotto e producono rifiuti indesiderati. Ad esempio esistono ancora molti punti interrogativi sulle proprietà cancerogene dei residui dell'ossido di etilene adsorbiti dai materiali dopo il trattamento di sterilizzazione. In alcuni casi vengono usate anche la formaldeide liquida e la glutaraldeide, sebbene siano nocive. Il riscaldamento è tangibile e sufficientemente rapido, ma si rende necessario l'uso di costosi materiali plastici resistenti al calore.

L'irradiazione Gamma colpisce le proprietà dei polimeri sottoposti a trattamento, e spezza le unioni e i collegamenti all'interno del volume dei materiali.

Da qui la necessità di sperimentare nuovi trattamenti di sterilizzazione/pastorizzazione degli imballaggi basati sull'utilizzo di alte pressioni.

1.2 – Il processo di sterilizzazione ad alta pressione

Il processo ad alte o altissime pressioni (HPP High Pressure Processing), è un trattamento innovativo di conservazione e trasformazione degli alimenti, sperimentato con successo negli ultimi 20 anni.

L'idea di base consiste nel sostituire la classica tecnica di sterilizzazione mediante impiego di calore con un procedimento che sfrutta un'elevata pressione idrostatica su un prodotto alimentare appena confezionato, immergendolo all'interno di una camera cilindrica specificatamente realizzata e riempita con un apposito liquido.

L'idea, in verità, non è nuova: le altissime pressioni (3000-10000 atmosfere) furono indagate come ipotetico metodo di risanamento del latte, di frutta e vegetali già all'inizio del '900, dimostrandone l'abilità sia nell'eliminare la flora microbica patogena (ovvero le cellule di microrganismi quali la salmonella, lo stafilococco, alcune forme pericolose di *Escherichia coli*), sia nel preservare le caratteristiche sensoriali degli alimenti, consentendone dunque una "vita" commerciale allungata. Tali ricerche furono tuttavia interrotte, certo per l'indisponibilità pratica di attrezzature in grado di applicare le alte pressioni alla produzione di massa degli alimenti, sia perché contemporaneamente si studiavano gli effetti dei trattamenti termici di pastorizzazione, più economici. Inoltre, all'epoca, non erano ancora disponibili i moderni e prestanti imballaggi in materie plastiche. Occorre arrivare alla fine del secolo affinché questo trattamento venga rispolverato, rivisitato agli occhi delle più moderne conoscenze inerenti gli obiettivi di sicurezza e preservazione della qualità nutrizionale e sensoriale, riproposto come potenzialmente applicabile anche su scala industriale.

In pochi anni i prodotti stabilizzati per pressurizzazione escono dagli studi di laboratorio e diventano una realtà. La storia del successo, sul mercato americano, è quella di una

purea di avocado (il guacamole) stabilizzato per alte pressioni e commercializzato in regime di refrigerazione: il prodotto allunga la sua vita di scaffale (ovvero la sua durabilità), è gradevole poiché mantiene i caratteri sensoriali di freschezza e non acquisisce i retrogusti indotti dai soliti trattamenti termici di stabilizzazione. Sul mercato giapponese, prima ancora, erano già comparsi succhi di frutta, yogurt, gelatine di frutta e specialità dolciarie stabilizzati per pressurizzazione e quindi non assoggettati ad alcun trattamento termico, prodotti che proponevano un elevato valore sensoriale e nutrizionale rispetto agli standard equivalenti.

Nell'attuale panorama dell'innovazione tecnologica dei processi di conservazione degli alimenti, i trattamenti HPP ricevono enorme interesse: i più prestigiosi laboratori di ricerca stanno investigando questa tecnologia ed i maggiori gruppi industriali alimentari stanno sperimentandola, mentre fioriscono applicazioni commerciali ad opera di piccole o medie aziende: prosciutto cotto affettato in busta (Spagna), succo di arancia (Francia), ostriche e frutti di mare (USA e Europa), salse e condimenti (USA), tranci di pesce (Italia).

1.2.1 – Le innovazioni ed i vantaggi del HPP

Rispetto alle altre tecnologie innovative proposte la pressurizzazione ha un vantaggio innato: non determina che modesti innalzamenti di temperatura del prodotto, raggiunge un sufficiente grado di sanificazione, consente di trattare unità di prodotto di differente geometria e spessore, inoltre

preserva la qualità nutrizionale o sensoriale, ed in alcuni casi consente addirittura di ideare prodotti caratterizzati da una nuova struttura [1-2].

I trattamenti HPP raggiungono l'obiettivo della pastorizzazione (ovvero della *eliminazione consistente* delle forme microbiche vegetative) in un regime realistico di applicazione di pressione compreso tra le 2000 e le 7000 atmosfere a temperature comprese tra i 30 e 40 °C; mentre per ottenere effetti di *sterilizzazione* (ovvero l'eliminazione delle forme sporigene dei microrganismi) occorre una pressione compresa tra le 2000 e le 7000 atm e un'alta temperatura tra i 90 e i 110 °C.

Il maggiore interesse, del resto, risiede nell'accoppiamento fra HPP ed altre tecniche di conservazione (refrigerazione, congelamento, impiego di acidulanti, protezione in atmosfere modificate) secondo i principi oggi sovente perseguiti delle "hurdle technologies": questo termine indica la combinazione dei processi di conservazione attuati su un determinato prodotto. Gli "hurdes" (letteralmente "ostacoli" o "salti") includono la temperatura, l'acidità, l'attività dell'acqua, l'impiego di antimicrobici o di atmosfere modificate ed il potenziale redox.

In generale, l'HPP comporta i seguenti **vantaggi** [3]:

- notevole riduzione di: agenti patogeni, virus, parassiti ed allergeni;
- il processo non danneggia batteri importati ed utili per la nostra alimentazione (come quelli contenuti nell'acido

lattico) permettendo loro di continuare a crescere e permanere nell'alimento;

- lascia pressoché invariati i valori nutrizionali, la forma, i sapori e gli odori caratteristici dei vari alimenti trattati;
- aumenta la "vita di scaffale" dei prodotti;
- si possono impiegare imballaggi biodegradabili (che non resisterebbero alla pastorizzazione);
- il processo può essere applicato ad una vasta gamma di alimenti (purché siano "elastici" quanto basta per essere compressi).

Ma comporta anche i seguenti **svantaggi**:

- per effettuare una sterilizzazione completa (che elimini anche i virus), occorre impiegare pressioni molto elevate;
- può provocare cambiamenti estetici superficiali nell'aspetto dell'alimento (come ad esempio un colore più opaco oppure un leggero annerimento, senza tuttavia pregiudicarne il gusto).

1.2.2 – La tecnologia del HPP ed i principi di funzionamento

Il processo viene applicato a prodotti liquidi sfusi o confezionati in buste di materiale plastico, ma anche a prodotti solidi "elastici" (come pesce o carni). I sistemi che applicano la pressurizzazione sono discontinui e costituiti da camere cilindriche, colme, nel caso dei prodotti in busta, di acqua o di una miscela oleosa, che circonda il prodotto e trasmette in modo isostatico la pressione, che viene "creata" da un circuito meccanico ed idraulico. La pressione "di lavoro"

viene raggiunta in pochi istanti e poi mantenuta per minuti o decine di minuti. Il trattamento avviene a temperatura ambiente, a caldo (in base alle esigenze del prodotto).

I **principi** su cui si basa l'effetto di stabilizzazione prodotto dalle alte pressioni sono i seguenti:

1. *Principio di Le Chatelier.* le reazioni chimiche accompagnate da diminuzione del volume (con volume di attivazione negativo, ad esempio transizioni di fase, denaturazione delle proteine, gelificazione dei carboidrati) sono favorite dall'innalzamento della pressione. Da questo principio dipende l'effetto di inattivazione della flora microbica:

- si genera denaturazione delle proteine e degli enzimi costitutivi delle cellule microbiche;
- si producono danni diretti ai processi di replicazione e trascrizione del DNA cellulare;
- si ottiene la solidificazione delle componenti fosfolipidiche della membrana cellulare e la conseguente rottura delle membrane cellulari.

Nel caso delle forme sporigene dei microrganismi l'effetto delle alte pressioni è inferiore: le spore possono essere eliminate solo in combinazione ad un trattamento termico moderato.

2. *Regola isostatica:* il trattamento idrostatico ad alte pressioni è indipendente dal volume, essendo la pressione distribuita uniformemente alla superficie ed all'interno del prodotto: conseguentemente i trattamenti HPP sono indipendenti dalla forma e dallo "spessore" degli alimenti.

3. *Riscaldamento adiabatico*: la pressurizzazione è accompagnata da un incremento uniforme di temperatura. La misura del riscaldamento adiabatico è caratteristica di ogni componente (acqua: circa 3°C/100MPa; grassi: circa 6-8°C/100Mpa). Il fenomeno è reversibile all'atto del rilascio della pressione.

4. *Elettrostrizione*: la pressurizzazione incrementa la ionizzazione, giacché le molecole di acqua si organizzano in una struttura più compatta attorno alle cariche elettriche. Questo fenomeno determina piccole o sensibili modificazioni del pH, a seconda della natura del mezzo.

5. *Energia di compressione*: l'input energetico durante la pressurizzazione è modesto, se paragonato a quello di un processo termico, conseguentemente non si sviluppano reazioni chimiche che coinvolgano la rottura di legami covalenti. Ne consegue l'assenza di formazione di neocomposti.

Dunque, la pressurizzazione induce una maggiore conservabilità, stabilizza gli alimenti, sicuramente elimina gran parte dei microrganismi patogeni: il tutto senza effetti sui composti più sensibili all'aumento di temperatura (vitamine, principi aromatici). In certe condizioni le alte pressioni possono anche essere dirette ad attivare (e non ad inibire) alcune reazioni enzimatiche, rendendo più rapido l'intenerimento delle carni o la maturazione dei formaggi, mentre sembrano interessanti i trattamenti a stadi successivi (a livelli differenti di pressione) che possano mitigare alcuni aspetti negativi e migliorare l'espressione di stabilizzazione.

1.2.3 – Il trattamento ad alta pressione sui materiali polimerici

Come si è detto, il procedimento ad alta pressione (HPP) è un sistema di conservazione alimentare che consente di mantenere le caratteristiche sensoriali naturali e le proprietà nutritive dell'alimento con una minima perdita di qualità. Il trattamento HPP atermico esercita sui prodotti alimentari una forte pressione tesa a ridurre enormemente la quantità di microrganismi; consente anche di rendere inattivi gli enzimi con un'azione meccanica ad una temperatura relativamente bassa. L'alimento viene pressurizzato a 200-700MPa per alcuni minuti. Gli alimenti trattati con questa tecnica mantengono il tessuto originario nonché le qualità nutrizionali e sensoriali, con un allungamento della shelf-life.

Siccome la pressione idrostatica è uniformemente distribuita sul prodotto, l'alimento viene trattato in modo uniforme. Il pre-confezionamento con il trattamento HPP risulta più semplice del trattamento su ampi quantitativi, perché non richiede una costosa installazione di una macchina confezionatrice asettica per imballare gli alimenti trattati ad HP. Per esercitare una forte pressione ai prodotti alimentari pre-confezionati, la confezione selezionata viene posizionata in un contenitore idrostatico d'acciaio contenente un liquido mediamente a base di acqua.

La selezione del corretto materiale per il confezionamento è molto importante, dal momento che il materiale usato per il packaging ha bisogno di essere flessibile abbastanza da resistere alla forza esercitata della compressione,

mantenendo l'integrità fisica [4], e deve essere in grado di prevenire una successiva ricontaminazione dell'alimento. Per queste ragioni, i barattoli di metallo e le bottiglie di vetro non sono molto adatti per il trattamento HPP perché rispettivamente, si deformano irreversibilmente o tendono a rompersi, sotto la spinta della forza esercitata durante il trattamento HPP. Un aspetto critico degli imballaggi è rappresentato dall'interfaccia di chiusura, dal momento che una fuoriuscita può avvenire attraverso le chiusure trattate così come attraverso le aree sigillate col calore. Teoricamente, il trattamento HPP non dovrebbe ledere a nessun livello l'integrità dell'imballaggio.

La maggior parte degli alimenti si comporta come l'acqua: esposti, cioè ad una fortissima pressione, si verifica una limitata riduzione del volume, aspetto importante dalla prospettiva dell'imballaggio. Lo studio di come l'intero imballaggio reversibile reagisce alla compressione è cruciale per il successo del trattamento. La pressione causa al prodotto una compressione tridimensionale superiore al 12%, dipendente dal livello della pressione. Il packaging deve essere in grado di "accogliere" questa riduzione e di conseguenza ricoprire il proprio volume iniziale dopo il rilascio dalla pressione. Le forze della compressione agiscono anche sugli imballaggi polimerici, riducendone il volume; perciò i materiali usati per il packaging devono dimostrare una sufficiente flessibilità e resilienza per compensare la riduzione volumetrica al fine di prevenire deformazioni irreversibili. Le strutture plastiche flessibili che si rivelino resilienti e che dimostrino un comportamento elastico sono i migliori contenitori per il processo di confezionamento alimentare

HPP. Quando i materiali plastici sono combinati con metalli o con strati inorganici, allora si creano le condizioni capaci di generare strutture inaffidabili.

Si verifica un riscaldamento adiabatico dell'alimento che causa un rialzo della temperatura di quasi 2-3°C per ogni 100 MPa di compressione degli alimenti a base di acqua (dipende dalla composizione degli alimenti). Il monitoraggio della temperatura è perciò molto importante per differenziare gli effetti della pressione da quelli dovuti al riscaldamento. La crescita della temperatura può anche ledere l'imballaggio, che deve resistere all'effetto combinato della temperatura in aumento e del calo del volume nel corso del trattamento HP. Perché un polimero resti efficace, gli stress termo – meccanici generati durante il trattamento HPP dovrebbero rimanere nella misura entro la quale il polimero stesso resti reversibile, consentendo così al polimero di riprendere lo spazio. I cambiamenti indotti ai materiali dalla pressione e dalla temperatura non dovrebbero ledere le proprietà di barriera difensiva [5], quelle meccaniche e di trasferimento di massa (sorption e migrazione) dell'imballaggio in maniera significativa.

1.2.4 – Effetti collaterali del trattamento ad alta pressione

I principali effetti sono collegati ai seguenti aspetti:

- permeazione della pressione causa di una comunicazione di fluido attraverso il materiale da imballaggio all'interno del confezionamento;

- migrazione di sostanze dal materiale di imballaggio verso il prodotto confezionato per effetto dell'alta pressione;
- scalping di sostanze provenienti dall'alimento verso il materiale usato per l'imballaggio per effetto dell'elevata pressione;
- effetto del trattamento ad alta pressione sulle proprietà di barriera dell'imballaggio dopo il trattamento;
- effetto del trattamento ad alta pressione sulle proprietà meccaniche.

1.2.5 – Riflessioni generali sul trattamento ad alta pressione

Complessivamente le strutture di materiale plastico risultano particolarmente resilienti, stabili come barriere, nella sorption e nei comportamenti meccanici e dimostrano che le strutture flessibili per il packaging alimentare rispondono bene alle forze meccaniche generate durante il trattamento HPP[6-7-8-9]. Esiste una compatibilità del trattamento HPP con le più comuni strutture plastiche per il packaging. Comunque si suggerisce che tutti gli imballaggi per la conservazione ad alta pressione devono essere in grado di ospitare una possibile compressione del 15% del volume conservando una permeabilità all'ossigeno estremamente bassa e debbono essere capaci di insaccare e sigillare senza lasciare volume in cima al contenitore. Ogni volume in cima al contenitore dovrà essere azzerato, perché potenzialmente in grado di causare deformazioni, rotture, delaminazioni della struttura flessibile dell'imballaggio.

1.3 – Finalità della parte III dello studio di tesi

In definitiva i trattamenti di pastorizzazione possono causare variazioni della struttura e della morfologia dei materiali polimerici determinando [10]:

- ❖ una variazione delle caratteristiche meccaniche del materiale, con eventuale perdita dell'integrità dell'imballaggio.
- ❖ Una variazione delle proprietà a barriera del materiale, che influenzano la shelf life.

In questa parte del lavoro di tesi è stata valutata pertanto la possibilità di sottoporre il multistrato PCL/TPZm+PCL (60/40)/PCL realizzato a processi di pastorizzazione. In particolare è stato valutato l'effetto del trattamento ad alta pressione sulle caratteristiche meccaniche del multistrato confezionato con diverse tipologie di alimento.

1.4 – Materiali e metodi

Il multistrato PCL/TPZm+PCL (60/40)/PCL, realizzato come descritto nella parte II capitolo 1, è stato utilizzato per preparare sacchetti 10cmx10cm con una saldatrice a caldo.

Dopo averli preparati, i sacchetti sono stati riempiti con 60g di differenti alimenti (carote a rondelle, succo di carote, purè di carote e acqua).

In particolare, sono stati preparati e testati due sacchetti per ogni tipo di alimento.

Le condizioni dell'HPP sono state fissate a 700MPa, 30-40°C e 10 min.

In Figura 1.1 sono riportate due immagini dell'impianto utilizzato per il trattamento di pastorizzazione.



Figura 1.1: Immagini dell'impianto di HPP.

Dopo il trattamento i sacchetti sono stati aperti, svuotati e puliti per poi essere testati.

Un dinamometro Instron, modello 4204 (USA) è stato utilizzato per misurare le proprietà meccaniche dei campioni ottenuti dai diversi sacchetti prima e dopo il trattamento in accordo al metodo standard ASTM D1708-02. Le curve di sforzo-deformazione, il modulo di Young, lo sforzo e la deformazione a rottura sono stati registrati impostando una velocità della traversa mobile pari a 10mm/min. Cinque campioni per ogni sacchetto sono stati testati e i risultati sono stati ottenuti come media dei valori ottenuti per ciascun campione.

Sul campione trattato contenente succo di carote sono state realizzate anche prove di permeabilità all'ossigeno e di assorbimento al vapor d'acqua. In particolare le prove di permeabilità all'ossigeno sono state realizzate a 30°C e per un valore della pressione che va da 0.1 a 1 atm., mentre le prove di assorbimento all'acqua sono state realizzate sempre a 30°C ma al variare del coefficiente di attività dell'acqua a_w da 0 a 0.8.

1.5 – Risultati e discussione

Nelle Figure 1.2, 1.3, 1.4 e 1.5 sono riportate le immagini dei sacchetti contenenti carote a rondelle, succo di carote, purè di carote ed acqua prima e dopo il trattamento ad alta pressione.

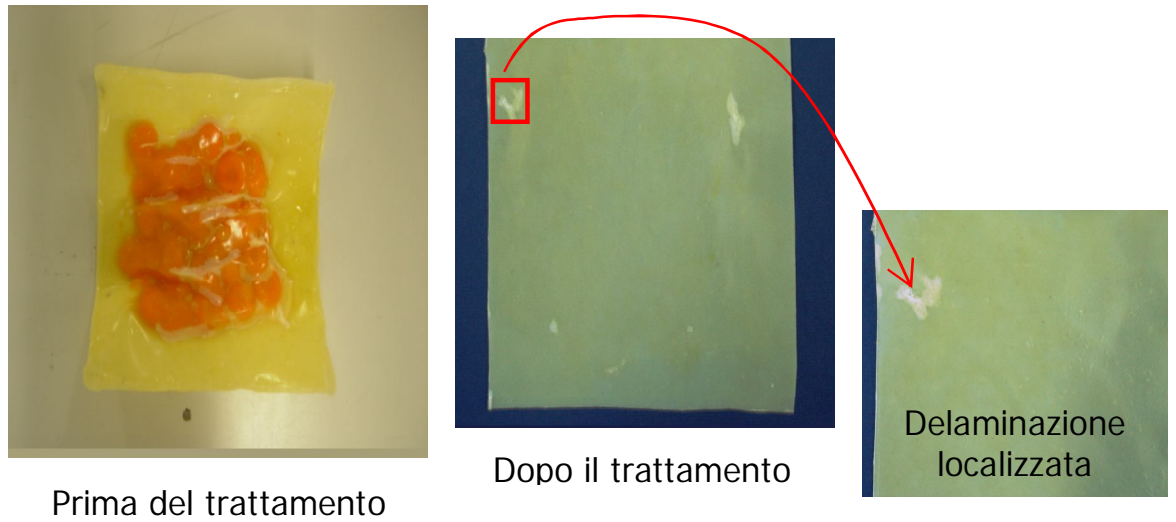


Figura 1.2: Sacchetto a base di zeina contenente carote a rondelle prima e dopo l'HPP.

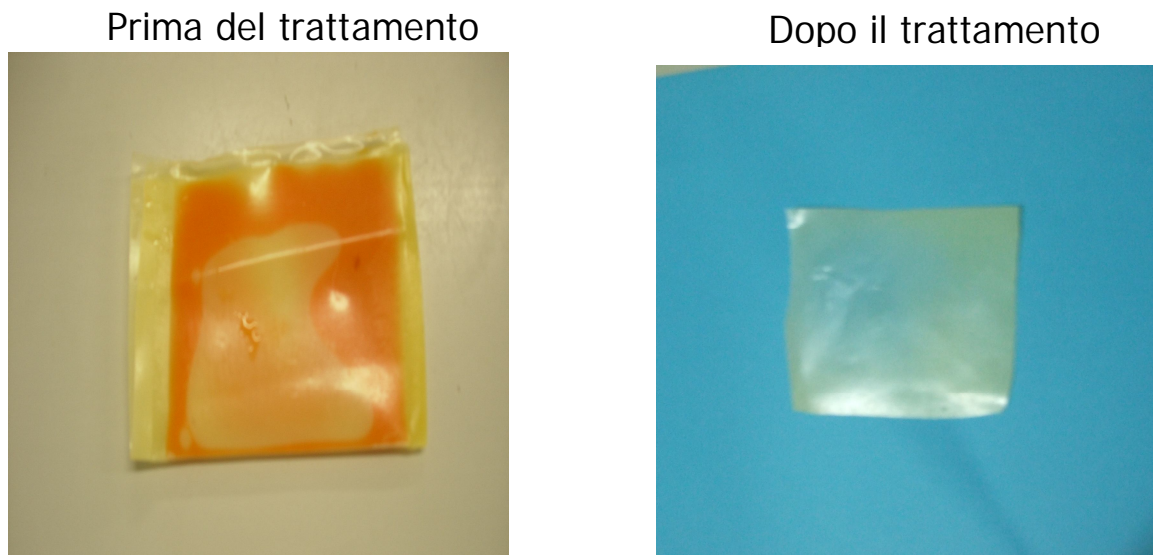


Figura 1.3: Sacchetto a base di zeina contenente succo di carote prima e dopo l'HPP.

Prima del trattamento



Dopo il trattamento

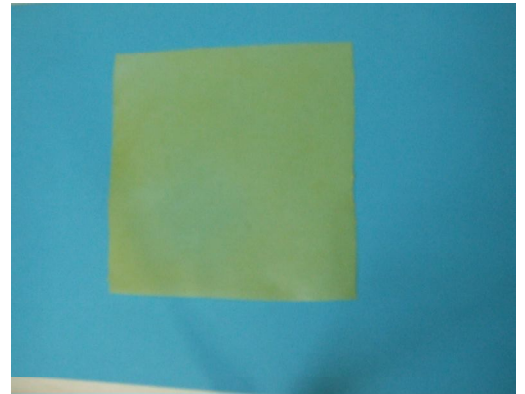


Figura 1.4: Sacchetto a base di zeina contenente purè di carote prima e dopo l'HPP.

Prima del trattamento



Dopo il trattamento

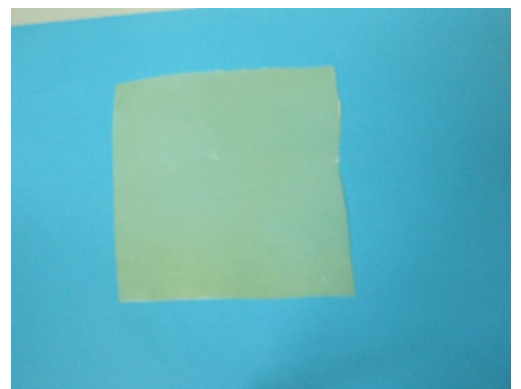


Figura 1.5: Sacchetto a base di zeina contenente acqua prima e dopo l'HPP.

Da una semplice analisi visiva è emerso che, mentre i sacchetti contenenti succo e purè di carote e acqua non presentavano dopo il trattamento nessun tipo di deformazione permanente o di delaminazione, nei sacchetti contenenti carote a rondelle, delaminazioni localizzate sono state evidenziate come mostrato in Figura 1.2.

È evidente in questo caso che l'integrità dell'imballaggio è stato compromesso durante l'HPP. Per questa ragione, le proprietà meccaniche del multistrato contenete carote a rondelle non sono state valutate.

Importante è sottolineare come il multistrato utilizzato non ha indotto perdita di colore in nessuno degli alimenti confezionati; questo sta a significare che non solo non si sono verificati fenomeni di trasmissione di sostanze dall'imballaggio all'alimento ma anche che il multistrato risulta essere una valida barriera nei confronti dell'ossigeno e dell'acqua.

In Figura 1.6 sono riportate le curve sforzo-deformazione dei multistrati non trattati e trattati contenenti i differenti alimenti.

In Tabella 1.1 sono riportate invece i valori del modulo di Young e dello sforzo e della deformazione a rottura dei suddetti materiali.

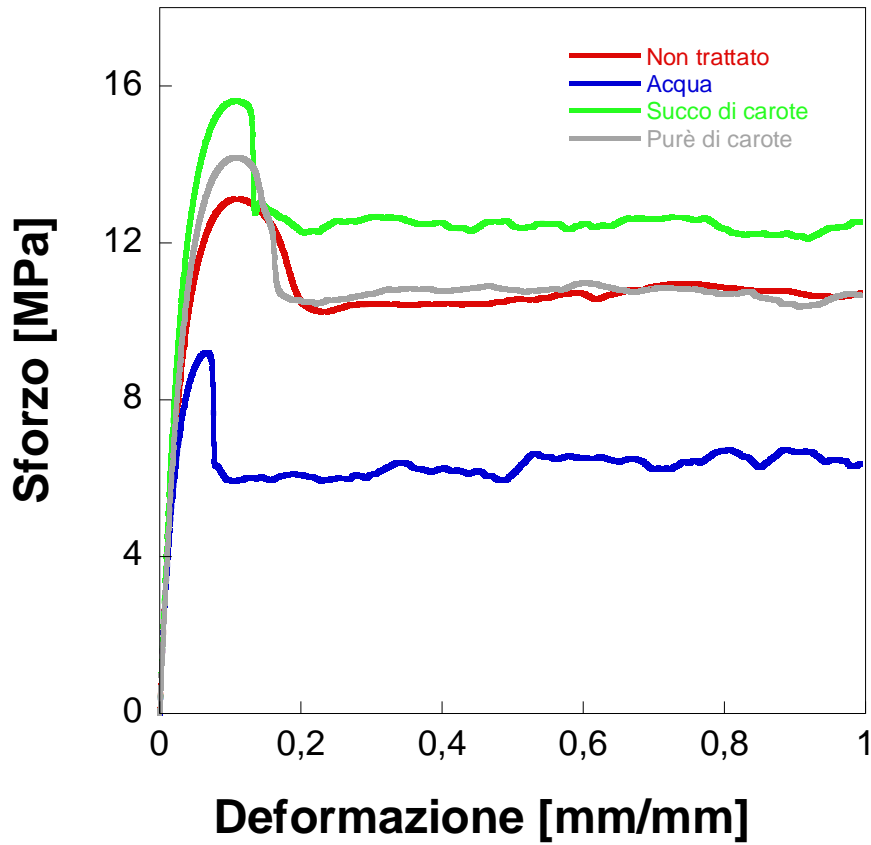


Figura 1.6: Curve sforzo-deformazione per i multistrati trattati e non.

Alimento	Modulo di Youngh [MPa]	Sforzo a rottura [MPa]	Deformazione a rottura [mm/mm]
Non trattato	356±16.37	9.3±1.3	0.99±0.006
Acqua	381±9.2	7.70±1.85	0.98±0.003
Succo di carote	403±5.8	12±2.4	0.98±0.006
Purè di carote	391±4.3	10.72±1.2	1±0.005

Tabella 1.1: Risultati delle prove di trazione sui campioni trattati e non.

Questa tabella mostra che non ci sono differenze significative tra il campione di controllo (campione non trattato) e i campioni trattati e contenenti succo e purè di carote. Cambiamenti più significativi delle proprietà meccaniche sono stati osservati solo per il multistrato trattato contenente acqua. In particolare i campioni ricavati dai sacchetti contenenti acqua risultano meno rigidi dopo il trattamento probabilmente a causa dell'effetto plasticizzante dell'acqua per questo tipo di imballaggio.

In Figura 1.7 è riportato l'andamento della permeabilità all'ossigeno del campione trattato contenete succo di carote al variare della pressione. I valori ottenuti insieme ai valori di diffusività sono raccolti in Tabella 1.2.

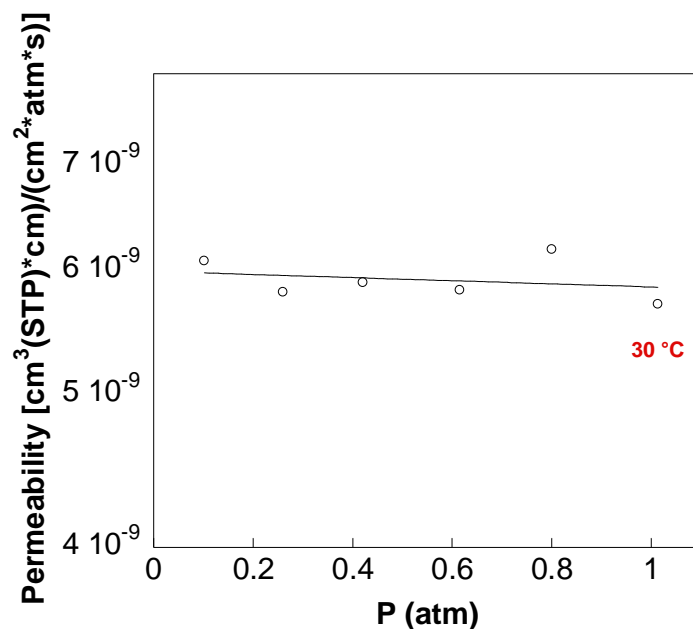


Figura 1.7: Andamento della permeabilità all'ossigeno al variare della pressione per il multistrato PCL/ TPZm+PCL (60/40)/PCL trattato a 700 MPa contenete succo di carote.

P (atm)	Diffusività (cm²/s)	Permeabilità [(cm³(STP) cm)/(cm² s atm)]
0.1	4.9773e-07	6.0844e-09
0.3	2.1960e-07	5.8154e-09
0.4	1.7588e-07	5.8971e-09
0.6	1.7106e-07	5.8289e-09
0.8	1.5619e-07	6.1878e-09
1	1.5671e-07	5.7105e-09

Tabella 1.2: Diffusività e permeabilità del multistrato PCL/ TPZm+PCL (60/40)/PCL al variare della pressione.

Aumentando la pressione è possibile osservare una modesta riduzione sia della diffusività che della permeabilità. Se confrontiamo poi il valore di permeabilità all'ossigeno del campione non trattato con il valore della permeabilità del campione trattato a 30°C e 1 atm si osserva un leggera riduzione di tale valore con il trattamento ad alta pressione. Alla temperatura di 30 ° C e a pressione di 1 atm, il campione non trattato presenta infatti una permeabilità di 6.0707e-09 (cm³(STP) cm)/(cm² s atm) mentre il campione trattato nelle stesse condizioni di pressione e temperatura una permeabilità di 5.7105e-09 (cm³(STP) cm)/(cm² s atm).

In figura 1.8 sono riportate invece le curve di assorbimento del multistrato trattato e non a 30°C e al variare del coefficiente di attività dell'acqua. Anche in questo caso con il trattamento le proprietà a barriera subiscono un leggero miglioramento, difatti per tutti i valori del coefficiente di

attività dell'acqua l'assorbimento del campione trattato è minore di quello non trattato.

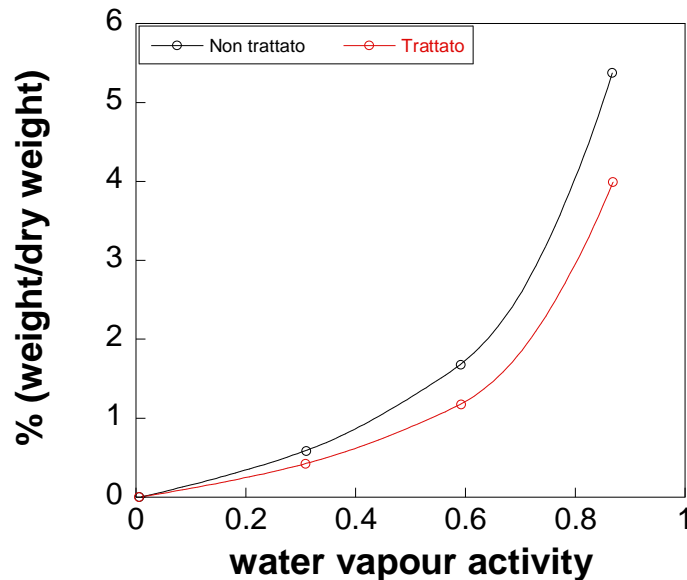


Figura 1.8: Curve di assorbimento al vapor d'acqua per il multistrato PCL/TPZm+PCL (60/40)/PCL trattato e non trattato.

1.6 – Conclusioni

In conclusione possiamo affermare che il multistrato a base di zeina termoplastica prodotto si presta bene, sia da un punto di vista dell'integrità del confezionamento che per le proprietà a barriera, per essere sottoposto a trattamenti di pastorizzazione ad alta pressione se in esso sono contenuti alimenti liquidi come il succo di carote o semisolidi come il purè di carote.

Bibliografia – Parte III

- [1] Denys, S. and Hendrickx, ME, 1999, "**Measurement of the thermal conductivity of food at high pressure**". J Food Sci 64:709–713.
- [2] Prestamo, G. and Arroyo, G., 1998, "**High hydrostatic pressure effects on vegetable structure**". J Food Sci 63:878–881.
- [3] Knor, D., 1996 "**Advantages, opportunities and challenges of high hydrostatic pressure application to food systems**", in *High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Ed by Hayashi R and Balny C. Elsevier Science, London, pp 279–287.
- [4] Barnes, P.J., 1992, "**Effects of high pressure sterilization on packaging**", in *Food, Cosmetics and Drug Packaging*. Elsevier Science, London, pp 1–3.
- [5] Caner, C., Hernandez, R.J. and Pascall, M.A., 2000, "**Effect of high pressure processing on selected high barrier laminated films used for food packaging**". Packaging Technol Sci 13:183–195.
- [6] Lambert, Y., Demazeau, G., Largeteau, S., Bouvier, J.M., Laborde-Croubit, S. and Cabannes, M., 2000, "**Packaging for high pressure treatments in the food industry**". Packaging Technol Sci 13:63–71.
- [7] Schauwecher, A., Balasubramaniam, V.M., Sadler, G., Pascall, M.A. and Adhikari, C., "**Influence of high pressure on selected polymeric materials and on the migration of a pressure transmitting fluid**". Packaging Technol Sci in press.
- [8] Masuda, M., Saito, Y., Iwanami, T., and Hirai, Y., 1992 "**Effect of hydrostatic pressure on packaging materials for food**", in *High Pressure and Biotechnology*, Ed by Balny C, Hayashi R, Heremans K and Masson P. Inserm/John Libbey Eurotex, Montrouge, pp 545–548.
- [9] Ochiai, S. and Nakagawas, Y., 1992, "**Packaging for high pressure food processing**", in *High Pressure and Biotechnology*, Ed by Balny C, Hayashi R, Heremans K and Masson P. Inserm/John Libbey Eurotex, Montrouge, pp 515–519.
- [10] Mertens, B., 1993, "**Packaging aspects of high-pressure food processing technology**". Packag. Techno. Sci. 6: 31-36.

Lista delle Tabelle

Parte I – Innovazione nei materiali

2.1 Distribuzione tipica dei componenti principali nel mais	Pag.8
2.2 Distribuzione delle proteine principali nel mais	Pag.9
2.3 Composizione in amminoacidi della zeina (il gruppo –R si riferisce alla struttura tipica di un L-amminoacido)	Pag.10
2.4 Plasticizzanti per la zeina	Pag.19
2.5 Solventi primari per la zeina	Pag.22
2.6 Solventi secondari per la zeina	Pag.24
2.7 Solventi ternari per la zeina	Pag.25
2.8 Distribuzione dei componenti principali nei coprodotti di processo	Pag.27
2.9 Proprietà della zeina	Pag.32
3.1 Amminoacidi comuni: strutture e simboli	Pag.35
3.2 Requisiti fisico-chimici per alcuni prodotti tecnici	Pag.46
4.1 Proprietà meccaniche di film di zeina per casting	Pag.66
4.2 Valori di WVP di film a base di proteine confrontati con i film di LDPE	Pag.68
4.3 Valori di OP di film a base di proteine confrontati con film di LDPE	Pag.69

4.4 Proprietà meccaniche di film di zeina ottenuti per estrusione di resina in pellets	Pag.70
4.5 Valori di WVP di film di zeina estrusi e confrontati con quelli ottenuti per casting	Pag.71
6.1 Tg per i differenti lotti di zeina in polvere e TPZm	Pag.91
6.2 <i>d</i> -spacings e rapporto A_2/A_1 per i lotti A, B, C e D in polvere e TPZm	Pag.94
6.3 Aree sottese ai picchi relativi alle α -eliche e ai β -foglietti per i diversi lotti di zeina in polvere e termoplastica	Pag.97
6.4 Parametri di strain hardening per i materiali analizzati a differenti strain rate	Pag.102
6.5 Parametri di processo, spessore e commento sintetico dei film di zeina prodotti con i lotti A, B, C e D.	Pag.106
6.6 Proprietà meccaniche dei film prodotti e di quelli realizzati in letteratura	Pag.108

Parte II – Nuovi “sistemi da imballaggio”

1.1 Condizioni di pressatura per i singoli strati	Pag.125
1.2 Condizioni di pressatura per i multistrati	Pag.125
1.3 Effetto della percentuale di PCL nella TPZm sul valore di peel strength	Pag.128

1.4 Proprietà meccaniche del multistrato	Pag.129
1.5 Diffusività e permeabilità del PCL al variare della temperatura	Pag.134
1.6 Diffusività e permeabilità della blend TPZm+PCL (60/40) al variare della temperatura	Pag.135
1.7 Diffusività e permeabilità del multistrato PCL/ TPZm+PCL (60/40)/PCL al variare della temperatura	Pag.135
2.1 Possibili funzioni dei film attivi	Pag.148

Parte III – Nuove tecnologie di sterilizzazione/pastorizzazione

1.1 Risultati delle prove di trazione sui campioni trattati e non	Pag.177
1.2 Diffusività e permeabilità del multistrato PCL/ TPZm+PCL (60/40)/PCL al variare della pressione	Pag.179

Lista delle figure

Parte I – Innovazione nei materiali

1.1 Presentazione schematica dei biopolimeri a seconda dell'origine	Pag.3
2.1 Piantagione di mais	Pag.6
2.2 Schemi dei processi Wet Milling e Dry Grind Ethanol	Pag.7
2.3 Sezione di un chicco di mais e localizzazione dei composti principali.	Pag.8
2.4 Un L-amminoacido	Pag.10
2.5 Struttura della zeina. Le zone grigie rappresentano le α -eliche e le estremità curve i ponti idrogeno delle glutammine	Pag.13
2.6 Temperatura di transizione vetrosa in funzione del contenuto di umidità da Dejing Fu et al	Pag.15
2.7 Diagramma ternario zeina-acqua-etanolo a 22°C	Pag.23
2.8 CPC process	Pag.29
2.9 Nutrilite process	Pag.29
3.1 α -amminoacido	Pag.33
3.2 Forma zwitterionica di un α -amminoacido.	Pag.34
3.3 Reazione di conversione della cisteina in cistina	Pag.37
3.4 Reazione di condensazione di due amminoacidi	Pag.38
3.5 Unità ripetitiva di un polipeptide	Pag.38

3.6 Frammento di una proteina	Pag.39
3.7 Geometria del legame peptidico	Pag.39
3.8 Legame -NC-	Pag.40
3.9 Unità ripetitiva di una proteina	Pag.41
3.10 Ipotetica struttura piana di un polipeptide	Pag.41
3.11 Struttura a pieghe di un polipeptide. I tratti colorati sono i legami idrogeno tra le catene adiacenti	Pag.42
3.12 Struttura di α -elica; i legami idrogeno sono indicati con le linee tratteggiate	Pag.43
3.13 Denaturazione proteica	Pag.43
3.14 Variazione delle temperature T_d e T_g in funzione del contenuto d'acqua.	Pag.48
4.1 Piani di scorrimento a) nel bulk, b) all'interfaccia polimero-plasticizzante	Pag.57
4.2 Meccanismo d'azione del plasticizzante	Pag.58
4.3 Rappresentazione schematica delle due tecnologie usate per produrre film a base di proteine vegetali	Pag.62
4.4 Formazione di film attraverso casting	Pag.63
5.1 Filmatura in bolla	Pag.84
6.1 Evoluzione della torque (1a) e della temperatura del melt (1b) durante il processo di miscelazione dei differenti lotti di zeina e PEG 400 (25%wt di plasticizzante, 50rpm, 70°C, 10 min.)	Pag.89

6.2 Curve TGA per il PEG 400 e per la zeina in polvere e TPZm del lotto A.	Pag.90
6.3 Diffrattogrammi della zeina in polvere a) e TPZm b) del lotto B	Pag.93
6.4 Spettri deconvoluti della polvere a) e della TPZm b) del lotto A.	Pag.95
6.5 SDS-Page dei lotti di zeina in polvere A, B, C e D	Pag.98
6.6 Comportamento elongazionale a differenti strain rate: a) lotto A, b) lotto B, c) lotto C e d) lotto D	Pag.99
6.7 Comportamento elongazionale a differenti strain rate: a) lotto A, b) lotto B, c) lotto C e d) lotto D (continuo)	Pag.100
6.8 Comportamento elongazionale dei vari lotti di zeina a strain rate costante di 0.1	Pag.101
6.9 Andamento dell'haul off force in funzione del draw ratio per i diversi lotti di zeina.	Pag.104
6.10 Fotografie dell'impianto di filmatura in bolla da laboratorio; a) estrusore monovite a sinistra e testa anulare con sistema di soffiaggio e raccolta; b) particolare della testa e della bolla; c) particolare del sistema di calibrazione e raccolta della bolla	Pag.105

6.11 Prova di trazione, calcolo del modulo elastico e delle caratteristiche ultime del materiale.	Pag.108
---	---------

Parte II – Nuovi “sistemi da imballaggio”

1.1 Multistrato a base di TPZ	Pag.120
1.2 Formula chimica del PCL	Pag.121
1.3 Schema di sintesi del PCL	Pag.122
1.4 Schema di preparazione del bistrato TPZm/PCL	Pag.124
1.5 Test di peeling	Pag.126
1.6 Grafico tipico di un test di peeling	Pag.127
1.7 Schema dell'apparecchiatura utilizzata per effettuare prove di permeabilità all'ossigeno	Pag.132
1.8 Particolare della cella del permeabilmetro	Pag.132
1.9 Curva di permeabilità	Pag.133
1.10 Curve di permeabilità all'ossigeno per il PCL, la blend TPZm+PCL (60/40) e il multistrato PCL/TPZm+PCL (60/40)/PCL	Pag.134
1.11 Q5000 SA della TA Instruments	Pag.136
1.12 Schema della camera d'umidità della Q5000 SA (fonte TA Instruments)	Pag.138
1.13 Curve di assorbimento al vapor d'acqua per la TPZm, il PCL, la blend TPZm+PCL (60/40) e il multistrato PCL/TPZm+PCL (60/40)/PCL	Pag.139
1.14 L'angolo di contatto θ di un liquido su una superficie.	Pag.141

1.15 Correlazione angolo di contatto e bagnabilità	Pag.142
1.16 Misure di angolo di contatto del A) PCL, B) TPZm, C) TPZm+PCL (60/40), D) PCL/TPZm+PCL (60/40)/PCL	Pag.143
2.1 Interazione imballaggio (package)-alimento	Pag.146
2.2 Interazione ambiente-package-alimento	Pag.147
2.3 Formula chimica del PCL	Pag.150
2.4 Il lisozima	Pag.141
2.5 Retta di calibrazione	Pag.154
2.6 Cinetica di rilascio del lisozima per il film TPZm+PCL (60/40) +3%lisozima	Pag.155

Parte III – Nuove tecnologie di sterilizzazione/pastorizzazione

1.1 Immagini dell'impianto di HPP	Pag.172
1.2 Sacchetto a base di zeina contenente carote a rondelle prima e dopo l'HPP	Pag.174
1.3 Sacchetto a base di zeina contenente succo di carote prima e dopo l'HPP	Pag.174
1.4 Sacchetto a base di zeina contenente pure di carote prima e dopo l'HPP	Pag.175

- 1.5** Sacchetto a base di zeina contenente acqua
prima e dopo l'HPP Pag.175
- 1.6** Curve sforzo-deformazione per i
multistrati trattati e non Pag.177
- 1.7:** Andamento della permeabilità
all'ossigeno al variare della pressione per il
multistrato PCL/ TPZm+PCL (60/40)/PCL
trattato a 700 MPa contenete succo di carote Pag.178
- 1.8:** Curve di assorbimento al vapor d'acqua
per il multistrato PCL/TPZm+PCL (60/40)/PCL
trattato e non trattato Pag.180

**Altri possibili
impieghi dei
polimeri
naturali...**

Altri possibili impieghi dei polimeri naturali...

Durante i tre anni di dottorato si è valutata anche la possibilità di utilizzare i polimeri naturali in campo biomedico ed in particolare nel campo dell'ingegneria tissutale. A tal proposito sono state prese in esame due proteine una di origine vegetale, la zeina e una di origine animale la gelatina per la realizzazione di scaffold da utilizzare per la riparazione di difetti ossei in umani.

Da questo lavoro ne sono scaturite tre pubblicazioni:

- A. Salerno, **M. Oliviero**, E. Di Maio, S. Iannace **“Thermoplastic Foams from Zein and Gelatin”**, INTERNATIONAL POLYMER PROCESSING (2007), vol.12, pp. 480-488.
- A. Salerno, **M. Oliviero**, E. Di Maio, S. Iannace, P. A. Netti **“Design and Preparation of m-Bimodal Porous Scaffolds for Tissue Engineering”**, JOURNAL OF APPLIED POLYMER SCIENCE (2007) vol.106, pp. 3335-3342.
- A. Salerno, M. Oliviero, E. Di Maio, P. A. Netti, S. Iannace, C. Rofani, A. Colosimo, V. Guida, B. Dalla piccola, P. Palma, E. Procaccino, A. C. Berardi, F. Velardi **“Design of Novel Multi-phase Biomaterials to Promote the Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Derived Rabbit Mesenchymal Stem Cells”**, Biomacromolecules submitted.

Design and Preparation of μ -Bimodal Porous Scaffold for Tissue Engineering

A. Salerno,^{1,2} M. Oliviero,³ E. Di Maio,¹ S. Iannace,³ P. A. Netti^{1,2}

¹Interdisciplinary Research Centre in Biomaterials (CRIB), University of Naples Federico II, P.le Tecchio 80, 80125 Naples, Italy

²Italian Institute of Technology (IIT), Via Morego 30, 16163 Genoa, Italy

³Institute for Composite and Biomedical Materials (IMCB)-CNR, P.le Tecchio 80, 80125, Napoli, Italy

Received 7 March 2007; accepted 21 May 2007

DOI 10.1002/app.26881

Published online 17 August 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

ABSTRACT: The aim of this study was to prepare poly- ϵ -caprolactone (PCL) foams, with a well-defined micrometric and bimodal open-pore dimension distribution, suitable as scaffolds for tissue engineering. The porous network pathway was designed without using toxic agents by combining gas foaming (GF) and selective polymer extraction techniques. PCL was melt-mixed with thermoplastic gelatin (TG) in concentrations ranging from 40 to 60 wt %, to achieve a cocontinuous blend morphology. The blends were subsequently gas foamed by using N₂-CO₂ mixtures, with N₂ amount ranging from 0 to 80 vol %. Foaming temperature was changed from 38 to 110°C and different pressure drop rates were used. After foaming, TG was re-

moved by soaking in H₂O. The effect of blend compositions and GF process parameters on foam morphologies was investigated. Results showed that different combinations of TG weight ratios and GF parameters allowed the modulation of macroporosity fraction, microporosity dimension, and degree of interconnection. By optimizing the process parameters it was possible to tailor the morphologies of highly interconnected PCL scaffolds for tissue engineering. © 2007 Wiley Periodicals, Inc. *J Appl Polym Sci* 106: 3335–3342, 2007

Key words: scaffold; gas foaming; polymer extraction; macroporosity; microporosity

INTRODUCTION

One of the great challenges in tissue engineering is to design biocompatible and biodegradable scaffolds that provide the necessary support for cells to proliferate and maintain their differentiated function *in vitro* and/or *in vivo*, defining the ultimate shape of the new engineered tissue.¹

Several techniques have been developed to prepare synthetic and natural polymeric scaffolds with a single scale porous network, including particulate leaching (PL),^{2,3} gas foaming (GF),^{4–6} and selective polymer extraction (PE) from cocontinuous blends.^{7,8} Unfortunately, these methods showed great limitations in terms of scaffold design and function. For instance, scaffolds prepared via PL, by removing premixed percolated porogens from the polymeric matrix, possess a well-defined porosity and pore size. However, the presence of inorganic porogen particles eventually entrapped into the matrix may damage transplanted cells and represent a big limitation of this technique.² Furthermore, PL leads to a highly interconnected porosity with a drastic reduc-

tion of mechanical properties.³ GF uses high-pressure gas processing to induce porosity formation into a polymeric matrix. The porosity and pore structure depend on the competition between gas bubble nucleation and growth and can be finely regulated by the selection of the blowing agent and processing parameters. However, this technique generally leads to scaffolds with partially closed cellular structure and nonporous external skin.⁴ The PE technique involves the selective extraction of a polymeric phase from cocontinuous blends and provides scaffolds with mechanical properties suitable for load bearing application, such as bone and cartilage repair. In this case, scaffold porosity (ranging from 40 to 60% ca.), interconnectivity, and the difficulty in completely extracting the polymeric phase are the main limitations.^{7,8}

Recently, advances in tissue engineering revealed that porosity architectures at different scales are key morphological properties of a scaffold to be used for the regeneration of complex three-dimensional tissues, such as bone and cartilage.⁹ In particular, pores with mean diameters of the order of 100 μ m (macroporosity) provide the necessary substrate for cells to adhere, grow, and proliferate. Furthermore, pores with diameters of few microns (microporosity), not accessible to cells but interconnected to the macroporosity, may represent a preferential way for fluids

Correspondence to: S. Iannace (iannace@unina.it).

and nutrients, providing the continuous supply for cell proliferation and biosynthesis and allowing the complete harvest of three-dimensional constructs.

With the aim of preparing scaffolds with a double-scale porosity (macroporosity and microporosity), thermally induced phase separation¹⁰ or solvent casting (SC)/PL¹¹ techniques have been used recently. These process technologies, however, require the use of organics solvents that can remain in the scaffold, in turn damaging transplanted cells and biological signals eventually entrapped into the matrix.

To overcome this problem, GF/salt leaching (SL)^{12,13} and PE/SL¹⁴ methods have been applied to obtain porous networks on a double scale, with macroporosity formed after the removal of salt particles and microporosity created by GF or selective PE. If compared with SC/PL, these techniques allowed an increase of the exposure of bioactive particles on the scaffold surfaces and an increase of pores interconnectivity, with the consequence of enhancing bone regeneration efficacy of osteogenic cell transplantation for the treatment of bone defects.¹³ The use of inorganic porogen and the difficulty of regulating the degree of interconnection by GF and selective PE represent to date the most important limitations for these techniques.

The aim of this study was to prepare poly- ϵ -caprolactone (PCL) scaffolds¹⁵ with bimodal-micron scale porosity (μ -bimodal) without the use of toxic solvents and/or porogens, by combining the two techniques of GF and PE. This was achieved by: (i) preparing PCL and thermoplastic gelatin (TG) (a highly water-soluble natural polymer from animal protein) cocontinuous blends, (ii) GF the blends with physical blowing agent mixtures, and (iii) extracting the TG by submerging the foamed samples in water.

The correspondence between blend composition and cocontinuous blend morphologies and the effect of blend composition, foaming temperature, blowing agent, and pressure drop rate on foaming were studied to optimize macroporosity fraction, microporosity dimension, and degree of interconnection of the final PCL scaffolds.

EXPERIMENTAL

Materials

PCL ($M_w = 65$ kDa, $T_m = 59$ – 64°C , $T_g = -60^\circ\text{C}$, and $\rho = 1.145$ g/cm³) and gelatin powder (type B, $M_w = 40$ – 50 kDa) were purchased from Sigma-Aldrich (Italy). Glycerol anhydrous with purity grade higher than 99.5% was purchased from Fluka (Italy) and used as plasticizer for the preparation of TG. N₂ and CO₂ mixtures (Air liquide, Italy) were used as physical blowing agent for GF experiments.

TABLE I
Abbreviations and Weight Compositions
of PCL/TG Blends

	PCL/TG _{60/40}	PCL/TG _{55/45}	PCL/TG _{50/50}	PCL/TG _{40/60}
PCL	60	55	50	40
TG	40	45	50	60

Blends preparation

Cocontinuous blends were prepared with PCL and thermoplasticized gelatin. Thermoplasticization is a thermomechanical process used to induce, with the aid of suitable plasticizers, the formation of a thermoplastic material out of the original hierarchical-structured natural polymers.¹⁶ TG was prepared by using an internal mixer (Rheomix[®] 600 Haake, Germany) controlled by a measuring drive unit (Haake Rheocord[®] 9000). 50 g of gelatin powder were mixed with 20 wt % of glycerol at 60°C, 60 rpm for 6 min. The TG was then extracted from the mixer and ground for further processing. Subsequently, PCL-TG blends were obtained with the same mixing equipment at 60°C, 80 rpm for 6 min. PCL-TG composition, ranging from 60 to 40 to 40–60 wt % (see Table I), were chosen in the region of the inversion point^{17,18} ($\rho_{TG} = 1.18$ g/cm³, as evaluated by gravimetric and volumetric measurement). Finally, the blends were extracted from the mixer and compressed at 70°C and 30 bar into 2 mm-thick plates by a P 300 P hot press (Collin, Germany).

Achievement of the porous structures: GF and TG extraction

Physical batch foaming was conducted in a high-pressure vessel (HiP, US) as described by Marrazzo et al.,¹⁹ adapted to provide a fine control of the basic foaming parameters: blowing mixture composition, foaming temperature (T_F), saturation pressure (P_{sat}), and pressure drop rate (PDR).^{20–22}

Samples were solubilized with the blowing mixture for 4 h at 70°C and subsequently cooled or heated to the desired foaming temperatures with a precise protocol. The pressure was then released to ambient pressure with controlled pressure drop rates (PDRs). Three GF processing variables were selected to modulate foam morphologies: N₂-CO₂ blowing mixture (0–100 to 80–20 vol %), T_F in the range 38–110°C and PDR from 70 to 700 bar/s. Foams were finally soaked at 38°C in distilled H₂O until complete TG extraction and subsequently dried to achieve the final scaffold architectures.

Morphological analysis

Scanning electron microscopy (SEM) and image analysis were used to assess foamed sample morphologies

and to determine the volume fraction of the single foamed components by means of the area fraction measurements.^{23,24} Samples were cross-sectioned, gold sputtered, and analyzed by SEM LEICA S440 at an accelerating voltage of 20 kV, at various magnifications.

Image analysis [Image J[®]] was used as a numerical tool to evaluate the effect of blend compositions and GF process parameters on the multiphase morphology of the foams. In particular, the volume fraction of the expanded TG phase (Φ), defined as (eq. (1)):

$$\Phi = \frac{\text{volume of foamed TG phase}}{\text{total volume of foamed sample}}, \quad (1)$$

was identified with the TG area fraction^{23,24} and was measured by tracing the areas of foamed PCL and TG from a 7 mm² micrograph. The image magnification (90 \times) was chosen as a compromise between phase resolution and error related to the mean phase domain dimension. Moreover, the morphology of each phase was characterized by the average size of bubbles within the expanded PCL phase (D_{PCL}) and the expanded TG phase (D_{TG}). D_{PCL} and D_{TG} were evaluated from SEM micrographs by tracing a minimum of 150 pores for each phase and correcting the software value, calculated with the hypothesis of spherical shape, with the factor $4/\pi$, according to the ASTM D 3576.

By considering that the PCL microstructure is unvaried after the TG extraction, Φ corresponds to the macroporosity volume fraction and D_{PCL} corresponds to the microporosity characteristic dimension of the final PCL scaffolds.

RESULTS AND DISCUSSION

The architecture of the porous structure in our system strongly depends on several factors, related to the materials and the processes involved. In particular, the composition of the blend (PCL/TG), the kind of process (blending and foaming), and the composition of the blowing agent (N₂/CO₂) are the parameters that affect the final morphology.²⁵ Moreover, the analysis is further complicated since all of these parameters are mutually correlated and interdependent. For instance, blend composition is one of the most important parameters in defining cocontinuous morphologies and, hence, macroporosity of the final scaffolds. However, this parameter also affects PCL foaming and therefore scaffold microporosity. To make our analysis simpler, this study will be mostly devoted to the understanding of the GF process, once the effective cocontinuity and characteristic dimensions of the phases have been verified.

Cocontinuous blends characterization

The achievement of heterogeneous blends was confirmed by dynamic mechanical thermal analysis, which showed the presence of the two T_g 's of the single components (at -60°C for PCL and 50°C for TG, consistently with DSC results²⁶). Furthermore, the cocontinuous morphology patterns of the blends were verified by electron microscopy and gravimetric measurements after TG extraction. These results (not shown) confirmed the complete removal of the TG for all the PCL/TG blends.

Gas foaming of cocontinuous blends

The effect of blend composition and GF process parameters (T_F , blowing mixture composition, and PDR) on Φ , D_{PCL} , and D_{TG} in PCL/TG foamed blends was investigated, with the aim of modulating the volume fractions of the two phases and achieving open-celled PCL foams. As a co-effect, TG phase will also foam, but its porous structure is of minor importance since it will be subsequently removed.

Effect of blend composition on foam microstructures

SEM micrographs of the foams prepared from all the blends (see Table I) by using a 80–20 vol % N₂-CO₂ mixture as the blowing agent, at $T_F = 43^\circ\text{C}$, $P_{\text{sat}} = 180$ bar, and PDR = 700 bar/s, are shown in Figure 1. The PCL/TG_{60/40} and PCL/TG_{40/60} systems [Fig. 1(a,d)] showed a morphology characterized by two foamed phases, while the PCL/TG_{55/45} and PCL/TG_{50/50} [Fig. 1(b,c)] systems showed a negligible expansion of the TG phase. The porosities of the two phases are rather different, with expanded TG phase characterized by smaller pores with respect to expanded PCL phase. Figure 2 reports the effect of TG concentration on Φ , D_{PCL} , and D_{TG} . As expected, Φ increases (from 0.2 to 0.65 ca.) with the increase of TG content in the original blend composition. In particular, at the lower TG concentrations (from 40 to 50 wt %), Φ was less than nominal TG concentration, showing a more pronounced expansion of the PCL phase. At the highest TG concentration (60 wt %), conversely, $\Phi = 0.65$ demonstrated an increased expansion of the TG phase. D_{PCL} decreases progressively from 50 μm for the system PCL/TG_{60/40} to 30 μm for the system PCL/TG_{50/50} and increases with further increase of TG (50 μm for PCL/TG_{40/60}). When expanded (systems PCL/TG_{60/40} and PCL/TG_{40/60}), the TG phase showed a foam morphology with D_{TG} between 10 and 20 μm . Taking into account these results, we selected the PCL/TG_{60/40} system [Fig. 1(a)] for further GF investigations.

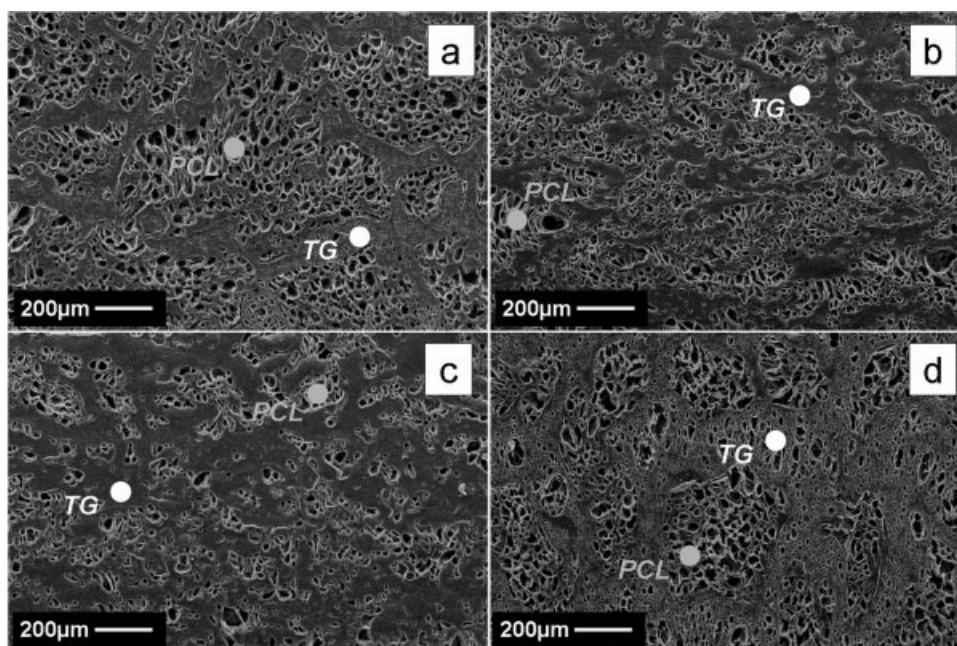


Figure 1 SEM micrographs of PCL/TG_{60/40} (a), PCL/TG_{55/45} (b), PCL/TG_{50/50} (c), and PCL/TG_{40/60} (d) blends foamed with 80–20 vol % N₂-CO₂ blowing mixture at $T_F = 43^\circ\text{C}$, $P_{\text{sat}} = 180$ bar, and PDR = 700 bar/s.

Effect of foaming temperature on foam microstructures

Figure 3 shows SEM picture of PCL/TG_{60/40} foam morphologies, prepared in the T_F range of 38–110°C, using a 80–20 vol % N₂-CO₂ mixture, at $P_{\text{sat}} = 180$ bar and PDR = 700 bar/s. Figure 3(a) shows that, at 38°C, TG did not foam at all. This effect is related to the glass transition temperature of TG ($T_g = 50^\circ\text{C}$, see earlier section), which could be eventually lowered by the presence of blowing agent (plasticizing effect). In fact, at temperatures below the T_g of the TG/blowing agent solution, foaming is hindered by the very high rigidity of the glassy polymer, while at temperatures higher than or equal to 42°C, TG was able to expand, giving fine-celled morphologies. Regarding the PCL phase, the porous structures change drastically whether the T_F is lower or higher than the PCL melting temperature (T_m). In fact, at T_F higher than 60°C, PCL do not crystallize and the foamed structure collapsed. The resulting morphologies of the PCL/TG system are then characterized by a foamed TG phase surrounded by a collapsed, dense PCL phase [see Fig. 3(d)]. These effects are also described by the Φ , D_{PCL} , and D_{TG} versus T_F curves, reported in Figure 4. When $T_F < T_m$, Φ decreases with the increase of T_F up to 42°C, for the improved tendency of PCL to foam [Fig. 3(a,b)], and then increases, as a result of the increased tendency of PCL to collapse [Fig. 3(c)]. Finally, when $T_F > T_m$, Φ is almost constant and equals to 0.33. As already observed in the previous section, PCL foams give coarser porous structures with respect to TG. At

$T_F > T_m$, furthermore, D_{PCL} increased of almost one order of magnitude for the extensive bubble coalescence. The effect of the other processing parameters on foam microstructures was then studied by selecting T_F in the range 42–45°C.

Effect of blowing mixture composition on foam microstructures

The effect of the blowing agent composition on PCL/TG_{60/40} was studied in the range 0–100 to 80–

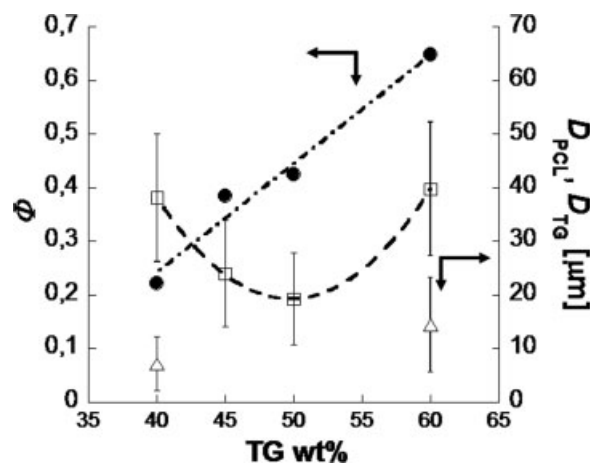


Figure 2 Effect of blend compositions on Φ (●), D_{PCL} (□), and D_{TG} (△) for samples prepared with 80–20 vol % N₂-CO₂ blowing mixture, $T_F = 43^\circ\text{C}$, $P_{\text{sat}} = 180$ bar, and PDR = 700 bar/s. Black symbols refer to the left axis and closed symbols refer to the right axis.

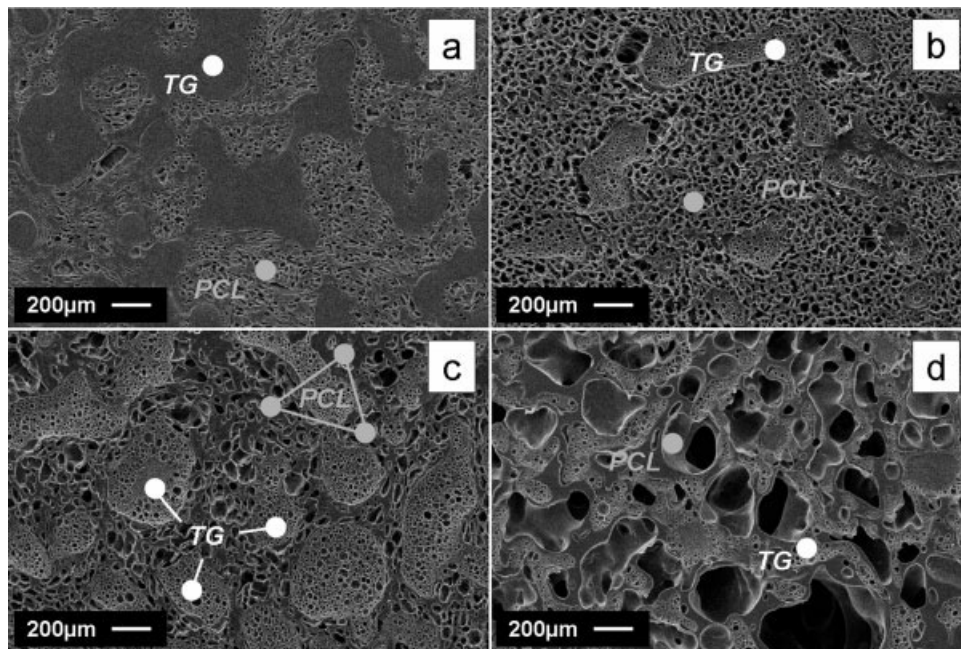


Figure 3 SEM micrographs of PCL/TG_{60/40} blend foamed with 80–20 vol % N₂-CO₂ blowing mixture at different T_F : 38°C (a), 44°C (b), 50°C (c), and 70°C (d).

20 vol % N₂-CO₂, at $T_F = 43^\circ\text{C}$. P_{sat} changed in the range 100 (for the 0–100 mixture) to 180 bar (80–20) and PDR changed accordingly, from 500 to 700 bar/s, respectively. SEM micrographs of selected foams are shown in Figure 5, while Φ , D_{PCL} , and D_{TG} curves are reported in Figure 6. Results show that the porous structure of the PCL/TG_{60/40} samples is strongly affected by the gas mixture composition. In particular, in the range 80–20 to 50–50 vol %, foams were characterized by two foamed phases [Figs. 1(a), 3(b), and 5(a)], with finer TG phase morphologies with respect to the PCL phase. With further increase

of CO₂, the TG phase foams did not change significantly, while PCL foams were characterized by coarse and mainly closed-cell structures. The differences in the foaming behavior of the two different

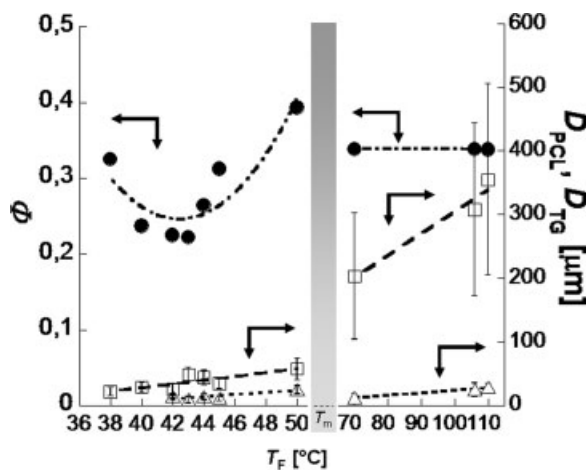


Figure 4 Effect of T_F on Φ (●), D_{PCL} (□), and D_{TG} (△) of PCL/TG_{60/40} blend foamed with 80–20 vol % N₂-CO₂ blowing mixture, $P_{\text{sat}} = 180$ bar and PDR = 700 bar/s. Closed symbols refer to the left axis and open symbols refer to the right axis.

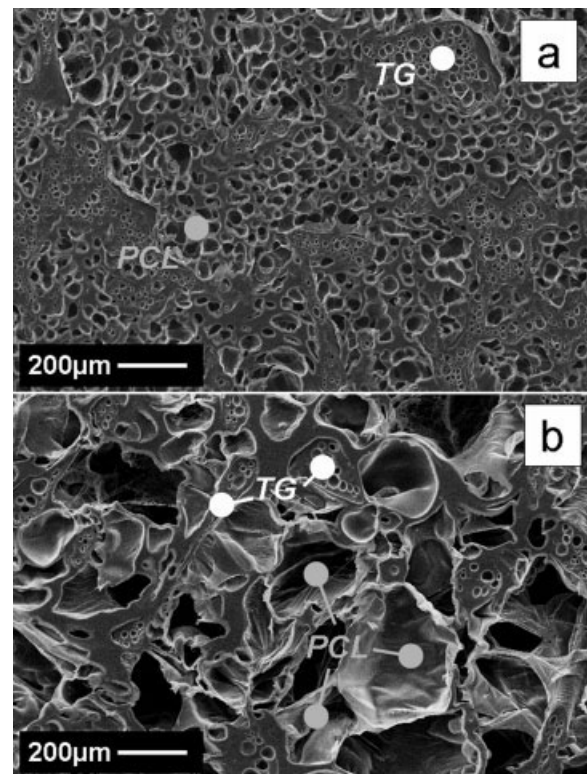


Figure 5 SEM micrographs of PCL/TG_{60/40} blend foamed at $T_F = 43^\circ\text{C}$ with different CO₂-N₂ blowing mixture: (a) 40–60 vol %, (b) 70–30 vol %.

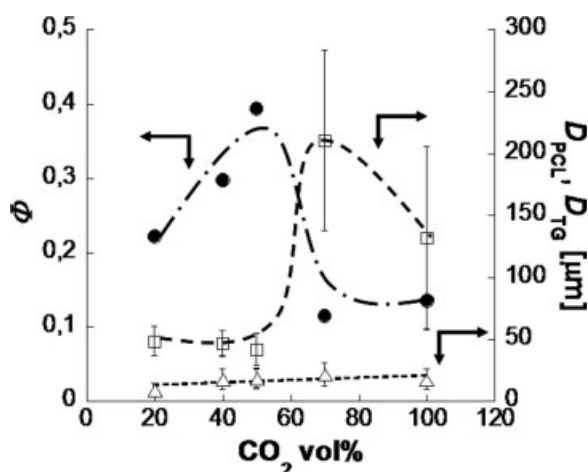


Figure 6 Effect of blowing mixture composition on Φ (●), D_{PCL} (□), and D_{TG} (△) of PCL/TG_{60/40} blend foamed with $T_F = 43^\circ\text{C}$ and PDR = 700 bar/s. Closed symbols refer to the left axis and open symbols refer to the right axis.

phases could be ascribed to the different solubilities and related plasticization effect of the blowing mixtures. In particular, with the increase of CO₂ content beyond 50 vol %, elongational properties of PCL dramatically decreased, resulting in the impossibility to withstand the elongational stresses during foaming. In fact, the increased plasticization effect of CO₂

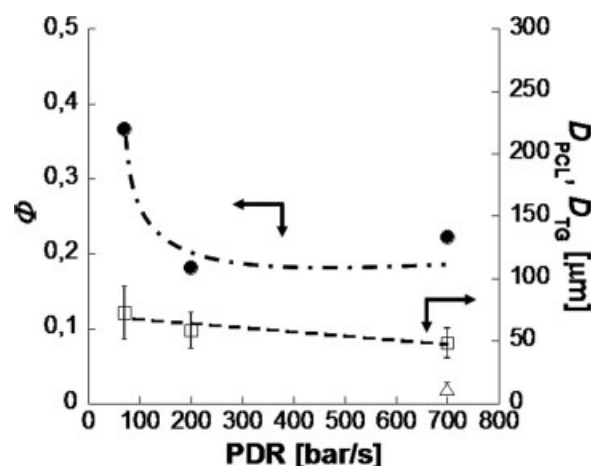


Figure 8 Effect of PDR on Φ (●), D_{PCL} (□), and D_{TG} (△) of PCL/TG_{60/40} blend foamed with 80–20 vol % N₂-CO₂ blowing mixture at $T_F = 43^\circ\text{C}$ and $P_{sat} = 180$ bar. Closed symbols refer to the left axis and open symbols refer to the right axis.

could be described as a temperature increase, which, as observed before, could lead to cell collapse. Conversely, TG did not present any collapse in the analyzed experimental range of blowing agent composition, as observed earlier, in the analysis of the effect of T_F [Fig. 5(b)], proving a wider foaming window with respect to PCL. The effect of PDR on foam microstructures was investigated by selecting 80–20 vol % N₂-CO₂ blowing mixture during next foaming experiments.

Effect of PDR on foam microstructures

The effect of PDR on PCL/TG_{60/40} foam microstructures was evaluated in the range 70–700 bar/s, by GF with 80–20 vol % N₂-CO₂ mixture as the blowing agent, at $T_F = 43^\circ\text{C}$ and $P_{sat} = 180$ bar. SEM micrographs of samples foamed at PDR of 70, 200, and 700 bar/s [Figs. 7(a,b) and 1(a) respectively] show morphologies characterized by PCL porous structure and limited expansion of the TG phase in the whole range of PDR. Φ and D_{PCL} decrease significantly from 70 to 700 bar/s, as shown in Figure 8.²² We finally selected PDR = 700 bar/s to prepare the PCL scaffolds.

PCL scaffold preparation by TG extraction

Results of TG extraction are reported in Figures 9 and 10. Figure 9 shows SEM micrograph of the scaffold prepared at $T_F = 70^\circ\text{C}$, by foaming PCL/TG_{60/40} blend with 80–20 vol % N₂-CO₂ at $P_{sat} = 180$ bar and PDR = 700 bar/s. The morphology is characterized by a single-scale porous network with rounded and well interconnected macropores. In fact, when foaming process is achieved at $T_F > T_m$, PCL expands and soon collapses on the TG walls, as previously

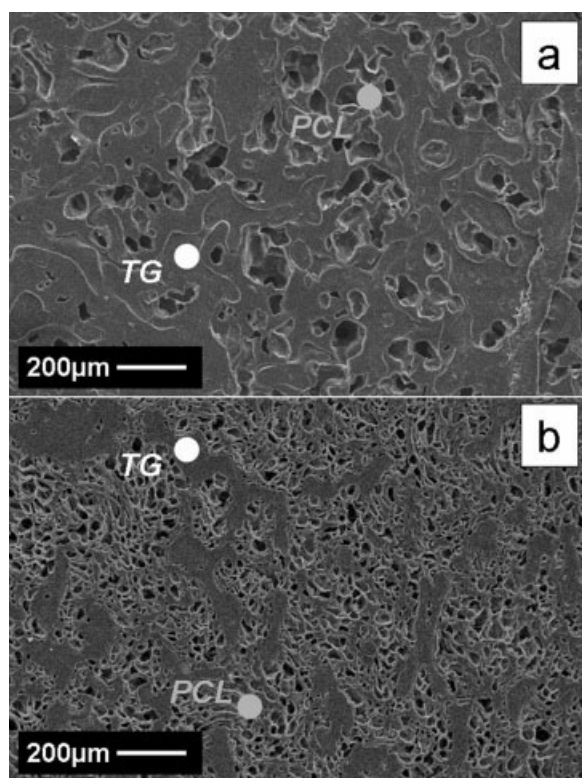


Figure 7 SEM micrographs of PCL/TG_{60/40} blend foamed with 80–20 vol % N₂-CO₂ blowing mixture at $T_F = 43^\circ\text{C}$ and $P_{sat} = 180$ bar with different PDR: 70 bar/s (a) and 200 bar/s (b).

described, thus creating macropores on the same dimension of the pores created by TG extraction.

SEM micrographs of the scaffold prepared at $T_F = 44^\circ\text{C}$, by foaming PCL/TG_{60/40} blend with 80–20 vol % N₂-CO₂ at $P_{\text{sat}} = 180$ bar and PDR = 700 bar/s, are reported in Figure 10. As expected, the lower magnification of Figure 10a reveals that by this technique it is possible to prepare scaffold with pore size and shape on a double scale: (i) macroporosity created by the removal of TG foamed phase and (ii) microporosity formed during PCL foaming. In particular, the macroporosity appears elongated, interconnected, and homogeneously distributed around open and circular shaped microporosity ($D \sim 30 \mu\text{m}$), as evidenced in Figure 10b. The micrograph of Figure 10c shows the morphology of the polymeric walls between macroporosity and microporosity. The image reveals that the macroporosity walls appear rough and porous, with an homogeneous distribution of circular pores ($D \sim 10 \mu\text{m}$). This third scaled porosity is probably originated by the rupture of PCL bubble walls at the interface with TG and led to the formation of a single and highly interconnected macro and micro-porous network, necessary for the growth of thick cross sections of tissue.^{27–29}

CONCLUSIONS

The present study investigated the feasibility of preparing PCL scaffolds with a well controlled porous architecture without using toxic solvents and/or porogens. PCL and TG polymers and GF and PE techniques were selected and combined to regulate scaffold morphology on a single or double scale.

The effect of PCL/TG blend composition and GF process parameter (blowing mixture composition, PDR, and T_F) on foamed blend morphologies was studied to design the final scaffold architectures.

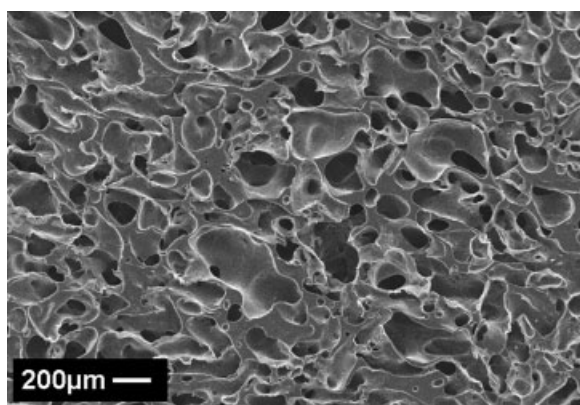


Figure 9 SEM micrograph of PCL scaffold prepared by GF/PE technique from PCL/TG_{60/40} blend foamed with 80–20 vol % N₂-CO₂ blowing mixture, $P_{\text{sat}} = 180$ bar, PDR = 700 bar/s at $T_F = 70^\circ\text{C}$.

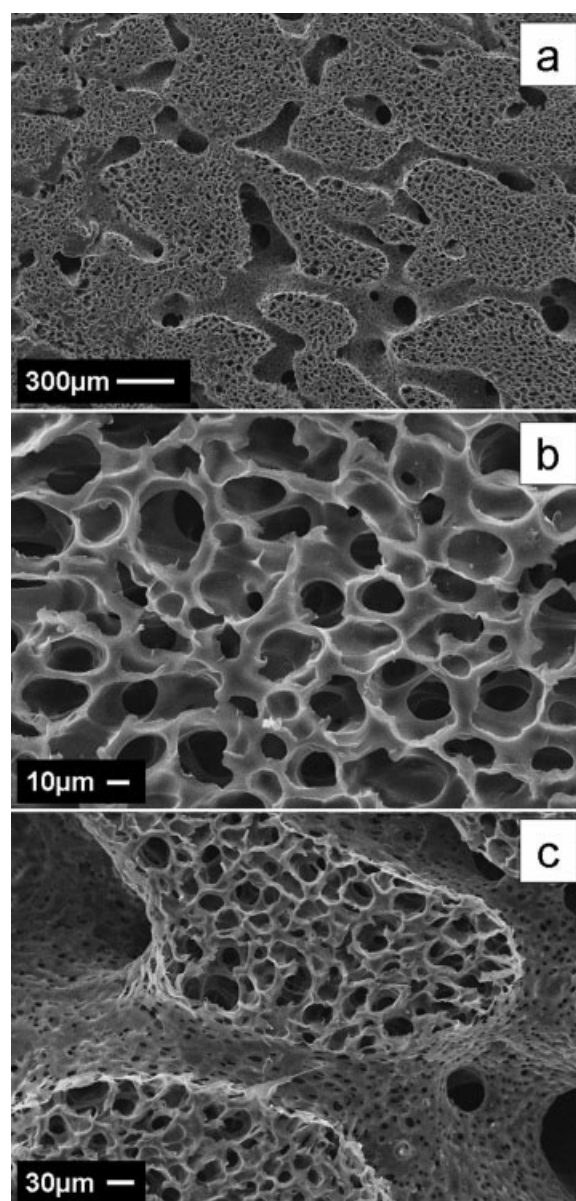


Figure 10 SEM micrographs of μ -bimodal PCL scaffold prepared by GF/PE technique from PCL/TG_{60/40} blend foamed with 80–20 vol % N₂-CO₂ blowing mixture, $P_{\text{sat}} = 180$ bar, PDR = 700 bar/s at $T_F = 44^\circ\text{C}$.

Scaffold with a single scale porous network was prepared from PCL/TG_{60/40} blend by GF with 80–20 vol % N₂-CO₂ blowing mixture, $P_{\text{sat}} = 180$ bar, PDR = 700 bar/s, and $T_F = 70^\circ\text{C}$.

μ -Bimodal and highly interconnected PCL scaffold with pore shape and dimension on a double scale was prepared by selecting $T_F = 44^\circ\text{C}$ and unvarying the other process parameters.

These results suggest that the appropriate selection of blend composition and GF process parameters allows the design of highly interconnected porous network of PCL scaffolds suitable to be used for tissue engineering.

References

1. Hutmacher, D. W. *Biomaterials* 2000, 21, 2529.
2. Mikos, A. G.; Thorsen, A. J.; Czerwonka, L. A.; Bao, Y.; Langer, R.; Winslow, D. N.; Vacanti, J. P. *Polymer* 1994, 35, 1068.
3. Zhou, Q.; Gong, Y.; Gao, C. *J Appl Polym Sci* 2005, 98, 1373.
4. Mooney, D. J.; Baldwin, D. F.; Suh, N. P.; Vacanti, J. P.; Langer, R. *Biomaterials* 1996, 17, 1417.
5. Mathieu, L. M.; Mueller, T. L.; Bourban, P.; Pioletti, D. P.; Muller, R.; Manson, J. E. *Biomaterials* 2006, 27, 905.
6. Yang, X.; Tare, R. S.; Partridge, K. A.; Roach, H. I.; Clarke, N. M. P.; Howdle, S. M.; Shakesheff, K. M.; Oreffo, R. O. C. *J Bone Min Res* 2003, 18, 47.
7. Sarazin, P.; Roy, X.; Favis, B. D. *Biomaterials* 2004, 25, 5965.
8. Washburn, N. R.; Simon, C. G., Jr.; Tona, A.; Elgendy, H. M.; Karim, A.; Amis, E. J. *J Biomed Mater Res* 2002, 60, 20.
9. Karageorgiou, V.; Kaplan, D. *Biomaterials* 2005, 26, 5474.
10. Gong, Y.; Ma, Z.; Gao, C.; Wang, W.; Shen, J. *J Appl Polym Sci* 2006, 101, 3336.
11. Wei, G.; Ma, P. X. *Biomaterials* 2004, 25, 4749.
12. Harris, L. D.; Kim, B.; Mooney, D. J. *J Biomed Mater Res* 1998, 42, 396.
13. Kim, S.; Park, M. S.; Jeon, O.; Choi, C. Y.; Kim, B. *Biomaterials* 2006, 27, 1399.
14. Reignier, J.; Huneault, M. A. *Polymer* 2006, 47, 4703.
15. Hutmacher, D. W.; Schantz, T.; Zein, I.; Ng, K. W.; Teoh, S. H.; Tan, K. C. *J Biomed Mater Res* 2001, 55, 203.
16. Di Gioia, L.; Guilbert, S. *J Agric Food Chem* 1999, 47, 1254.
17. Willemse, R. C.; De Boer, A. P.; Van Dam, J.; Gotsis, A. D. *Polymer* 1998, 39, 5879.
18. Galloway, J. A.; Jeon, H. K.; Bell, J. R.; Macosko, C. W. *Polymer* 2005, 46, 183.
19. Marrazzo, C.; Di Maio, E.; Iannace, S.; Nicolais, L. *J Cell Plast*, to appear.
20. Klemmner, D.; Frisch, K. C. *Handbook of Polymeric Foams and Foam Technology*. Hanser Gardener: New York, 1991.
21. Di Maio, E.; Mensitieri, G.; Iannace, S.; Nicolais, L.; Li, W.; Flumerfelt, R. W. *Polym Eng Sci* 2005, 45, 432.
22. Park, C. B.; Baldwin, D. F.; Suh, N. P. *Polym Eng Sci* 1995, 35, 432.
23. Whitaker, S. *Ind Eng Chem* 1969, 61, 14.
24. Kwak, K. D.; Okada, M.; Chiba, T.; Nose, T. *Macromolecules* 1992, 25, 7204.
25. Taki, K.; Nitta, K.; Kihara, S.; Ohshima, M. *J Appl Polym Sci* 2005, 97, 1899.
26. Salerno, A.; Oliviero, M.; Di Maio, E.; Iannace, S. *Int Polym Proc*, to appear.
27. Sachlos, E.; Czernuszka, J. T. *Eur Cells Mater* 2003, 5, 29.
28. Ishaug-Riley, S. L.; Crane, G. M.; Gurlek, A.; Miller, M. J.; Yasko, A. W.; Yaszemski, M. J.; Mikos, A. G. *J Biomed Mater Res* 1997, 36, 1.
29. Heslop, B. F.; Zeiss, I. M.; Nisbet, N. W. *Br J Exp Path* 1960, 41, 269.

A. Salerno¹, M. Oliviero¹, E. Di Maio^{1*}, S. Iannace²

¹ Department of Materials and Production Engineering, University of Naples Federico II, Naples, Italy

² Institute for Composite and Biomedical Materials, Portici (Na), Italy

Thermoplastic Foams from Zein and Gelatin

The aim of this study was to characterize the foaming of natural proteins as thermoplastic polymers. In particular, two proteins, one of vegetal origin, zein, and one of animal origin, gelatin, were processed to achieve thermoplastic polymers, and subsequently foamed by a gas foaming batch process. The effects of suitable plasticizing additives and melt-mixing process on the thermal and mechanical properties of the thermoplasticized proteins were evaluated to assess the thermoplastic characteristics of these materials. Furthermore, selected protein/plasticizers systems were foamed with mixtures of CO₂ and N₂ as blowing agents, in a batch foaming apparatus, at different temperatures, pressures and pressure drop rates, to evaluate the processing window and the final properties of the foams. Foams with densities of 0.1 g/cm³ and morphologies characterized by uniform distributions of cells with 10 μm diameters were obtained. Results indicate the suitability of zein and gelatin for being processed with classical thermoplastic processing technologies including melt mixing and foaming and their potentials as biodegradable polymers.

1 Introduction

Renewed interest in natural polymers like polysaccharides and proteins has been recently stimulated by waste disposal problems and environmental concerns, aiming at alternatives to petroleum-derived materials.

Within the polysaccharides, starch is the most important, since it is the most abundant in nature and relatively in expensive. Starch has been the subject of numerous papers reporting its plastic behaviour, for it can be processed with classical plastic processing technologies (e. g. extrusion, foaming and film blowing) and for the plastic-like properties of thermo-plasticized starch, that have promoted its use in some commodity application as substitute for petroleum based plastics (van Soest and Borger, 1997; Wiedmann and Srobel, 1991; Yu and Gao, 1996). The main limitation for starch is the hydrophilic nature, which limits its use in high moisture environments (Brouillet-Fourmann et al., 2002).

Zein, the prolamine of corn, is a natural protein with high resistance to water (it is insoluble in water) (Lai et al., 1997; Lai and Padua, 1998; Lawton, 2002; Momany et al., 2006; Padua

and Rakotonirainy, 2003; Shukla and Cheryan, 2001), due to the high portion of relatively hydrophobic amino acids present and better water vapour barrier properties (Cuq et al., 1998), if compared with other proteins like casein, or polysaccharides such as starch. Zein has been used in a number of applications since becoming commercially available in 1938 but its use as plastic materials is still very limited to high value added products (e. g. in pharmaceuticals) (Beck et al., 1996; Padua et al., 2002). This is mostly due to the complex, hierarchical, highly interactive structure which makes it very difficult to process. In particular, proteins are heteropolymers (differently from starch, which is a homopolymer) with amino acids as building blocks, arranged in secondary structures of helices and sheets, in turn packed to form globular units (Batterman–Azcona, 1999; Wang et al., 2005). These three dimensional structures are tightly bonded by hydrogen as well as disulfide bonds and have to be (at least partially) disrupted, to obtain separate, entangled macromolecules by a process called “denaturation”, in order to achieve plastic-like properties (de Graaf, 2000).

Denaturation can be induced both by temperature and by denaturants, often by both. Protein denaturation has been well studied in solutions with water content >90 % (wet denaturation) while little research has been performed on denaturation in systems at low or medium water content (dry denaturation), which is more interesting from a technological point of view (Ha and Padua, 2001; Wang et al., 2003; Wang et al., 2005). Several proteins have been thermoplasticized using very low water content, by direct extrusion, internal mixing or injection moulding, proving the high potential of these “bioplastics” for massive production (Azranitoyannis et al., 1998; Cuq et al., 1997; Jongjareonrak et al., 2007; Pomet et al., 2003; Redl et al., 1999; Thièband et al., 1996; Vez et al., 2003). However, there is still need for additional fundamental information, such as the mechanism of thermoplasticization, the role and mechanisms of plasticizers and the influence of processing conditions (i. e. temperature, shear stress) on denaturation and on the final properties.

Gelatin is the result of the denaturation process of collagen, the major structural protein of most connective tissues (Bigi et al., 2004). Currently there is a wide interest in gelatin, for its low cost and biodegradability, in food, pharmaceutical and photographic industries. Its film forming ability, furthermore, generated interests in using gelatin in packaging applications (Padua et al., 2002). Gelatin films have been produced by casting while direct melt (dry) processing on gelatin has not been reported.

Foaming of natural polymers has been mostly studied in the context of food engineering, in the preparation of bread and

* Mail address: E ■ Di Maio, Department of Materials and Production Engineering, University of Naples Federico II, P.le Tecchio 80, 80125 Naples, Italy
E-mail: edimaio@unina.it

cooked snacks (Glenn et al., 2001; Shogren et al., 2002) while other examples include ice creams, puff-dried fruits and vegetables, egg white and beer (Goof et al., 1999; Hagolle et al., 2000). The utilized technologies are different from the gas foaming technology used for thermoplastic polymers (e. g. bread and cooked snacks are produced via mixing (aeration) and fermentation with gas evolution processes). Classical polymer science (e. g., matrix rheology, matrix density, interfacial, strain hardening properties) has been successfully applied to optimize food final sensation and texture (de Cindio et al., 2002a, 2002b; Thièband et al., 1996). Recently, however, plastic processing technologies (steam-based extrusion) have been used to produce foams with different formulations including starch for different applications such as packaging and insulation (Willet and Shogren, 2002), while the gas foaming technology to produce foams from thermoplasticized proteins has never been reported in the scientific literature.

In this paper we analyzed the melt mixing process of zein and gelatin and the use of the batch foaming technology with nitrogen and carbon dioxide as the physical blowing agents to obtain foamed materials.

2 Materials and Methods

2.1 Materials

Maize zein (cod.: Z3625, batch: 101H0724) and gelatin from bovine skin type B (cod.: G9382, batch: 04K0004) were purchased from Sigma-Aldrich (Italy). In order to investigate the thermoplasticity of zein and gelatin, low molecular weight compounds with different chemical functions (alcohol and acid) and hydrophobicity degree (carbon chain length) were used as plasticizers (see Table 1). In particular, glycerol and lactic acid were used as plasticizers for gelatin while PEG 400, lactic acid, lauric acid and stearic acid for zein. N₂, CO₂ and their mixtures (Air Liquide, Italy) were used as physical blowing agents for gas foaming experiments.

2.2 Thermoplasticized Protein-based Materials Preparation

Zein powder or gelatin powder, as received by the supplier (moisture content, as determined by thermogravimetric analysis, equal to 7 and 11 wt.%, respectively), were mixed with the plasticizer in a beaker using a spatula to provide a crude blend. The blend was then subjected to temperature and shear stresses in a twin counter rotating internal mixer (Rheomix 600 Haake, Germany) connected to a control unit (Rheocord

9000 Haake, Germany) for thermoplasticization. Torque and melt temperature were recorded during the mixing process to provide the mixing process history. The mixing chamber (volume of 50 cm³) was filled with 50 g total mass for all experiments in approximately 3 min at 5 min⁻¹. Plasticizer contents of 20, 25 and 30 wt.% were used. Mixing temperature, T_{mix}, speed of rotation, N, and mixing time, t, were 60 °C, 60 min⁻¹ and 6 min, respectively for thermoplastic gelatin (TG) and 80 °C, 50 min⁻¹ and 10 min for thermoplastic zein (TZ).

A P300P hot press (Collin, Germany) was then used to prepare slabs with thickness of 1 mm. Materials were heated at the same temperature of mixing and pressed at 50 bar for 10 min and subsequently cooled to 30 °C under pressure. From the central region of the films, dog bone-shaped specimens for mechanical analysis and cylindrical samples of 10 mm in diameter for gas foaming experiments were cut.

2.3 Thermoplasticized Protein-based Materials Characterization

2.3.1 Thermal Analysis

Thermogravimetric (TGA) and differential scanning calorimetric (DSC) analyses were performed to evaluate the effect of the thermoplasticization on thermal properties of gelatin and zein and to select suitable foaming temperatures. In particular, TGA experiments were carried out in a TGA 2950 (TA Instruments, USA) over a temperature range of 30 °C to 600 °C at 10 °C/min under inert atmosphere. For DSC analyses (DSC Q1000, TA Instruments, USA), 15 mg samples were initially dried by heating to and held at 100 °C for 5 min and subsequently scanned at 5 °C/min from -80 °C to 200 °C.

2.3.2 Mechanical Properties

Tensile tests were performed at room temperature according to ASTM standard D1708-02 by using a 4204 Universal Testing Machine (Instron, USA) with 1kN load cell and at a displacement rate of 10 mm/min. Force and displacement were measured by the apparatus and recorded to evaluate Young's modulus (E), stress at break (σ_R) and elongation at break (ε_R). Because the mechanical properties of these films are known to be strongly affected by water content, samples were preconditioned at room temperature and 50 % relative humidity for 48 h before testing. Mechanical characterization was performed within 3 days from sample moulding.

Plasticizer	Chemical formula	Mw g/mol	Supplier
Glycerol	OH-CH ₂ -CHOH-CH ₂ -OH	92.09	Sigma-Aldrich
Poly(ethylene glycol) 400 (PEG 400)	H-(OCH ₂ CH ₂) _n -OH	400	Fluka
Lactic Acid	CH ₃ -CH(OH)-COOH	90.08	Sigma-Aldrich
Lauric Acid	CH ₃ -(CH ₂) ₁₀ -COOH	200.32	Sigma-Aldrich
Stearic Acid	CH ₃ -(CH ₂) ₁₆ -COOH	284.49	Sigma-Aldrich

Table 1. Physico-chemical characteristics of the different plasticizers used

2.4 Foaming of Thermoplasticized Protein-based Materials

2.4.1 Batch Foaming Experiments

Foaming experiments were carried out by using a batch process on disc-shaped samples (10 mm in diameter and 1 mm thick). The thermoplasticized protein samples were placed into the pressure vessel (Marrazzo et al., 2007) and kept with blowing agent mixture for six hours at 70 °C and at saturation pressure in the range 60 to 180 bar. After saturation, samples were rapidly cooled or heated to the desired foaming temperature with a controlled profile and finally pressure was reduced to atmospheric pressure to allow foaming. To stabilize the cellular structure, foams were immediately cooled down to ambient temperature and subsequently removed from the vessel. The processing parameters selected to control foam morphologies were: N₂-CO₂ vol.% of the blowing agent mixture (Di Maio, 2005; Hwang and Cha, 2002) in the range 0-100 to 100-0; foaming temperature (T_F) (Han et al., 2003) in the range 44 to 140 °C and pressure drop rate (PDR) (Park et al., 1995) in the range 250 to 700 bar/s.

2.4.2 Foam Characterization

Foamed samples were cross-sectioned, gold sputtered and analyzed by scanning electron microscopy (LEICA mod. S440). To evaluate the effect of gas foaming processing parameters on foam microstructures, mean cell diameter (D_C) was evaluated by image analysis. A minimum of 150 cells for each sample were selected from the micrographs and analyzed with Image J software. The cell diameter was calculated with the hypothesis of spherical shape, by correcting the software output with the factor $4/\pi$ (ASTM D3576) (Kumer and Suh, 1990).

3 Results and Discussion

3.1 Mixing

Fig. 1 shows the evolution of torque and melt temperature vs. time during the mixing process of zein with the four different plasticizers (stearic acid, PEG 400, lactic acid and lauric acid,

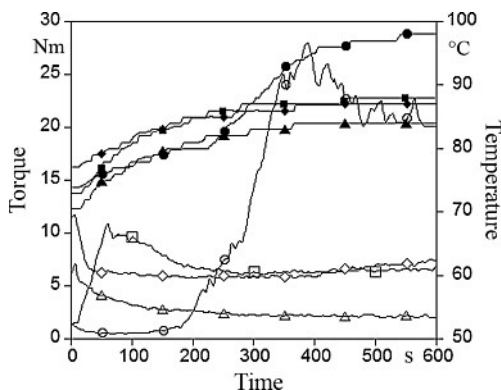


Fig. 1. Torque (open symbols) and melt temperature (closed symbols) evolution during the mixing process of zein with PEG 400 (\diamond , \blacklozenge), stearic acid (\circ , \bullet), lauric acid (\square , \blacksquare) and lactic acid (\triangle , \blacktriangle) (25 wt.% plasticizer content, $N = 50 \text{ min}^{-1}$, $T_{\text{mix}} = 80^\circ\text{C}$, $t = 10 \text{ min}$)

25 wt.%). As reported for other protein-plasticizer systems, torque evolution during thermoplasticization can be described as a three-step process (Redl et al., 1999), characterized by a first horizontal plateau followed, after a certain induction time, by a steep increase of the torque to a maximum and then a continuous decrease to a rather stationary value, when also the melt temperature becomes constant. In our case, this behaviour was more evident in zein-stearic acid and zein-lauric acid systems, while for PEG 400 and lactic acid the torque increase was immediate, with the absence of the induction time.

The complexity of the thermoplasticization process is related to numerous phenomena, which bring the plasticizer in close contact with the protein macromolecules and, eventually, with the help of shear stresses, denature the hierarchical structure to achieve entangled molecules. Process variables and formulations that enhance the diffusion of the plasticizer and the shear stresses induce an improvement and a shortening of the whole thermoplasticization process. In particular it is fundamental the ability of the plasticizer to interact with the protein: it is known (Sothornvit and Krochta, 2001) that the efficiency of the plasticizer depends on several factors such as its size (molecular weight), shape and functionality (mostly, number of oxygen atoms). As a general rule, a good plasticizer should have a high content of available oxygen atoms and a small size. In this work all of the plasticizers were linear molecules, and they were different in content of oxygen atoms and size. In our case lactic acid and PEG 400 were better plasticizers for zein with respect to lauric and stearic acid. This is probably related to their smaller molecular size and/or higher amount of oxygen atoms.

Torque histories of the thermoplasticization process of gelatin are reported in Fig. 2, showing that, in this case, the lactic acid was more efficient than glycerol. Fig. 2 also reports the effect of plasticizer content (20 and 25 wt.%) on torque during gelatin mixing with lactic acid and glycerol, showing an increase of the induction time and a decrease of the maximum and final torque with the increase of the plasticizer amount. Same dependences have been observed by Selling et al. (2004) for zein plasticized with 5 to 30 wt.% of water and/or

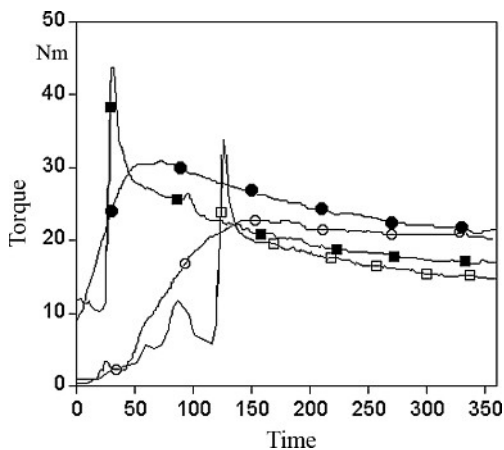


Fig. 2. Effect of type and plasticizer content on torque evolution during the mixing process of gelatin with glycerol (\bullet 20 wt.%, \circ 25 wt.%) and lactic acid (\blacksquare 20 wt.%, \square 25 wt.%) ($N = 60 \text{ min}^{-1}$, $T_{\text{mix}} = 60^\circ\text{C}$, $t = 6 \text{ min}$)

tri(ethylene) glycol, and by Redl et al. (1998) for gluten plasticized with 30 to 60 wt.% of glycerol. Observed dependencies can be related to the enhanced lubricant effect of the increased amount of plasticizer that reduced the viscosity of the system and consequently, the torque values measured during mixing. As a co-effect, shear stresses and melt temperature decreased, in turn reducing the diffusivity of the plasticizer molecules into the protein chains and, finally, determining the observed increase of the time lag.

3.2 Thermal Properties

Fig. 3 reports TGA and DSC results for pure gelatin and TG. TGA curve of pure gelatin showed a weight loss in the range 30 to 140 °C, associated to evaporation of water, while a steep weight decrease starts at 271 °C and can be associated to the degradation of the protein. Results of the TGA for TG show a similar water loss in the range 30 to 140 °C, while, in this case, both the evaporation of the plasticizer (glycerol) and protein degradation are responsible for the earlier steep weight loss at 221 °C (T_{ons} in Fig. 3). Moreover, the DSC curve for the TG showed a glass transition (T_g) at 50 °C, which is not present in

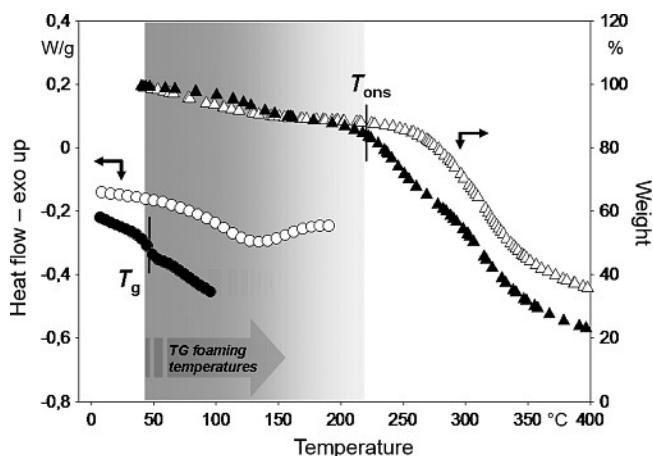


Fig. 3. TGA and DSC curves of pure (Δ , \circ) and thermoplasticized gelatin (\blacktriangle , \bullet) with the indication of T_g , T_{deg} and foaming temperature range of TG

the thermograms of the pure gelatin, while both TG and gelatin are characterized by an endothermic peak in the range 90 to 180 °C. Similar thermal transitions have been observed by Zheng et al. (2002) for dehydrated gelatin powder (attributed to the devitrification of α -amino acid-rich blocks) and by Vanin et al. (2005) for dehydrated gelatin-glycerol systems (attributed to the helix-coil transitions). Results of the thermal analysis on TG provide useful information for the selection of processing temperatures in foaming (e.g. solubilization and foaming temperatures). In effect, at temperatures below the T_g of the TG, foaming is hindered by the very high rigidity of the polymer/blowing agent solution while, at high temperatures, the protein is prone to degradation/loss of plasticizer. Gas foaming temperatures were hence selected with the minimum temperature close to T_g and with maximum temperature well below 221 °C.

TGA curves of pure and thermoplasticized zein showed a less pronounced differences in the T_{ons} (280.9 °C and 272.5 °C, respectively). Moreover, the DSC analyses of the pure zein revealed the presence of a thermal transition at 162 °C for the pure protein, which can be attributed to the T_g . Similar T_g values (162 to 165 °C) have been observed by Magoshi et al. (1992) for anhydrous zein. Beck et al. (1996) measured a T_g of 139 °C for pure zein and a T_g of 90 °C for zein-20 wt.% PEG 300 prepared via water-plasticization, compression moulding and drying. In view of the natural variability of the material source and of the different plasticization methods employed, these results can be considered in agreement with ours. Taking into account these results, foamability of TZ materials was investigated at T_F starting from 44 °C.

3.3 Mechanical Properties

The effect of the different plasticizers and their content on the tensile characteristics of plasticized zein and gelatin is reported in Table 2. Of the plasticizers studied, lactic acid-plasticized proteins resulted in the highest σ_R for both gelatin and zein, with minor differences observed in E and ϵ_R (see Table 2). This behaviour can be due to the smaller size of the lactic acid molecule with respect to the other plasticizers, allowing increased interaction with the protein molecules, facilitating, in turn, their movement in response to the applied stress (Donhowe

Protein	Plasticizer types	Plasticizer wt. %	σ_R MPa	YM MPa	ϵ_R mm/mm
TZ	Lactic acid	25	11.5 ± 1.5	897.1 ± 150	0.043 ± 0.023
	Lauric acid	25	14.1 ± 1.1	820.3 ± 25	0.026 ± 0.007
	Stearic acid	25		Fragile material	
	PEG 400	20		Fragile material	
	PEG 400	25	11.8 ± 0.8	843.2 ± 110	0.028 ± 0.011
	PEG 400	30	0.721 ± 0.2	23.91 ± 9	0.75 ± 0.24
TG	Lactic acid	20	5.48 ± 0.29	241.2 ± 30	2.24 ± 0.23
	Glycerol	20	7.69 ± 0.69	198.5 ± 22	1.76 ± 0.1
	Glycerol	25	6.29 ± 0.31	114.8 ± 17.8	1.78 ± 0.03

Table 2. Effect of type and plasticizer content on the tensile properties of TZ and TG films

and Fennema, 1993; Sothornvit and Krochta, 2001). As expected, the increase of the plasticizer content resulted in materials with lower E and σ_R but with higher ϵ_R (see Table 2), in agreement with the studies of Masco-Arriola (1996) and Jongjareonrak et al. (2006).

Literature data on mechanical properties of plasticized zein and gelatin mostly deal with materials prepared by solution casting, revealing that samples obtained by casting show, generally, inferior mechanical properties with respect to melt mixed materials, mostly in terms of deformability. Tillekeratne et al. (2002) reported a value of ϵ_R of 1.5 % for zein plasticized with PEG 400 at 30 %, while we measured a ϵ_R of 75 %, with the same composition of PEG 400. Similar conclusions can be drawn on gelatin for which Jongjareonrak et al. (2006) reported an ϵ_R of 10.9 % for gelatin plasticized with 25 wt.% of glycerol, while we observed a ϵ_R of 110 %. Unfortunately data on E and σ_R were not reported by the cited references. The effect of the different film formation technologies has been reported by Lai and Padua (1997) which investigated the mechanical properties of zein films plasticized with 33 wt.% of oleic acid and prepared from casting solutions and stretched resins. They observed that, in general, stretched resin films showed better mechanical properties with respect to cast films in terms of deformability (fourfold increases in ϵ_R) at comparable E (18 % lower in the case of stretched resin) and σ_R (20 % higher in the case of stretched resin), proving, possibly, a lower plasticizing efficiency of the casting technique. Although results reported in Table 2 show that lactic acid provided the best mechanical properties to TZ, with PEG 400 slightly below, it has to be evidenced that lactic tends to migrate to the surface of gelatin and zein films, resulting in a loss of film flexibility (Tillekeratne and Easteal, 2002). For this reason, PEG 400 (at 25 wt.%) and glycerol (at 20 wt.%) were finally used for preparing TZ and TG, respectively, for the gas foaming experiments.

3.4 Foaming

The foamability of the thermoplasticized protein-based materials was studied by analyzing the effect of the gas foaming processing parameters on foam morphologies. In particular, the effects of blowing agent composition, T_F and PDR, on D_C and final densities of TZ and TG foams were evaluated.

Test number	N ₂ -CO ₂ vol. %	P _{sat} bar	T _F °C	PDR bar/s
1	0-100	60	50	250
2	0-100	60	60	250
3	0-100	60	70	250
4	50-50	150	70	250
5	80-20	180	44	700
6	80-20	180	70	700
7	80-20	180	73	700
8	80-20	180	76	700
9	80-20	180	79	700
10	80-20	180	87	700
11	80-20	180	100	700
12	100-0	180	100	700

Table 3. Experimental conditions used for the preparation of TZ foams

3.4.1 Thermoplastic Zein

The test conditions used in TZ foaming experiments are listed in Table 3. SEM micrographs of selected TZ foams (#1, #9 and #12) are shown in Fig. 4 in order to illustrate the effect of the different blowing agents (pure CO₂, 80-20 N₂-CO₂ vol.% mixture and pure N₂; Fig. 4A, B and C, respectively) on foam morphologies. The cell microstructure changed significantly by using CO₂, N₂, or their mixtures. In particular, when foamed with CO₂ (Fig. 4A), the cells were separated from each other by thick walls (suggesting a high density of the foams) and they were characterized by pores with a D_C of 70 μm having highly irregular and rough pore surfaces. Similar morphologies were observed with the increase of the T_F (maintaining constant the other processing parameters, in test #2 and #3), which resulted in foams with pores characterized by greater and more dispersed values of D_C and lower foam densities (as low as 0.24 g/cm³). Foams prepared from TZ with 80 to 20 N₂-CO₂ vol.% (Fig. 4B), showed a microstructure characterized by higher cell number densities, with smaller D_C (37 μm) and homogeneous cellular structures. The decrease of D_C is related to the different blowing mixture composition, but also to the higher P_{sat} and PDR (#9). It is important to note that, in the cited tests (compare #1 and #9, Fig. 4A and B) foaming temperatures were different. In effect, as observed in many polymeric systems, plasticization induced by CO₂ is more pro-

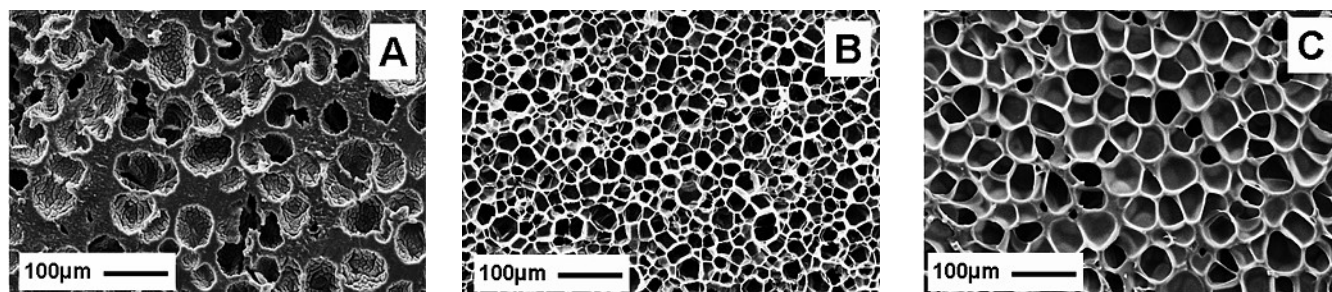


Fig. 4. SEM micrographs of TZ foams: (A) N₂-CO₂ 0-100 vol.%, $T_F = 50^\circ\text{C}$, $P_{sat} = 60$ bar and $PDR = 250$ bar/s; (B) 80-20 vol.% N₂-CO₂, $T_F = 79^\circ\text{C}$, $P_{sat} = 180$ bar and $PDR = 700$ bar/s; (C) 100-0 vol.% N₂-CO₂, $T_F = 100^\circ\text{C}$, $P_{sat} = 180$ bar and $PDR = 700$ bar/s

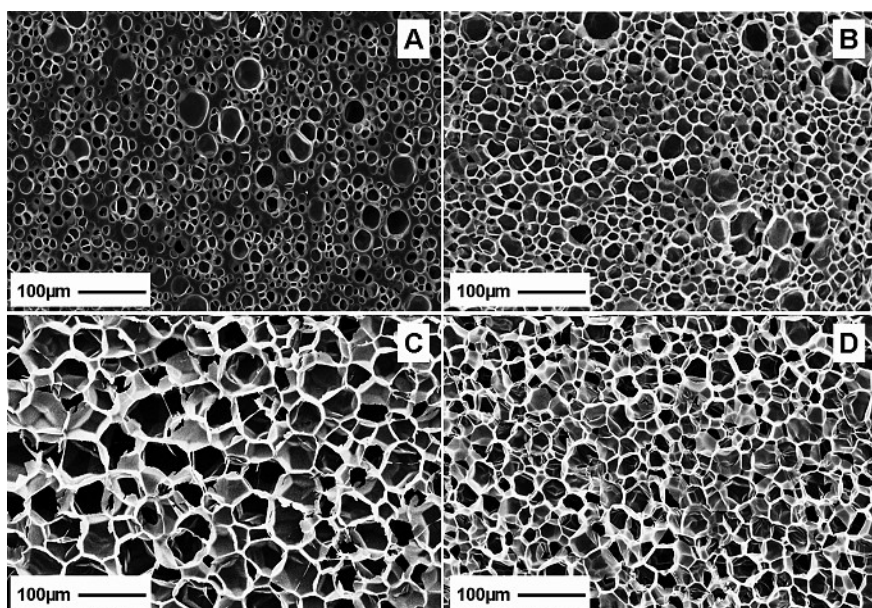


Fig. 5. SEM micrographs of TZ foamed with N_2 - CO_2 80-20 vol.% at $P_{sat} = 180$ bar; PDR = 700 bar/s and $T_F = 44^\circ C$ (A), $70^\circ C$ (B), $76^\circ C$ (C) and $87^\circ C$ (D)

nounced with respect to N_2 , resulting in lower foaming temperatures observed also for other biodegradable polymers (Di Maio et al., 2005). Finally, Fig. 4C shows the cell microstructure obtained by using pure N_2 (#12), at a higher temperature ($100^\circ C$). The use of pure N_2 resulted in TZ foams characterized by a homogeneous porosity and D_C of $48 \mu m$. As a general comment on the effect of blowing agent compositions on TZ foaming, there is evidence that the mixture 80 to 20 N_2 - CO_2 vol% can be considered the best blowing agent. The reasons are related to the possibility of processing the material at higher temperatures compared with pure carbon dioxide and the use of higher pressures and higher pressure drop rates that favor the formation of a higher number of cells, thus leading to a structures characterized by cells of smaller size.

Fig. 5 reports the SEM micrographs of the TZ foams prepared with 80 to 20 N_2 - CO_2 vol.% blowing gas mixture at $P_{sat} = 180$ bar, PDR = 700 bar/s and different T_F from 44 to

$100^\circ C$ (#5 to #11). Due to the wide foaming temperature range, it is possible to obtain foams with different morphologies and densities. At lower temperatures (Fig. 5A), the TZ foam is characterized by small cells separated by thick walls, with density of $0.65 g/cm^3$. By increasing the T_F , the matrix stiffness decreased and density decreases accordingly, (Fig. 5B and Fig. 5C) down to $0.1 g/cm^3$. At higher temperatures, Fig. 5D, TZ foams showed a slightly decreases in pores dimension. The effect of T_F on cell size is shown in Fig. 6, where is seen that at T_F of $44^\circ C$ the D_C is $14 \mu m$ and increases to $23 \mu m$ up to a T_F of $70^\circ C$. The maximum value of D_C ($55 \mu m$) was achieved with a $T_F = 76^\circ C$. By further increasing the T_F ($86^\circ C$ to $100^\circ C$) a “shrinking phenomenon” was observed, with an apparent reduction of D_C to $15 \mu m$ (Fig. 6, #11). It is believed that the size of the cells decreased with increasing T_F because of excesses gas diffusion through the cell walls. The same behavior was observed when using a mixture 50 to 50 N_2 - CO_2 vol.% but at lower temperatures ($T_F = 70^\circ C$, #4, SEM not reported) due to the higher content of car-

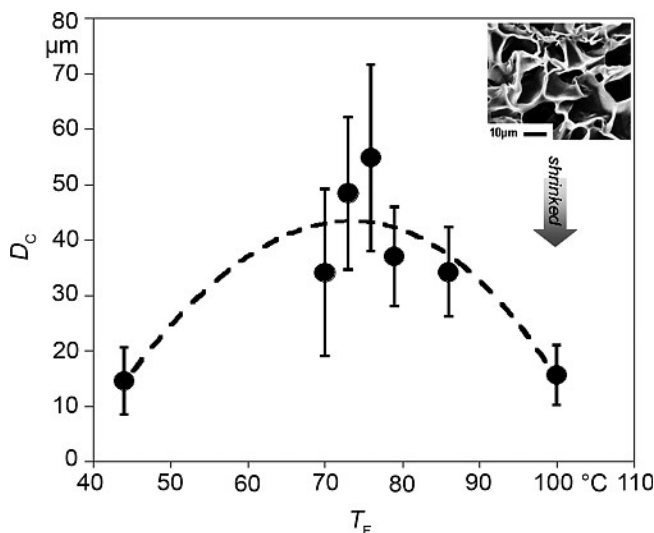


Fig. 6. Effect of T_F on D_C for TZ foamed with N_2 - CO_2 80-20 vol.% at $P_{sat} = 180$ bar and PDR = 700 bar/s

Test number	N_2 - CO_2 vol.%	P_{sat} bar	T_F $^\circ C$	PDR bar/s
13	0-100	60	50	250
14	0-100	60	60	250
15	0-100	60	70	250
16	50-50	150	100	250
17	80-20	180	44	700
18	80-20	180	70	700
19	80-20	180	80	700
20	80-20	180	87	700
21	80-20	180	100	700
22	80-20	180	120	700
23	80-20	180	140	700
24	80-20	180	100	250

Table 4. Experimental conditions used for the preparation of TG foams

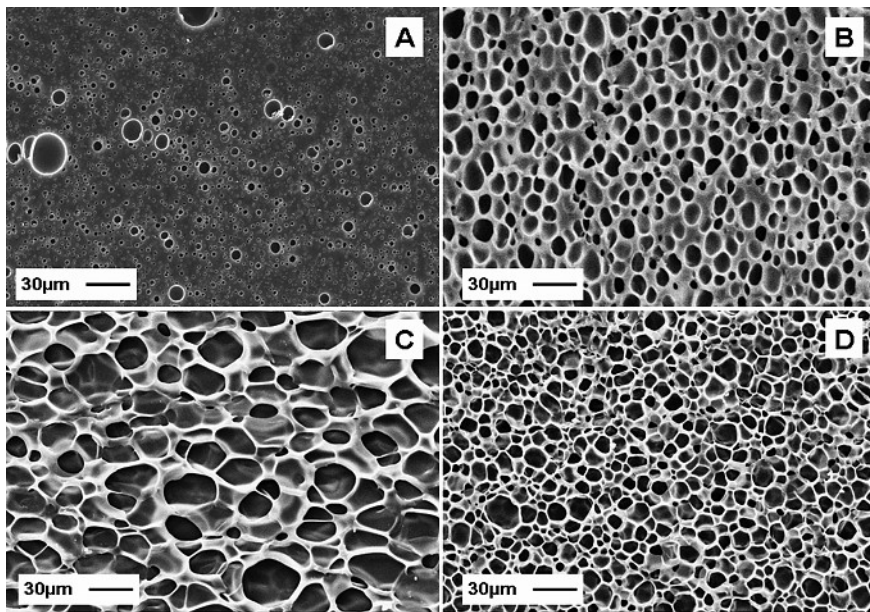


Fig. 7. SEM micrographs of TG foamed with N_2-CO_2 80-20 vol.% at $P_{sat} = 180$ bar, $PDR = 700$ bar/s and $T_F = 44$ °C (A), 80 °C (B), 120 °C (C) and 140 °C (D)

bon dioxide in the gas blowing mixture. In more detail, with the increase of CO_2 content the processing temperatures shift downward, because of the enhanced plasticizing effect. In summary, the optimal foaming conditions for zein thermoplasti-

cized with 25 wt.% PEG 400 are: 80 to 20 N_2-CO_2 vol.% blowing agent at $T_F = 70$ to 90 °C, $P_{sat} = 150$ to 200 bar, which resulted in foams characterized by pores with $D_C = 20$ to 40 μm and densities equal to 0.1 g/cm³.

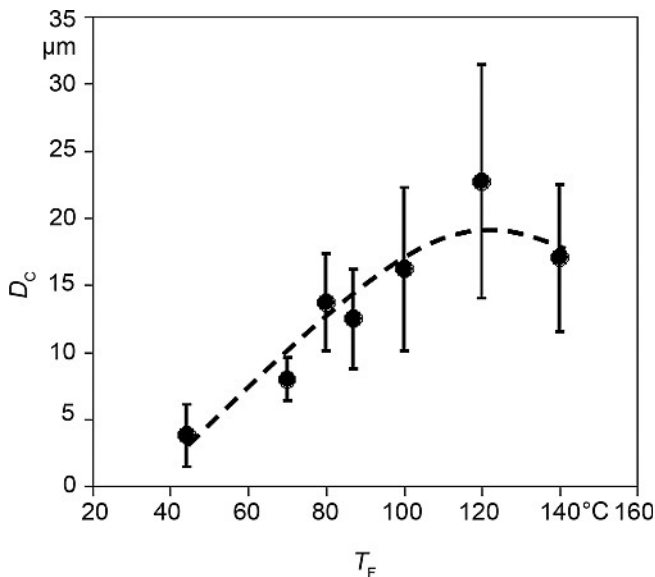


Fig. 8. Effect of T_F on D_C for TG foamed with N_2-CO_2 80-20 vol.% at $P_{sat} = 180$ bar and $PDR = 700$ bar/s

3.4.2 Thermoplastic Gelatin

Table 4 reports the testing conditions used for TG foaming. The effect of T_F on the microstructures of TG foams (#17 to #23) is shown in Fig. 7. The reduction of the matrix stiffness associated to the increase of T_F resulted in foams with lower densities. In particular, as shown in Fig. 7A, at $T_F = 44$ °C (#17), foaming is limited and only tiny pores can be observed. By increasing the T_F to 80 °C and higher, uniform distributions of pores characterized by increased cell dimension could be observed (Fig. 7B and C), with foam densities in the range 0.7 g/cm³ to 0.55 g/cm³, respectively. When the TG was foamed at higher temperatures (e. g. $T_F = 140$ °C in Fig. 7D) degradation (browning) was evident (in fact, TGA results showed initial loss of plasticizer and/or protein degradation at $T_{ons} = 221$ °C under inert atmosphere). The variation of D_C with T_F is shown in Fig. 8. D_C increased from 3 μm at $T_F = 44$ °C to 16 μm at $T_F = 100$ °C and reached the maximum value at $T_F = 120$ °C (25 μm).

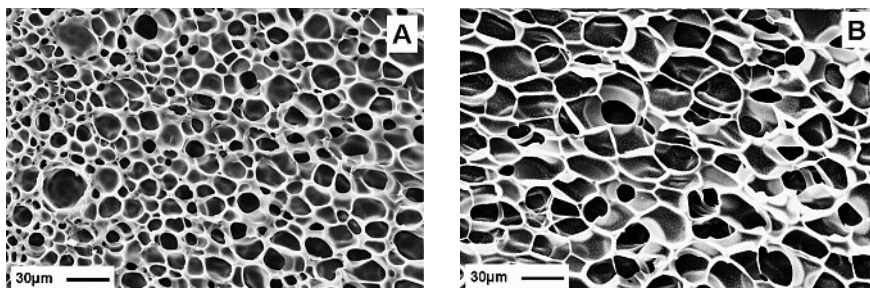


Fig. 9. SEM micrographs of TG foamed with: N_2-CO_2 80-20 vol.% at $P_{sat} = 180$ bar, $T_F = 100$ °C and $PDR = 700$ bar/s (A); 50-50 N_2-CO_2 vol.% at $P_{sat} = 120$ bar, $T_F = 100$ °C and $PDR = 250$ bar/s (B)

With the aim of modulating the morphology of TG foams, the effect of a) the blowing mixture composition and b) the pressure drop rate (PDR) was investigated on samples prepared at $T_F = 100\text{ }^\circ\text{C}$ (Fig. 9). A significant increase of the average cell size from $16\text{ }\mu\text{m}$ (Fig. 9A, #24) to $55\text{ }\mu\text{m}$ (Fig. 9B, #16) was obtained by raising the carbon dioxide concentration from 20 % to 50 % in the gas mixture while no remarkable effects were observed when decreasing PDR from 700 to 250 bar/s.

4 Conclusions

Natural polymers have much more complex molecular structures and lower thermal stability than common petrochemical based polymers and, for these reasons, they are mainly processed by using solvent based technologies. However, the preparation of thermoplastic bio-based materials by employing adequate plasticizers and mixing conditions allows the development of materials that can be processed by conventional thermoplastic technologies. Throughout this work it has been shown that selected zein/plasticizer and gelatin/plasticizer mixtures were suitable to be processed via gas foaming like common synthetic polymers, resulting in foams with fine morphologies and low densities. In particular, morphologies of foams prepared from thermoplastic zein and gelatin, utilized in this work, were mainly dependent on blowing agent composition and foaming temperature. The cellular morphology was finely modulated by controlling these basic foaming parameters and foams with density as low as 0.1 g/cm^3 and mean cell diameter of $10\text{ }\mu\text{m}$ were obtained.

References

Azranitoyannis, I. S., et al., "Chitosan and Gelatin Based Edible Films: State Diagrams, Mechanical and permeation properties", *Carb. Polym.*, **37**, 371–382 (1998)

Batterman-Azcona, S. J., et al., "Effect of Specific Mechanical Energy on Protein Bodies and α -Zeins in Corn Flour Extrudates", *Cer. Chem.*, **76**, 316–320 (1999)

Beck, M. I., et al., "Physico-Chemical Characterization of Zein as a Film Coating Polymer. A Direct Comparison with Ethyl Cellulose", *Int. J. Pharm.*, **141**, 137–150 (1996)

Bigi, A., et al., "Relationship between Triple-Helix Content and Mechanical properties of Gelatin Films", *Biomat.*, **25**, 5675–5680 (2004)

Brouillet-Fourmann, S., et al., "Evolution of Interactions between Water and Native Corn starch as a Function of Moisture Content", *J. Appl. Polym. Sci.*, **86**, 2860–2865 (2002)

Cuq, B., et al., "Thermoplastic Properties of Fish Myofibrillar Proteins: Application to Biopackaging Fabrication", *Polym.*, **38**, 4071–4078 (1997)

Cuq, B., et al., "Proteins as Agricultural Biopolymers for Packaging Production", *Cer. Chem.*, **75**, 1–9 (1998)

de Cindio, B., et al., "Filled Snack Production by Coextrusion-Cooking: 1. Rheological Modelling of the Process", *J. Food Eng.*, **52**, 67–74 (2002a)

de Cindio, B., et al., "Filled Snack Production by Coextrusion-Cooking: 2. Effect of Processing on Cereal Mixtures", *J. Food Eng.*, **54**, 63–73 (2002b)

de Graaf, L. A., "Denaturation of Proteins from a Non-Food Perspective", *J. Biotech.*, **79**, 299–306 (2000)

Di Maio, E., et al., "Structure Optimization of Polycaprolactone Foams by Using Mixtures of CO_2 and N_2 as Blowing agent", *Polym. Eng. Sci.*, **45**, 432–441 (2005)

Donhowe, I. G., Fennema, O., "The Effects of Plasticizers on Crystallinity, Permeability, and Mechanical properties of Methylcellulose Films", *J. Food Process. Preserv.*, **17**, 247–257 (1993)

Glenn, G. M., et al., "Effect of Starch, Fiber and CaCO_3 on the Properties of Foams Made by a Baking Process", *Ind. Crops Prod.*, **14**, 201–212 (2001)

Goof, H. D., et al., "A Study of Fat and Air Structures in Ice Cream", *Int. Dairy J.*, **9**, 817–829 (1999)

Ha, T. T., Padua, G. W., "Effect of Extrusion Processing on Properties of Zein-Fatty Acids Sheets", *Trans. ASAE*, **44**, 1223–1228 (2001)

Hagolle, N., et al., "Study of the Stability of Egg White Protein-based Foams: Effect of Heating Protein Solution", *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 1245–1252 (2000)

Han, X., et al., "Extrusion of Polystyrene Nanocomposite Foams with Supercritical CO_2 ", *Polym. Eng. Sci.*, **43**, 1261–1275 (2003)

Hwang, Y. D., Cha, S. W., "The Relationship between Gas Absorption and the Glass Transition Temperature in a Batch Microcellular Foaming Process", *Polym. Test.*, **21**, 269–275 (2002)

Jongjareonrak, A., et al., "Effect of Plasticizers on the Properties of Edible Films from Skin Gelatine of Bigeye Snapper and Brownstripe Red Snapper", *Eur. Food Res. Technol.*, **222**, 229–235 (2006)

Kumar, V., Suh, N. P., "A Process for Making Microcellular Thermoplastic Parts", *Polym. Eng. Sci.*, **30**, 1323–1329 (1990)

Lai, H.-M., et al., "Properties and Microstructure of Zein Sheets Plasticized with Palmitic and Stearic Acids", *Cer. Chem.*, **74**, 83–90 (1997)

Lai, H.-M., Padua, G. W., "Water Vapour Barrier of Zein Films Plasticized with Oleic Acid", *Cereal Chem.*, **75**, 194–199 (1998)

Lai, H.-M., et al., "Properties and Microstructure of Zein Sheets Plasticized with Palmitic and Stearic Acids", *Cer. Chem.*, **74**, 83–90 (1997)

Lawton, J. W., "Zein: A History of Processing and Use", *Cer. Chem.*, **79**, 1–18 (2002)

Magoshi, J., et al., "Structure and Physical Properties of Seed Proteins, Glass Transition and Crystallization of Zein Protein from Corn", *J. Appl. Polym. Sci.*, **45**, 2043–2048 (1992)

Marrazzo, C., et al., "Process-structure Relationships in PCL Foaming", accepted on *J. Cell. Plast.* (2007)

Masco-Arriola M. L., "Preparation and Physical Properties of Zein Based Films", MS. Thesis University of Illinois, Urbana-Champaign, IL (1996)

Momany, F. A., et al., "Structural Characterization of α -Zein", *J. Agri. Food Chem.*, **54**, 543–547 (2006)

Padua, G. W. et al., "Chapter 2 Formation and Properties of Corn Zein Films and Coatings", in *Protein-Based Films and Coatings*, Gennadios, A. (Ed.), CRC Press LLC, Boca Raton, p. 43–67 (2002)

Park, C. B., et al., "Effect of the Pressure Drop Rate on Cell Nucleation in continuous Processing of Microcellular Polymer", *Polym. Eng. Sci.*, **35**, 432–440 (1995)

Pommet, M., et al., "Thermoplastic Processing of Protein-based Bioplastics: Chemical Engineering aspects of Mixing, Extrusion and Hot Molding", *Macrom. Symp.*, **197**, 207–218 (2003)

Redl, A., et al., "Rheological Properties of Gluten Plasticized with Glycerol: Dependence on Temperature, Glycerol Content and Mixing Conditions", *Rheol. ACTA*, **38**, 311–320 (1999)

Redl, A., et al., "Extrusion of Wheat Gluten Plasticized with Glycerol: Influence of Process Conditions on Flow Behavior, Rheological Properties, and Molecular Size Distribution", *Cer. Chem.*, **76**, 361–370 (1999)

Selling, G. W., et al., "Effect of Water and Tri(ethylene)glycol on the Rheological Properties of Zein", *Polym.*, **45**, 4249–4255 (2004)

Shogren, R. L., et al., "Baked Starch Foams: Starch Modifications and Additives Improve Process Parameters, Structure and Properties", *Ind. Crops Prod.*, **16**, 69–79 (2002)

Shukla, R., Cheryan, M., "Zein: The Industrial Protein from Corn", *Ind. Crops Prod.*, **13**, 171–192 (2001)

Sothornvit, R., Krochta, J. M., "Plasticizer Effect on Mechanical Properties of β -Lactoglobulin Films". *J. Food Eng.*, **50**, 149–155 (2001)

Thiéband, M., Dumay, E., Cheftel, C. C., "Influence of Process Variables on the Characteristics of a High Moisture Fish Soy Protein

- Mix Texturized by Extrusion Cooking”, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **29**, 526–535 (1996)
- Tillekeratne, M., Easteal, A. J., “Modification of Zein Films by Incorporation of Poly(ethylene glycol)s”, *Polym. Int.*, **49**, 127–134 (2000)
- U.S. Patent 6635 206 (2003) Padua, G. W., Rakotonirainy, A. M., Ha, T. T.
- van Soest, J. J. G., Borger, D. B., “Structure and Properties of Compression-Molded Thermoplastic Starch Materials from Normal and High Amylose maize Starches”, *J. Appl. Polym. Sci.*, **64**, 631–644 (1997)
- Vanin, F. M., et al., “Effects of Plasticizers and Their Concentrations on Thermal and Functional Properties of Gelatin-Based Films”, *Food Hydroc.*, **19**, 899–907 (2005)
- Vaz, C. M., et al., “Casein and Soybean Protein-based Thermoplastics and Composites as Alternative Biodegradable Polymers for Biomedical Applications”, *J. Biom. Mat. Res.*, **65A**, 60–70 (2003)
- Wang, Y., et al., “Effects of Processing on the Structure of Zein/Oleic Acid Films Investigated by X-Ray Diffraction”, *Macr. Biosci.*, **5**, 1200–1208 (2005)
- Wang, Y., Rakotonirainy, A. M., Padua, G. W., “Thermal Behavior of Zein-based Biodegradable Films”, *Starch*, **55**, 25–29 (2003)
- Wiedmann, W., Strobel, E., “Compounding of Thermoplastic Starch with Twin-Screw Extruders”, *Starch*, **43**, 138–145 (1991)
- Willet, J. L., Shogren, R. L., “Processing and Properties of Extruded Starch/Polymer Foams”, *Polym.*, **43**, 5935–5947 (2002)
- Yu, J., Gao, J., “Biodegradable Thermoplastic Starch”, *J. Appl. Polym. Sci.*, **62**, 1491–1494 (1996)
- Zheng, J. P., et al., “Gelatin/Montmorillonite Hybrid Nanocomposite. I. Preparation and properties”, *J. Appl. Polym. Sci.*, **86**, 1189–1194 (2002)

Acknowledgements

Authors wish to thank Mr. Mauro Politano for experimental support on thermoplasticization of gelatin. The work on thermoplastic gelatin was financed by CRdC “New Technologies”, (Regione Campania) while the work on thermoplastic zein by the EU project Enviropak (INCO-DEV ICA4-CT-2001-10062).

Date received: May 2, 2007

Date accepted: July 25, 2007

Bibliography
DOI 10.3139/217.2065
Intern. Polymer Processing
XXII (2007) 5; page ■–■
© Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG
ISSN 0930-777X

You will find the article and additional material by entering the document number **IPP2065** on our website at www.polymer-process.com