

RAUL FUJIHARA

**Efeito da adição de micro e nanopartículas de carbonato de
cálcio e da aplicação de ultrassom nas propriedades de
filmes produzidos à base de zeína**

São José do Rio Preto
2017

RAUL FUJIHARA

Efeito da adição de micro e nanopartículas de carbonato de cálcio e da aplicação de ultrassom nas propriedades de filmes produzidos à base de zeína

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Engenharia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Lopes Filho

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a Crislene Barbosa de Almeida

Bolsa: CAPES

São José do Rio Preto
2017

Fujihara, Raul.

Efeito da adição de micro e nanopartículas de carbonato de cálcio e da aplicação de ultrassom nas propriedades de filmes produzidos à base de zeína / Raul Fujihara. -- São José do Rio Preto, 2017
123 f. : il., tabs.

Orientador: José Francisco Lopes Filho

Coorientador: Crislene Barbosa de Almeida

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Biofilme. 3. Zeína. 4. Carbonato de cálcio. 5. Nanopartículas. 6. Alimentos - Embalagens. 7. Ultrassom. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 547.962.7

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

RAUL FUJIHARA

Efeito da adição de micro e nanopartículas de carbonato de cálcio e da aplicação de ultrassom nas propriedades de filmes produzidos à base de zeína

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Engenharia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. José Francisco Lopes Filho
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Rubens Bernardes Filho
EMBRAPA INSTRUMENTAÇÃO – São Carlos

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Mauro
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
22 de maio de 2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por abençoar meu caminho todos os dias.

Aos meus pais, Paulo e Marina, e meu irmão, André, por sempre me incentivarem a estudar com dedicação e perseverança durante toda a vida.

Ao Prof. Dr. José Francisco Lopes Filho pela oportunidade de uma nova experiência, confiança, apoio, dedicação e orientação.

À Prof^a. Dr^a. Crislene Barbosa de Almeida pelos apoios, ensinamentos e sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Rubens Bernardes Filho pelas sugestões e correções precisas na ocasião da participação como membro da banca de defesa da dissertação.

À Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Mauro pelas valorosas sugestões na ocasião da participação como membro da banca de defesa e da qualificação deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Vânia Regina Nicoletti Telis pelas críticas e sugestões que muito contribuíram para o enriquecimento desta pesquisa na ocasião da qualificação deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Marcia Perez dos Santos Cabrera (UNESP, São José do Rio Preto) agradeço pela colaboração na execução das análises de tamanho de partícula do CaCO_3 .

Ao Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio (UNESP, São José do Rio Preto) e ao Prof. Dr. Mauricio Boscolo (UNESP, São José do Rio Preto) agradeço por toda atenção e colaboração na execução das análises de infravermelho (FTIR da zeína em pó e FTIR-ATR dos filmes de zeína).

À Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes (UNESP, São José do Rio Preto) e à técnica Glenda Gonçalves de Souza (Unesp, Presidente Prudente) agradeço por toda atenção e colaboração na execução das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao técnico Luiz Roberto Falleiros Júnior (UNESP, São José do Rio Preto) agradeço por toda atenção e colaboração na execução das análises de Microscopia ótica.

À técnica Alana Lisbôa da Silveira (UNESP, São José do Rio Preto) agradeço por toda atenção e colaboração na execução das análises mecânicas.

Aos amigos e professores deste Instituto pela orientação e aos funcionários Suely, Luiz, Ginaldo, Tânia, Natália, Alex, Silvia, Rosemar, Felipe e Aliria pelo apoio e ajuda durante a execução das etapas deste trabalho.

Aos meus amigos que muito me ajudaram na execução e discussão das análises: Mariana, Laís, Luzilene, Gisandro, Olavo, Pedro e Tayhana.

Aos meus amigos de república que direta e indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho: Erick e Angélica, muito sucesso.

Aos amigos da Pós-Graduação e da universidade: Wellington, Arturo, Mari, Elisa, Tiago, Yara, Marília, Luciene, Liliane, Ana Maria, Ana Paula, Yuri, Ezequiel, Carol (zinha), Carol, Manoel, Marília, Flávia, Márcia, Jéssica, Mariana, Mirian, Poliana, Kamila, Harvey, Diana, Danielle, Tuany, Gisele Fernanda, Lucas, Iasnaia, Patricia, Giulliana, Lilian, Liara, Lara, Taís, Mônica, Dayane, Ana, Roberto (Pão), Alexandre (Cris), Levi, Geovania, Bruna e Aline. Obrigado pelas risadas, companheirismo, incentivo, amizade, enfim, sem vocês teria sido muito mais difícil.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço à empresa Lagos Indústria Química LTDA pelo fornecimento do nanocarbonato de cálcio que foi essencial para a realização da pesquisa.

Finalmente, agradeço à Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

RESUMO

A sustentabilidade levou ao desenvolvimento de materiais biodegradáveis no uso de embalagens, as quais são utilizadas para manter a integridade dos produtos alimentícios. As zeínas são proteínas do milho com taxas de polimerização capazes de formar filmes comestíveis, contudo, os filmes de zeína são rígidos e precisam da adição de plastificantes que alteram as cadeias poliméricas e as propriedades funcionais da matriz. A adição de partículas é utilizada para fortalecer e melhorar as propriedades funcionais dos compósitos. Neste trabalho foram investigados filmes de zeína em um esquema fatorial 4x2. O primeiro fator corresponde à concentração de carbonato de cálcio (CaCO_3) adicionado (0, 1, 2 e 3% em massa de zeína). O segundo fator corresponde a 2 variáveis categóricas: agitação mecânica e aplicação de ultrassom. As partículas de CaCO_3 foram caracterizadas por meio de análises de difração de raios X de alto ângulo (WAXS), espectroscopia no infravermelho (FTIR) e tamanho de partícula. Nos filmes foram realizadas análises de WAXS, FTIR, microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura (MEV), espessura, opacidade, solubilidade, permeabilidade ao vapor d'água (PVA) e propriedades mecânicas (alongação, limite de resistência à tração e módulo de elasticidade). As partículas de CaCO_3 foram identificadas como cristais de calcita com diâmetro médio de $32,6 \pm 4,6$ nm, contudo, a dispersão de CaCO_3 em solução aquosa de álcool 95% (v/v) formou agregados de 968 nm (agitação mecânica à 650 rpm) que são rompidos com a aplicação do ultrassom (400W) em micro e nanopartículas com tamanhos variados (diâmetros médios de $476,9 \pm 32,0$ nm e $115,18 \pm 18,84$ nm). A adição de CaCO_3 alterou a área amorfa dos filmes e as interações entre os componentes da matriz polimérica. Os filmes com adição de CaCO_3 apresentaram agregados, com excessão do

filme de 1% de CaCO_3 com ultrassom. A espessura e a PVA não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$). A opacidade diminuiu de 6~ até 12~ (Abs.mm^{-1}) e a solubilidade aumentou de 7~ até 11~ (%) nos filmes com adição de CaCO_3 e não tiveram influência significativa da agitação. A porcentagem de alongação e o módulo de elasticidade dos filmes foram significativamente melhorados com a adição de 1 e 2% de CaCO_3 e influenciados pela agitação, entretanto os filmes com 3% de CaCO_3 apresentaram características de um material rígido. Este trabalho demonstrou que o ultrassom pode melhorar a dispersão de partículas e que o CaCO_3 pode produzir filmes com características promissoras para diversas aplicações.

Palavras-chave: Filmes biodegradáveis. Filmes de zeína. Ultrassom. Carbonato de Cálcio. CaCO_3 .

ABSTRACT

Sustainability led the development of biodegradable materials in the use of packaging, which are used to maintain the integrity of food products. Zeins are protein's maize with polymerization rates capable of forming edible films. Nevertheless, the zein films are brittle and require the addition of plasticizers that modify the polymer chains and the matrix functional properties. Particles addition is used to reinforce and improve the functional properties of the composites. In this work, zein films were investigated in a factorial design 4x2. The first factor is related to the calcium carbonate (CaCO_3) concentration added (0, 1, 2 and 3% in zein mass) and the second factor considered 2 categoricals variables: mechanic agitation and ultrasound application. The CaCO_3 particles were characterized through wide angle x-ray scattering (WAXS), infrared spectroscopy (FTIR) and size particle analysis. The films were characterized through WAXS, FTIR, optical microscopy, scanning electron microscopy (SEM), thickness, opacity, solubility, water vapour permeability and mechanical properties (elongation, tensile strength and Young's modulus). The CaCO_3 particles were identified as calcite crystals with a medium diameter of 32,6 nm, although the CaCO_3 dispersion in 95% (v/v) aqueous ethanol solution formed aggregates of 968 nm (mechanical agitation at 650 rpm) which were decreased through ultrasound application (400W) to micro and nanoparticles of different sizes (medium diameters of $476,9 \pm 32,0$ nm and $115,18 \pm 18,84$ nm). CaCO_3 addition modified the amorphous phase of the films and the interactions compounds of the matrix. The films showed aggregates with the exception of the film with 1% of CaCO_3 and ultrasound. Thickness and WVP did not present significant differences ($p < 0,05$). Opacity decreased of 6~ to 12~ (Abs.mm^{-1}) and solubility increased of 7~ to 11~ (%) in the films with CaCO_3 addition and had no significant influence of the agitation.

Elongation and Young's modulus of the films were significantly improved with the addition of 1 and 2% of CaCO_3 and influenced by the agitation, although the 3% CaCO_3 films showed stiff materials characteristics. This work demonstrated that ultrasound can improve the particles dispersion and the CaCO_3 can produce films with promising properties for various applications.

Keywords: Biodegradable films. Zein films. Ultrasound. Calcium carbonate. CaCO_3 .

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Quadro 1 - Propriedades gerais da α -zeína.....	24
Figura 1 - Grão de milho e suas partes.....	20
Figura 2 - Extração da zeína segundo Carter e Reck (1970).....	20
Figura 3 - Estrutura helicoidal das zeínas Z19 e Z22 (peso molecular aparente de 19 e 22 kD, respectivamente).	21
Figura 4 - a) Estrutura helicoidal das proteínas projetadas com o eixo ortogonal helicoidal com o plano da figura; b) arranjo das proteínas pelo empilhamento dos planos com os eixos cilíndricos alinhados.	23
Figura 5 - Diagrama do modelo estrutural das zeínas.	23
Figura 6 - Mecânismo de partículas de reforço rígidas.	28
Figura 7 - Sistema de eixos coordenados do índice de Miller de uma célula unitária.....	29
Figura 8 - Diagrama da modificação da superfície do CaCO_3 com ácido oleico.....	32
Figura 9 - Fluxograma dos filmes de zeína sem CaCO_3	36
Figura 10 - a) Agitador Mecânico TE-139 (TECNAL) com a pá de agitação; b) Ultrassom UP 400S (HIELSCHER) com a sonda de ultrassom.	37
Figura 11 - Fluxograma de produção dos filmes de zeína adicionados de micro e nanopartículas de CaCO_3	38
Figura 12 - Diagrama de tingimento com solução de Xylidine Ponceau.....	41
Figura 13 - Análise das propriedades mecânicas TA.XT PLUS.....	44
Figura 14 - Padrões de difração de raio-X em alto ângulo (WAXS) das partículas de CaCO_3	47
Figura 15 - Espectrogramas do reagente e do padrão de CaCO_3	49
Figura 16 - Distribuição dos tamanhos das partículas de CaCO_3 dispersas em uma solução aquosa de 95% (v/v) etanol e água em	

tipos de agitação e tempos diferentes: 30min/Mec, 15min/Ult e 30min/Ult, 30min/Mec ₂₄ , 15min/Ult ₂₄ e 30min/Ult ₂₄	51
Figura 17 - Filme de zeína.	53
Figura 18 - Difratoogramas dos filmes de zeína adicionados com CaCO ₃ em diferentes concentrações em diferentes processos de agitação: a) agitação mecânica; b) aplicação de ultrassom; c) agitação mecânica e aplicação de ultrassom.....	55
Figura 19 - Espectros do FTIR-ATR dos filmes à base de zeína adicionados com CaCO ₃ em diferentes concentrações em diferentes processos de agitação: a) agitação mecânica; b) aplicação de ultrassom; c) agitação mecânica e aplicação de ultrassom.	61
Figura 20 - Microscopia Óptica dos filmes à base de zeína adicionados de CaCO ₃ em diferentes concentrações e diferentes tipos de agitação: a) Mec/zeína; b) Mec/1%CaCO ₃ ; c) Mec/2% CaCO ₃ ; d) Mec/3%CaCO ₃ ; e) Ult/zeína; f) Ult/1%CaCO ₃ ; g) Ult/2% CaCO ₃ ; h) Ult/3%CaCO ₃	63
Figura 21 - Microscopia eletrônica de varredura da superfície dos filmes à base de zeína adicionados de CaCO ₃ em diferentes concentrações e diferentes tipos de agitação com aumento de 5000x: a) Mec/zeína; b) Mec/1%CaCO ₃ ; c) Mec/2%CaCO ₃ ; d) Mec/3%CaCO ₃ ; e) Ult/zeína; f) Ult/1%CaCO ₃ ; g) Ult/2%CaCO ₃ ; h) Ult/3%CaCO ₃	66
Figura 22 - Microscopia eletrônica de varredura da superfície seccionada dos filmes à base de zeína adicionados de CaCO ₃ em diferentes concentrações e diferentes tipos de agitação com aumento de 1000x: a) Mec/zeína; b) Mec/1%CaCO ₃ ; c) Mec/2% CaCO ₃ ; d) Mec/3%CaCO ₃ ; e) Ult/zeína; f) Ult/1%CaCO ₃ ; g) Ult/2% CaCO ₃ ; h) Ult/3%CaCO ₃	68
Figura 23 - Gráfico do efeito do aumento contínuo da concentração de CaCO ₃ na opacidade dos filmes.	73

Figura 24 - Gráfico do efeito do aumento contínuo da concentração de CaCO_3 na solubilidade dos filmes.....	75
Figura 25 - Gráfico dos efeitos do aumento contínuo da concentração de CaCO_3 e da agitação na elongação dos filmes.	79
Figura 26 - Gráfico do efeito do aumento contínuo da concentração de CaCO_3 sobre o limite de resistência à tração dos filmes.	81
Figura 27 - Gráfico dos efeitos e da interação do aumento contínuo da concentração de CaCO_3 e do Módulo de Young nos filmes.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Codificação das amostras de dispersão de CaCO_3 com agitação mecânica ou ultrassom.....	40
Tabela 2 - Planejamento fatorial 4x2 com tratamento aleatorizado e valores codificados dos fatores.....	45
Tabela 3 - Picos de difração, face do cristal e espaço d do CaCO_3	48
Tabela 4 - FTIR-ATR de diferentes morfologias do CaCO_3	49
Tabela 5 - Diâmetro médio do CaCO_3 disperso em solução aquosa de 95% (v/v) etanol e água. A, B, C, a Os dados indicados por letras diferentes na mesma coluna representa uma diferença significativa ($p < 0.05$).	51
Tabela 6 - Espaço d dos filmes de zeína adicionados com CaCO_3 (0, 1, 2 e 3%) em diferentes sistemas de agitação (mecânica e ultrassom).	57
Tabela 7 - Cristalinidade relativa dos filmes de zeína com CaCO_3 (0, 1, 2 e 3%) em diferentes sistemas de agitação (mecânica e ultrassom).	58
Tabela 8 - Picos de FTIR-ATR de diferentes morfologias do CaCO_3 . .	60
Tabela 9 - Resultados de Espessura (mm), Opacidade (Abs mm^{-1}), Solubilidade (%) e PVA (g/m.s.Pa) dos filmes.	71
Tabela 10 - Nível de significância dos efeitos principais e das interações segundo a análise de variância (ANOVA) da Espessura (mm), Opacidade (Abs mm^{-1}), Solubilidade (%) e PVA (g/m.s.Pa) dos filmes.	71
Tabela 11 - Resultados de Elongação na Ruptura (%), Limite de Resistência à Tração (MPa) e Módulo de Young (MPa) dos filmes.....	78
Tabela 12 - Nível de significância dos efeitos principais e das interações segundo a análise de variância (ANOVA) das propriedades mecânicas dos filmes.....	78

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	OBJETIVOS	18
2.1.	OBJETIVO GERAL	18
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3.	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1.	MILHO	19
3.2.	ZEÍNAS	21
3.3.	FILMES BIODEGRADÁVEIS DE ZEÍNA	25
3.4.	NANOCOMPÓSITOS	27
3.5.	CARBONATO DE CÁLCIO (CaCO_3)	31
3.6.	ULTRASSOM EM PROCESSOS ALIMENTÍCIOS	33
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1.	MATERIAIS	35
4.2.	MÉTODOS	35
4.2.1.	Preparação dos Filmes	35
4.2.2.	Caracterização dos materiais	38
4.2.2.1.	Difração de Raios X em Alto Ângulo (WAXS)	38
4.2.2.2.	Espectroscopia no Infravermelho Acoplada à Técnica de Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)	39
4.2.2.3.	Tamanho de Partícula	39
4.2.2.4.	Microscopia Óptica	40
4.2.2.5.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	41
4.2.2.6.	Espessura	42
4.2.2.7.	Transparência / Opacidade	42
4.2.2.8.	Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)	42
4.2.2.9.	Solubilidade em água	43
4.2.2.10.	Propriedades Mecânicas	43
4.2.3.	Delineamento Experimental	44
4.2.4.	Análises estatísticas	46

5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1.	CARACTERIZAÇÃO DO CaCO_3	46
5.1.1.	WAXS do CaCO_3	47
5.1.2.	FTIR-ATR do CaCO_3	48
5.1.3.	Tamanho de Partícula do CaCO_3	50
5.2.	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	53
5.2.1.	Microestrutura	54
5.2.1.1.	WAXS dos Filmes	54
5.2.1.2.	FTIR-ATR dos Filmes	59
5.2.1.3.	Microscopia Óptica.....	62
5.2.1.4.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	65
5.2.2.	PROPRIEDADES FUNCIONAIS.....	70
5.2.2.1.	Espessura	72
5.2.2.2.	Transparência / Opacidade	72
5.2.2.3.	Solubilidade em Água	74
5.2.2.4.	Permeabilidade ao vapor d'água (PVA)	76
5.2.2.5.	Propriedades Mecânicas.....	77
6.	CONCLUSÃO	84
6.1.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	87
	REFERÊNCIAS	88
	Anexo A – Trabalho enviado ao V Simpósio de Engenharia e Ciência de Alimentos	107
	Anexo B – Lei de Bragg (d-space) e Método de Halder-Wagner.....	121

1. INTRODUÇÃO

As embalagens plásticas são itens fundamentais nas indústrias e sua principal função é manter a segurança e qualidade dos produtos, principalmente no setor de alimentos. A fabricação de embalagens plásticas utiliza matéria-prima proveniente do petróleo em consequência da facilidade e flexibilidade dos processos de produção. O desenvolvimento de materiais biodegradáveis como fontes alternativas de matéria-prima fez-se necessário na última década, devido às crescentes preocupações com a sustentabilidade. Os polímeros biodegradáveis são produzidos com materiais biológicos, podem ser utilizados como embalagens e se decompõem em CO₂, CH₄, H₂O e componentes inorgânicos pela ação de microorganismos (PEELMAN et al., 2013).

As zeínas são derivadas do milho, sendo um conjunto proteico presente no endosperma do grão de milho, pouco utilizadas e com baixa demanda. As proteínas apresentam propriedades formadoras de filmes com alta taxa de polimerização e boas propriedades de barreira (SIANG-YING; BE-JEN; YIH-MING, 2015; WEIDA; DUMONT, 2014). Elementos plastificantes são adicionados para melhorar as propriedades mecânicas dos filmes de biopolímeros e acabam por aumentar a absorção de água do material (LUPING; MIAO; JINGWEN, 2013; SILVA et al., 2016).

As propriedades dos filmes podem ser aprimoradas por meio da sonificação e adição de partículas. A aplicação de ultrassom pode diminuir o tamanho da partícula da proteína, favorecer a uniformidade da estrutura e modificar as características do filme (MARCUIZZO et al., 2010). Os aditivos de reforço podem melhorar as propriedades mecânicas e de barreira dos compósitos. O tamanho reduzido, em combinação com a maior área de superfície das nanopartículas, apresenta propriedades únicas nos filmes, as quais dependem da distribuição uniforme ao longo das cadeias do polímero (OTHMAN, 2014).

Os filmes e compósitos devem ser analisados quanto à sua microestrutura e aspectos de funcionalidade. A avaliação estrutural permite o entendimento da conformação do material, da sua estabilidade e da maior ou menor interação dos componentes com a matriz polimérica. As informações dos aspectos funcionais de opacidade/transparência, solubilidade em água, resistência mecânica, permeabilidade ao vapor de água, entre outras, permitem identificar a melhor utilização dos biomateriais e possíveis limitações no seu uso.

O desenvolvimento de materiais à base de zeína podem diversificar o mercado de grãos de milho que, em sua maioria, é destinada à ração animal, além de fornecer alternativas para materiais a base de petróleo. Assim, o presente estudo investigou a elaboração de filmes de zeína com adição de carbonato de cálcio (CaCO_3) na forma de micro e nanopartículas com aplicação de agitação ultra-sônica e mecânica com o objetivo de verificar a influência desses fatores e de sua interação sobre a matriz polimérica e determinar as propriedades funcionais dos biomateriais produzidos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Produzir, caracterizar e determinar as propriedades de filmes biodegradáveis à base de zeína adicionados de micro e nanopartículas de carbonato de cálcio (CaCO_3) aplicando agitação ultra-sônica e mecânica. Avaliar a influência desses fatores e de sua interação sobre as propriedades dos biomateriais.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar filmes à base de zeína com adição de 1%, 2% e 3% de micro e nanopartículas de carbonato de cálcio (CaCO_3) aplicando agitação ultra-sônica e mecânica.
- Identificar a estrutura básica dos compósitos produzidos.
- Avaliar os efeitos da adição de CaCO_3 , do método de agitação e da interação dos fatores sobre as propriedades funcionais de transparência / opacidade, solubilidade, permeabilidade ao vapor de água e resistência mecânica dos filmes produzidos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. MILHO

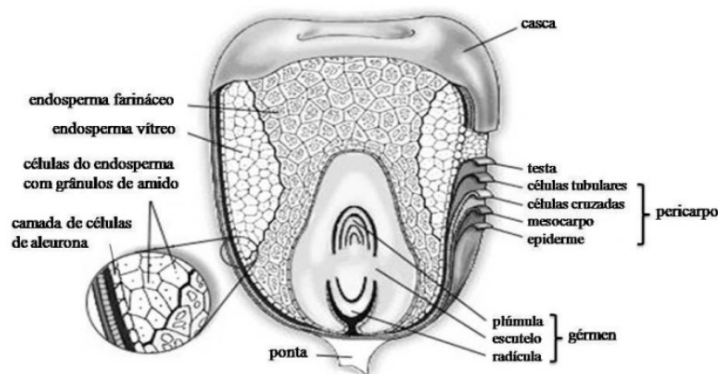
Em 2014/15 a produção mundial de milho foi de 1013,56 milhões de toneladas (USDA, 2016). O consumo humano direto do grão pode ser considerado baixo e 70% da produção é destinada ao consumo animal. O milho é o cereal predominante na dieta de suínos na maioria dos países (PRANDINI et al., 2011) e a fonte de energia preferida das aves (NADERINEJAD et al., 2016).

O milho representa uma excelente fonte de energia metabólica, sendo rico em energia, pigmentos, ácidos graxos essenciais e contém baixo teor de fibras (PANDA et al., 2012); contudo as proteínas do milho são caracterizadas como pobres em aminoácidos essenciais como a lisina e o triptofano (MIRANDA; DUARTE; GARCIA, 2012; PAES, 2006). Complementos ricos em proteínas ou aminoácidos sintéticos devem ser adicionados à dieta dos animais. A soja é a principal proteína vegetal adicionada na alimentação animal, pois possui uma composição balanceada de aminoácidos essenciais e altos teores de proteína (PRANDINI et al., 2011).

O grão de milho é constituído por quatro estruturas físicas: ponta, pericarpo (casca), gérmen e endosperma. As estruturas diferenciam-se pela disposição interna no grão e composição química, apresentados na Figura 1. O endosperma do grão de milho possui a maior concentração de zeínas, as quais formam corpos protéicos na parte externa dos grânulos de amido, em estruturas de forma circular, dentro das células do endosperma (PAES, 2006; ANDERSON; LAMSAL, 2011). Os processos de extração das zeínas do milho ocorrem por combinações químicas e auxiliadas, ou não, por tratamento enzimático. Fatores como temperatura, pH, tempo de extração e tipo de solvente influenciam na eficiência do processo (SHUKLA; CHERYAN, 2001). O aperfeiçoamento dos processos

contribuiu para controles superiores com relação a variações de pH e temperatura, diferenças na moagem e preparo do milho.

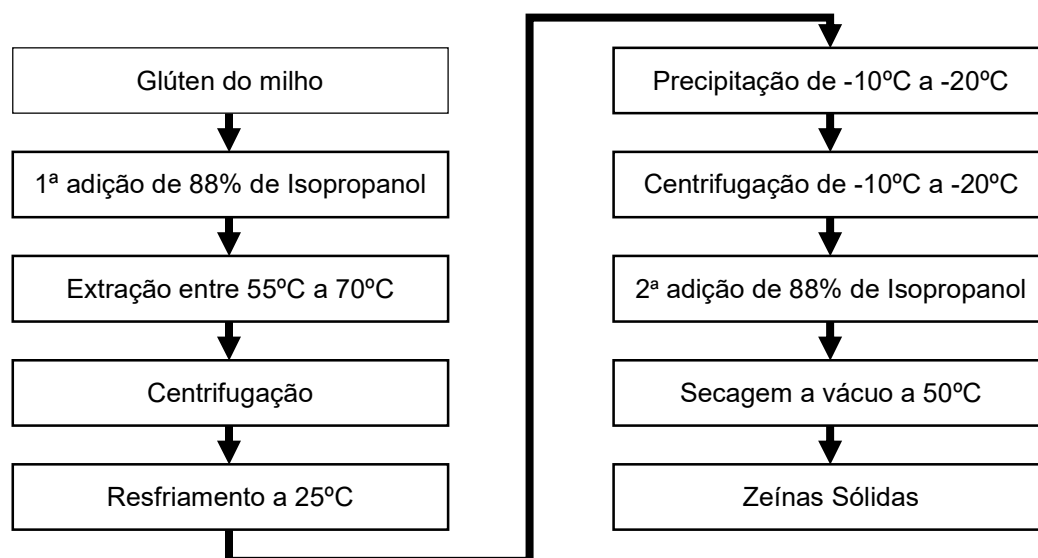
Figura 1 - Grão de milho e suas partes.



Fonte: PAPALIA; LONDERO, 2015, p. 553.

As melhorias diminuíram os custos da produção de zeínas, porém o método de extração que Carter e Reck criaram em 1970 (Figura 2) – que utiliza isopropanol à 88% como solvente em solução aquosa – ainda é empregado comercialmente para a obtenção de zeínas (PAPALIA; LONDERO, 2015).

Figura 2 - Extração da zeína segundo Carter e Reck (1970).



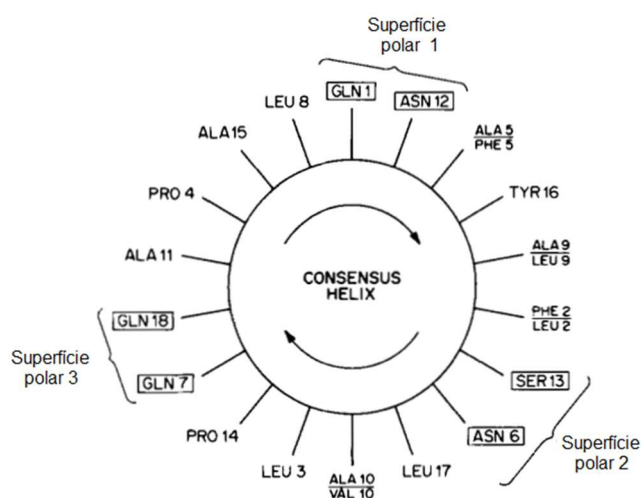
Fonte: PAPALIA; LONDERO, 2015, p. 556.

As zeínas encontradas comercialmente, que são provenientes da moagem úmida ou de produtos industrializados dos grãos de milho com formação de glúten, possuem alta pureza e qualidade. Contudo o rendimento dos métodos de extração ainda é considerado baixo, podendo ser inferior a 50% (PAPALIA; LONDERO, 2015). Segundo Lawton (2002), a baixa demanda mantém os altos custos da extração e novas aplicações industriais das proteínas poderiam influenciar o desenvolvimento de novos métodos de extração e agregar valores pouco explorados ao milho.

3.2. ZEÍNAS

As zeínas são obtidas como um co-produto da moagem úmida do milho (XINSHEN et al., 2014), que consiste em um processo de maceração com transformações químicas, bioquímicas e processos mecânicos (SINGH; ECKHOFF, 1996). Existe uma grande quantidade de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos na composição das zeínas, tais como leucina (20%), prolina (10%) e alanina (10%) e possuem um conteúdo relativamente alto (21% a 26%) de glutamina, que é um aminoácido hidrofílico (Figura 3) (ARGOS et al., 1982).

Figura 3 - Estrutura helicoidal das zeínas Z19 e Z22 (peso molecular aparente de 19 e 22 kD, respectivamente).



Fonte: ARGOS et al., 1982, p. 9988.

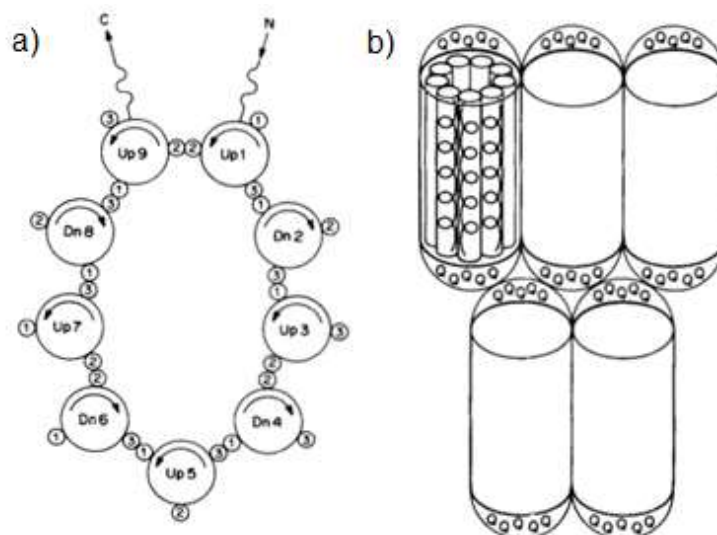
A presença de glutamina atribui uma característica anfifílica (propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas) à estrutura principal, a qual é considerada uma prolamina solúvel em soluções aquosas de etanol (CORRADINI et al., 2014). Zeínas são classificadas em três frações diferentes que são baseadas nas diferenças em solubilidade e massa molar. As frações são denominadas de α -zeína, β -zeína e γ -zeína (ESEN, 1986; WILSON, 1991).

A fração de α -zeína é obtida em grandes quantidades no processo de extração comercial (aproximadamente 80% do total de prolaminas presentes no milho) com uma massa molar no intervalo de 21 a 25 kD. A fração de β -zeína representa apenas 10% a 15% e γ -zeína, apenas 5% a 10% do total de zeínas (ESEN, 1987; SHUKLA; CHERYAN, 2001).

Argos et al. (1982) formulou um modelo da estrutura secundária das proteínas em formato helicoidal (conformação dos aminoácidos apolares e polares). Os aminoácidos apolares se unem por meio de três segmentos polares em repetições de nove hélices sequenciais (Up – propagação helicoidal na direção do terminal NH_2 - para COOH dos aminoácidos) e antiparalelas (Dn – indica a propagação na direção oposta) numa superfície molecular plana, formando uma estrutura circular (Figura 4a). O empilhamento das hélices, pelas interações polares entre os resíduos de glutamina presentes nas extremidades da cadeia, forma uma estrutura cilíndrica (Figura 4b).

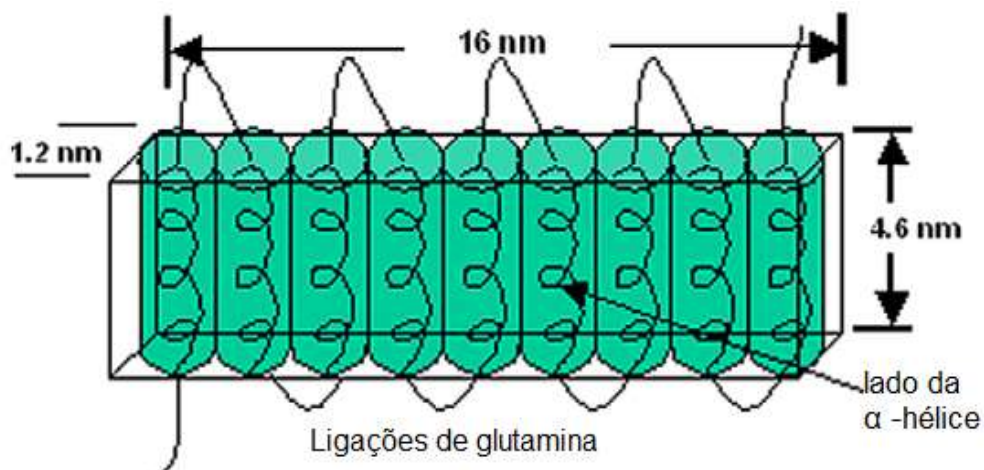
O modelo estrutural proposto por Matsushima et al. (1997) defende que as interações entre os resíduos formam um prisma retangular de 16 nm para a dimensão mais longa e 4,6 nm para cada uma das outras dimensões (Figura 5). As superfícies inferior e superior das moléculas contêm características hidrofílicas pela presença de glutamina e os lados do cilindro correspondem às superfícies das α -hélices hidrofóbicas (WANG et al. 2008).

Figura 4 - a) Estrutura helicoidal das proteínas projetadas com o eixo ortogonal helicoidal com o plano da figura; b) arranjo das proteínas pelo empilhamento dos planos com os eixos cilíndricos alinhados.



Fonte: ARGOS et al., 1982, p. 9988.

Figura 5 - Diagrama do modelo estrutural das zeínas.



Fonte: WANG et al., 2008, p. 845.

Zeínas são estáveis até 280 °C, sendo que a degradação ocorre em um processo único acima desta temperatura. Os biopolímeros de zeína possuem um comportamento viscoelástico e temperatura de transição vítrea (T_g) próximo à 165 °C, cuja adição de plastificante

modifica os valores da T_g significativamente, e apresentam uma microestrutura completamente amorfa (CORRADINI et al., 2014).

As propriedades das zeínas são dependentes da composição e da estrutura molecular em escala nanométrica (MAGOSHI et al., 1992). O Quadro 1 apresenta algumas propriedades gerais da α -zeína.

Quadro 1 - Propriedades gerais da α -zeína.

Propriedade	Descrição
Forma física	Pó amorfo
Temperatura de transição vítrea	165 °C
Ponto de degradação térmica	280 °C
Peso molecular	21-25 kDa
Grau de polimerização	210-245
Ponto isoelétrico	pH 6.2
Volume específico parcial	0.771

Fonte: CORRADINI et al., 2014, p. 22443.

A reatividade química e a solubilidade das zeínas são determinadas pelos grupos funcionais da estrutura, como as amins, amidas, hidroxilas, carboxilas e fenóis. A matriz polimérica é insolúvel em água, mas solúvel em misturas de água com álcool alifático devido à presença dos grupos de hidrocarboneto na lateral das cadeias. As zeínas são solubilizadas por meio de solventes orgânicos como etanol e isopropanol ou que contém amins, carbonilas, hidroxilas e outros grupos polares (LAWTON, 2002; CORRADINI et al., 2014). A solubilidade das zeínas em soluções alcoólicas permite o processamento de filmes, géis, microesferas e fibras (XINSHEN et al., 2014), devido ao alto grau de polimerização (PAPALIA; LONDERO, 2015).

3.3. FILMES BIODegradáveis DE ZEÍNA

Zeínas eram consideradas no passado apenas subprodutos das indústrias de processamento do milho, porém possuem muitas aplicações em potencial, como a produção de goma de mascar, fibras, fibra textil, cerâmica, tintas, cosméticos, coberturas e plásticos biodegradáveis (SHUKLA; CHERYAN, 2001).

As zeínas possuem excelentes propriedades de formação de filmes devido ao seu peso molecular, grau de polimerização e estrutura química. Os filmes são biodegradáveis e formados por meio de uma rede de ligações tridimensionais estabilizadas por interações hidrofóbicas, interações de hidrogênio e ligações de dissulfeto nas cadeias principais (GHANBARZADEH et al., 2006). Os filmes também podem ser formados com a interação de outros materiais devido ao arranjo das cadeias laterais dos aminoácidos (PALIWAL, 2014).

Os filmes de zeína são produzidos por dois processos tecnológicos principais. O primeiro consiste em um processo de solubilização por via úmida, em que uma solução de água e álcool alifático age como solvente para formação do filme. O solvente é evaporado em uma superfície inerte após a polimerização. O segundo processo, por via seca, se baseia nas propriedades termoplásticas das zeínas em condições de baixa umidade. Os filmes são formados por equipamentos de processamento como misturadores ou extrusoras (CORRADINI et al, 2014).

A superfície do filme pode ser plana ou retentora de partículas, dependendo do método de aplicação adotado. Os filmes são resistentes, brilhantes, hidrofóbicos, biodegradáveis, biocompatíveis e resistentes ao ataque microbiano (PALIWAL, 2014).

A espessura é um parâmetro para avaliar as imperfeições dos filmes e é utilizada na determinação de outras propriedades de filmes, como a opacidade, a permeância e as propriedades mecânicas. Uma espessura irregular pode indicar um material amorfo que contém cavidades e fissuras em sua microestrutura. As deformidades podem ser

causadas por temperaturas altas ou taxas de evaporação excessivas durante a etapa de formação do filme (MORAES et al., 2015).

Um dos maiores desafios na produção de filmes biodegradáveis comerciais são as propriedades funcionais requeridas na aplicação em produtos alimentícios. Os filmes a base de proteína são atrativos devido às suas propriedades de barreira a gases e, entre eles, os filmes a base de zeína apresentam melhores propriedades contra a transmissão de componentes voláteis e vapor de água. Contudo essas propriedades diminuem em ambientes de alta umidade relativa devido ao intumescimento e plastificação do polímero na presença de moléculas difusas de água (FABRA; LÓPEZ-RUBIO; LAGARON, 2014; YE-CHONG et al, 2014; SIANG-YING; BE-JEN; YIH-MING, 2015).

As propriedades mecânicas dos filmes de zeína também requerem melhorias, filmes de zeína são frágeis e apresentam grande resistência à tração e baixa flexibilidade. A utilização prática e formulação de matrizes poliméricas são frequentemente limitadas pelas propriedades mecânicas adversas (XINSHEN et al., 2014).

As propriedades funcionais dos filmes são dependentes de um grande número de fatores correlacionados, como os componentes químicos da matriz, a organização estrutural das cadeias poliméricas, o grau de cristalinidade, o grau de reticulação e a tecnologia do processamento aplicado (FABRA; LÓPEZ-RUBIO; LAGARON, 2014). A adição de componentes pode melhorar as propriedades funcionais dos filmes. Várias pesquisas têm sido feitas para estudar a influência de polióis, ácidos graxos, polissacarídeos e outros compostos na formação de compósitos com as zeínas (PENA-SERNA; LOPES-FILHO, 2013).

A adição de ácido oleico melhora as propriedades de barreira à água, já que os materiais apresentam menor solubilidade e permeabilidade ao vapor d'água. A adição de glicerol melhora a flexibilidade da matriz polimérica (JUN et al., 2015) e reduz as forças intermoleculares ao criar espaços entre as cadeias poliméricas (HUEY-

MIN; PADUA, 1998), mas também reduz as propriedades de barreira ao aumentar o volume livre entre as cadeias poliméricas (LUPING; MIAO; JINGWEN, 2013). A adição conjunta de ácido oleico e glicerol apresenta interações com efeito sinérgico e resulta em melhorias nas propriedades mecânicas de filmes de zeína, se comparado com os adicionados somente com glicerol (WEIDA; DUMONT, 2014).

A aplicação de plastificantes hidrofílicos é limitada pela permeabilidade ao vapor de água. As aplicações que exigem uma barreira mais eficiente do material, como embalagens para alimentos, devem manter níveis baixos de atividade de água nos produtos com pouca umidade. A permeabilidade ao vapor de água previne a degradação da textura e minimiza as reações deteriorativas como o crescimento microbiano (YE-CHONG et al., 2014).

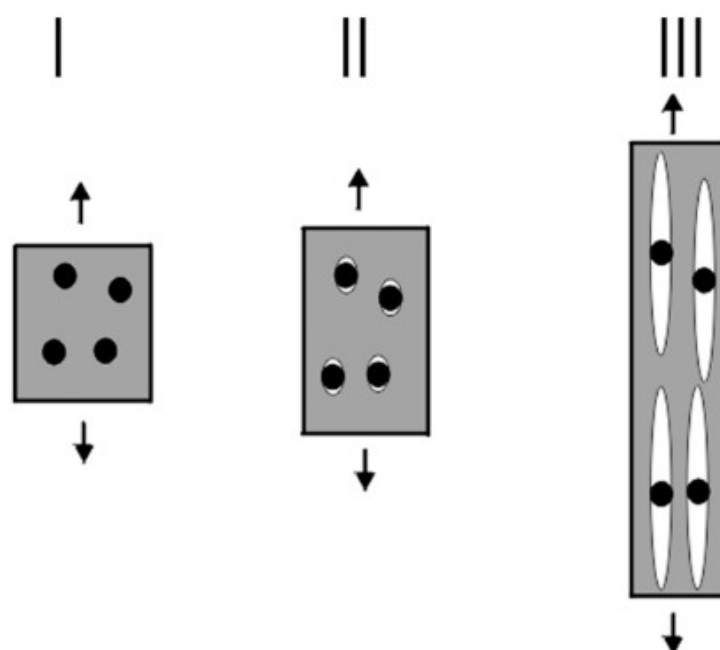
3.4. NANOCOMPÓSITOS

A adição de nanopartículas pode produzir filmes com propriedades superiores, tais como maior resistência, estabilidade térmica e oxidativa, barreira a gases e ao vapor d'água e contribuir para a aplicação de materiais de zeína em diferentes situações nas áreas de embalagem e proteção de alimentos (PAPALIA; LONDERO, 2015; FABRA; LÓPEZ-RUBIO; LAGARON, 2014).

Os filmes compósitos contêm duas ou mais fases, divididas em fase contínua e dispersa. Na maioria dos casos, um polímero é utilizado como fase contínua, ou matriz polimérica, e um material de reforço como fase dispersa. O termo nanocompósito é empregado quando ocorre a adição de pelo menos um material de reforço, orgânico ou inorgânico, com dimensões abaixo de 100 nm. As dimensões nanométricas do material de reforço proporcionam uma grande relação área por volume e superfície de atividade que pode fortalecer as características do nanocompósito (MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014).

Segundo Teixeira et al. (2005), as partículas rígidas devem atender certos requisitos para atuar como agentes de reforço, tais como: o tamanho da partícula deve ser menor que 5 μm ; a proporção adicionada deve evitar concentrações de grandes tensões e a dispersão deve ser uniforme e sem agregações ao longo da matriz polimérica; a partícula deve se desprender antes da tensão da matriz polimérica para criar um volume livre na matriz em escala micrométrica (Figura 6).

Figura 6 - Mecanismo de partículas de reforço rígidas.



Fonte: ZUIDERDUIN et al., 2003, p. 262.

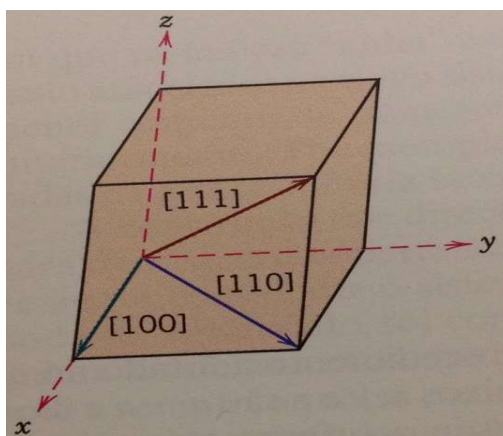
O processo de reforço das propriedades mecânicas pode ser dividido em três partes: I – Concentração das tensões: a partícula modificadora age como um concentrador de tensões, pois possui propriedades elásticas diferentes da matriz polimérica. II – Desprendimento: a concentração das tensões forma uma tensão triaxial em torno da partícula de reforço, resultando no desprendimento da interface partícula-matriz polimérica. III – Forças de cisalhamento: o espaço livre causado pelo

desprendimento altera a tensão da matriz polimérica e a tensão local é liberada, reduzindo a sensibilidade das fissuras. O mecanismo das forças de cisalhamento possibilita o material absorver grandes quantidades de energia antes da fratura (ZUIDERDUIN et al., 2003).

As características da superfície das nanopartículas influenciam as propriedades físico-químicas dos nanocompósitos (DASGUPTA et al., 2015). Segundo Bouwmeester et al. (2014), as nanopartículas podem ser divididas em três categorias: nanopartículas orgânicas, nanopartículas inorgânicas e nanopartículas combinadas orgânicas/inorgânicas (superfície modificada).

O tamanho é o parâmetro mais importante na caracterização da nanopartícula e crítico para a determinação das interações com outros materiais (DASGUPTA et al., 2015). O tamanho de um cristal pode ser caracterizado por superfícies ou planos, com exceção do sistema cristalino hexagonal, especificados por três índices de Miller ou (hkl), sendo que dois planos paralelos entre si possuem índices idênticos e são equivalentes. Os três eixos do sistema de coordenadas são baseados em uma célula unitária e podem ser representados conforme a Figura 7 (CALLISTER, 2000).

Figura 7 - Sistema de eixos coordenados do índice de Miller de uma célula unitária.



FONTE: CALLISTER, 2000, p. 42.

A diminuição do tamanho das partículas da fase dispersa melhora as propriedades mecânicas, mas o fator determinante é a uniformidade da dispersão na matriz polimérica. A proporção adicionada e as características da nanopartícula também influenciam na interação partícula-matriz e nas características da estrutura formada (MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014; ZHU et al., 2014).

A adição de poucas quantidades (< 5% em peso) de nanopartículas de reforço é capaz de melhorar as propriedades dos biopolímeros. As propriedades mecânicas do nanocompósito dependem da quantidade adicionada de nanopartículas (OTHMAN, 2014).

A aglomeração das partículas de reforço diminui a dispersão na matriz polimérica, resultando na deterioração das propriedades mecânicas do compósito. O aparecimento e o crescimento de agregados ocorrem durante a formação do polímero e são causados pela intensidade das forças de cisalhamento e adesão das partículas. A distribuição uniforme é favorecida por altas forças de cisalhamento e baixa energia de superfície, porém pequenas partículas são propícias a se agregar (KISS; FEKETE; PUKÁNSZKY, 2007).

A nanotecnologia está sendo empregada em materiais para construção como pisos, paredes e tecnologias em cosméticos, eletrônicos, tratamento de resíduos, equipamentos esportivos, na medicina, e recentemente na agricultura e indústria alimentícia (HANDFORD et al., 2014). A nanotecnologia está presente em várias áreas relacionadas a alimentos, porém é difícil estimar sua aplicação na agricultura ou na indústria de alimentos, já que não existe uma lista definida de alimentos ou produtos alimentícios que entram em contato com nanocompósitos (COLES; FREWER, 2013).

A definição analítica para nanopartículas ainda enfrenta desafios, já que não existe um único método analítico para detectar todos os tipos e tamanhos das nanopartículas nas matrizes. A grande diversidade de nanopartículas com composição química similar, mas com estruturas

variadas que proporcionam diferentes propriedades toxicológicas, requer técnicas diferenciadas para avaliar o tamanho e testar a toxicidade das nanopartículas. Técnicas de categorização dos materiais de risco são aplicadas como ferramentas de orientação para formulação de nanomateriais seguros, já que ainda não existem medidas regulatórias implementadas (BOUWMEESTER et al., 2014).

3.5. CARBONATO DE CÁLCIO (CaCO_3)

O carbonato de cálcio (CaCO_3) é estável, presente naturalmente no meio ambiente e possui três tipos de polimorfos básicos: calcita, aragonita e vaterita (GUOHUA et al., 2007). Os cristais de CaCO_3 geralmente se formam quando os segmentos de átomos ou moléculas se alinham regularmente em estruturas fixas. As diferentes conformações são formadas pela variedade de átomos e do alinhamento da estrutura cristalina (LIXIA et al., 2015). A cristalinidade dos cristais pode ser influenciada por fatores externos. O CaCO_3 na forma natural de aragonita pode ser convertida em calcita a temperaturas acima de 400°C (HARIHARAN, 2014)

O CaCO_3 pode ser aplicado como suplemento alimentar, principalmente se o consumo de cálcio na dieta diária for insuficiente, pois é essencial para a saúde dos ossos, coração, sistema nervoso e músculos, além de não ser tóxico e ser biocompatível, ou seja, pode ser utilizado em procedimentos cirúrgicos ou similares. Atualmente, o mineral é empregado na produção de filmes compósitos (WANG et al., 2015).

Carbonato de cálcio é utilizado em plásticos, borrachas, adesivos, revestimentos e resinas termofixas. Na indústria de papel, o CaCO_3 é a partícula mais utilizada como elemento inorgânico de reforço devido ao baixo custo e alta capacidade de melhorar as propriedades dos polímeros como módulo de Young e resistência à tração (LIXIA et al., 2015). A rigidez do compósito obtido é levemente modificada mas o limite de elasticidade e a resistência máxima aumentam consideravelmente com a

diminuição do tamanho das partículas de CaCO_3 (KISS; FEKETE; PUKÁNSZKY, 2007).

O CaCO_3 tende a se aglomerar por causa da sua alta hidrofiliçidade e energia de superfície. O aumento da área superficial das nanopartículas, o estado desprotegido dos átomos e a combinação com outros átomos, facilitam a modificação das propriedades originais da superfície, e, conseqüentemente, a agregação das partículas, além de acelerar o crescimento de cristais de CaCO_3 , tornando o diâmetro das nanopartículas de CaCO_3 maiores (RUI et al., 2015; ZHU et al., 2014).

As técnicas consideradas mais práticas e comercialmente disponíveis para impedir a formação de agregados são a modificação da superfície da partícula inorgânica com uma molécula orgânica e a polimerização *in situ* (LIXIA et al., 2015).

Os ácidos graxos de cadeias longas, como o ácido oleico, convertem a superfície hidrofílica das nanopartículas de CaCO_3 em uma superfície hidrofóbica (Figura 8) e melhoram a dispersão da partícula em solventes orgânicos (YANSHENG et al., 2013).

Figura 8 - Diagrama da modificação da superfície do CaCO_3 com ácido oleico.



Fonte: YANSHENG et al., 2013, p.533.

Diversas técnicas podem ser empregadas na polimerização de compósitos, como a polimerização *in situ*, em que as partículas são adicionadas durante a reação de polimerização. A sonificação pode ser utilizada para obter uma dispersão fina e uniforme das partículas

inorgânicas no polímero neste método, sendo denominado, então, polimerização *in situ* sonoquímica (BHANVASE; SONAWANE, 2014).

3.6. ULTRASSOM EM PROCESSOS ALIMENTÍCIOS

Tratamento de ultrassom é uma tecnologia emergente com um processo físico não térmico que possui várias aplicações na indústria de alimentos e em seus campos relacionados. Ultrassom pode ser definido como ondas sonoras de alta frequência que excedem o limite de audição humana (~20 kHz). Ultrassom de potência utiliza intensidades que excedem 1 W/cm² e frequências entre 20 e 500 kHz. A tecnologia do ultrassom é baseada na propagação das ondas sonoras que produzem uma cavitação acústica; se a propagação passa por um material biológico, as partículas do meio sofrem um processo de rarefação (compressão e descompressão) (AWAD et al., 2012, HIGUERA-BARRAZA et al., 2016).

A cavitação acústica produzida através da propagação das ondas sonoras é responsável por criar regiões de baixa e alta pressão que geram microbolhas, as quais são rapidamente formadas, aumentam de tamanho e colapsam. A grande quantidade de energia de ruptura das microbolhas é liberada por meio de ondas de choque, forças de cisalhamento, micro jatos e turbulências que fornecem ótimas condições para reações sonoquímicas (JIN et al., 2015; RODRIGUES et al., 2016).

A energia mecânica do sistema pode modificar as propriedades químicas/bioquímicas, mecânicas e físicas dos materiais. Banho de ultrassom ou sonda ultra-sônica de imersão com diferentes comprimentos, diâmetros e geometrias de ponta promovem reações diferentes, já que a quantidade de energia dissipada afeta proporcionalmente a variação da pressão acústica. As propriedades funcionais e físico-químicas de um material específico devem ser estudadas para verificar os efeitos e selecionar o sistema de processamento apropriado ou as condições do ultrassom, como as condições de operação, design da sonda, geometria e

suas características, frequência e outros parâmetros (AWAD et al., 2012). A aplicação de potências muito altas apresenta efeitos negativos, já que o tempo e intensidade também podem causar uma perda na funcionalidade ou desnaturação da proteína (HIGUERA-BARRAZA et al., 2016).

A técnica de ultrassom pode ser aplicada em diversos materiais para misturar, dispersar, realizar a ruptura de agregados, dissolução de sólidos em líquidos, homogeneização e emulsificação (DELMAS; BARTHE 2015). Jin et al. (2015) utilizaram a sonificação na enzimólise de proteínas para produzir peptídeos bioativos. O pré-tratamento melhorou a taxa de enzimólise, a bioatividade e a taxa de conversão do substrato, além de expor os sítios ativos ao alterar a microestrutura da proteína e sua estrutura secundária.

A aplicação de ultrassom de potência apresentou resultados significantes quando aplicado para formação de gel de proteína. O gel formado era mais compacto e possuía melhores características hidrodinâmicas, propriedades mecânicas e textura (KNOOR et al., 2011).

Wang et al. (2013) formulou filmes comestíveis de proteína de soja com a aplicação de ultrassom/micro-ondas e verificou que o material resultante continha partículas com menor tamanho, área de superfície maior e mais hidroxilas livres na superfície, que resultou na melhoria da capacidade de barreira ao vapor d'água e ao oxigênio. Vários estudos reportaram uma melhora nas propriedades funcionais da proteína com a aplicação do ultrassom, tais como diminuição do tamanho da partícula, aumento da solubilidade, melhor controle do processamento da microestrutura, formação de espuma, emulsificação, aceleração ou inativação de enzimas, congelamento, descongelamento, inativação microbiana, secagem e auxílio na extração de componentes bioativos (MARCUIZZO et al., 2010).

Segundo Delmas e Barthe (2015) uma técnica indicada de mistura com ultrassom deve condicionar a solução a passar regularmente nas melhores zonas de irradiação, melhorando a eficiência do processo.

Assim, uma dissolução inicial da solução com outra técnica facilita a agitação e auxilia drasticamente a mistura. A aplicação de ultrassom concentra a dissipação de energia próximo à aplicação (local da reação), enquanto que a agitação convencional espalha uma energia turbulenta em todo o volume da solução. O tempo de sonificação é o critério mais importante na uniformidade da solução, mas não reflete a qualidade da mistura em escala molecular, que pode ser influenciada por outros fenômenos de escala molecular, como precipitação, emulsificação, seletividade, taxa de reação e transferência de massa (MONNIER; WILHELM; DELMAS, 1999).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

Neste estudo foram utilizados zeína comercial adquirida da Sigma-Aldrich (Alemanha); etanol 95% (v/v) adquirido da Dinâmica (Brasil); glicerol e ácido oleico adquiridos da Synth (Brasil); emulsificante (mono e diglicerídeos) Emustab® adquirido da Duas Rodas Ind. (Brasil) e carbonato de cálcio (CaCO_3) fornecido pela Lagos Indústria Química LTDA (Brasil).

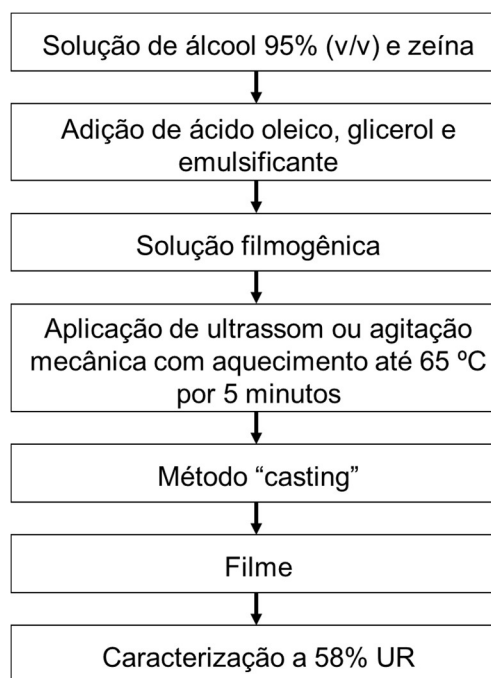
4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparação dos Filmes

Todos os filmes seguiram a formulação descrita por Pena-Serna e Lopes-Filho (2013), na qual zeína foi diluída na proporção de 20% de massa por volume de solução de etanol a 95% (v/v); glicerol foi utilizado como coadjuvante do agente plastificante na proporção de 30% de massa de zeína e ácido oleico na proporção de 70% de massa de zeína. O emulsificante foi incluído na proporção de 5% de massa de zeína como estabilizante da solução.

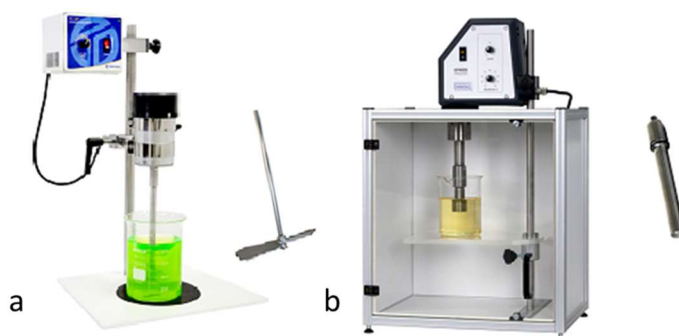
A zeína foi diluída na solução de 95% (v/v) de etanol nos filmes sem adição de CaCO_3 , o processo está apresentado na Figura 9. O glicerol, o ácido oleico e o emulsificante foram adicionados na solução filmogênica e, então, foram aplicados os tratamentos de ultrassom de 120 W (Anexo A) ou agitação mecânica com frequência de rotação de 650 rpm (TECNAL, Agitador Mecânico TE-139, Brasil – Figura 10a). Um banho termostático foi utilizado para pré-aquecer e restringir o aquecimento por cavitação da solução em até 65 °C por 5 minutos.. O ultrassom utilizado foi operado a 24 kHz de frequência e equipado com uma sonda cilíndrica de 22 mm de diâmetro (HIELSCHER, UP 400S, Alemanha – Figura 10b).

Figura 9 - Fluxograma dos filmes de zeína sem CaCO_3 .



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 - a) Agitador Mecânico TE-139 (TECNAL) com a pá de agitação; b) Ultrassom UP 400S (HIELSCHER) com a sonda de ultrassom.



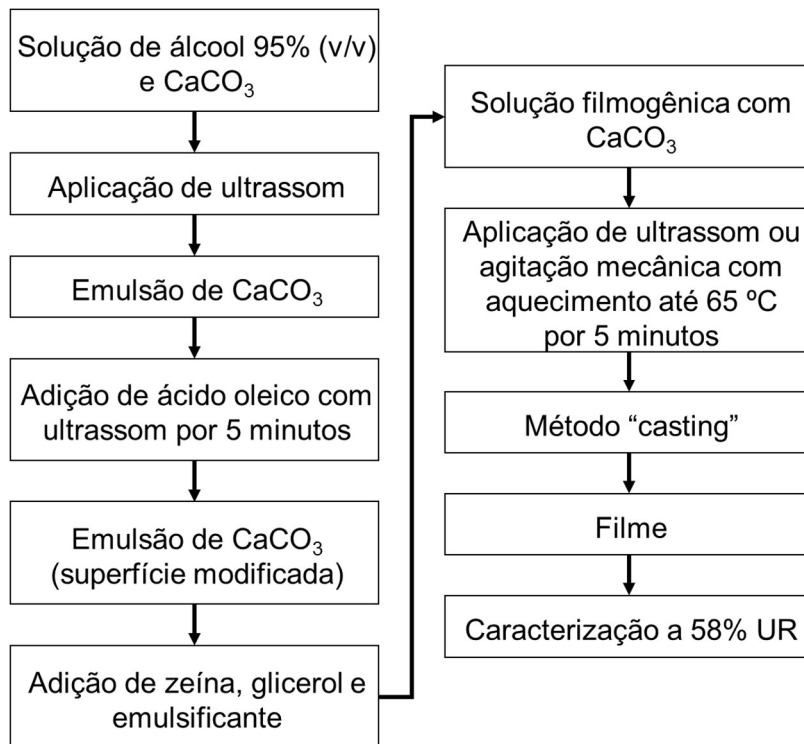
Fonte: Elaborado pelo autor.

A superfície do CaCO_3 foi modificada com ácido oleico durante a dispersão segundo o método descrito por Yansheng et al. (2013) e Swain et al. (2014), com alguns ajustes, para evitar a agregação do CaCO_3 e facilitar a incorporação das nanopartículas no filme.

As diferentes quantidades de carbonato de cálcio (1, 2 e 3% de CaCO_3 relativo à massa de zeína) foram dispersas em solução de etanol a 95% (v/v) com agitação magnética por 5 min e aplicado ultrassom com poder nominal de saída acústica de 400 W por 30 min. Ácido oleico foi adicionado na solução 5 min antes do término da dispersão.

A zeína foi adicionada na solução contendo CaCO_3 e ácido oleico com agitação magnética por 5 min, imediatamente após a dispersão. O glicerol e o emulsificante foram adicionados na solução filmogênica e, então, foi aplicado os tratamentos de ultrassom de 120 W ou agitação mecânica com frequência de rotação de 650 rpm. Um banho termostático foi utilizado para preaquecer e restringir o aquecimento por cavitação da solução em até 65 °C por 5 min. A Figura 11 apresenta o processo dos filmes adicionados de CaCO_3 .

Figura 11 - Fluxograma de produção dos filmes de zeína adicionados de micro e nanopartículas de CaCO_3 .



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após os tratamentos, foi aplicada uma quantidade constante ($0,035 \text{ g/cm}^2$) da solução em suportes de acrílico pelo método *casting* e mantidos por 24 h à temperatura de 25°C para evaporação do solvente. Os filmes foram retirados e condicionados em um dessecador com uma solução saturada de brometo de sódio (NaBr) para manter 58% de umidade relativa (% UR) por um período mínimo de 40 h antes de cada análise (YE; RAN; JUN, 2014).

4.2.2. Caracterização dos materiais

4.2.2.1. Difração de Raios X em Alto Ângulo (WAXS)

Os padrões de difração de raios x em alto ângulo (WAXS) dos filmes de zeína e do CaCO_3 foram determinados utilizando-se um difractômetro de raios X de bancada (RIGAKU, MiniFlex 300, Japão), com

radiação de Cu, linha K, $L = 1,542 \text{ \AA}$, utilizando um porta amostra de alumínio e monocromador. A velocidade de varredura foi de $1^\circ/\text{min}$ nas condições de 30 kV e 10 mA.

O software PDXL foi utilizado para a obtenção do espaço d entre as estruturas do filme e do tamanho da partícula de CaCO_3 . Os cálculos são baseados na Lei de Bragg e no método de Halder-Wagner (Anexo B), respectivamente. A cristalinidade relativa dos filmes é quantitativamente estimada seguindo o método de Nara e Komiya (1983), que se baseia na relação entre a área dos picos e área total dos difractogramas.

4.2.2.2. Espectroscopia no Infravermelho Acoplada à Técnica de Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)

Os filmes e o CaCO_3 foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho acoplada à técnica de reflectância total atenuada (FTIR-ATR) seguindo à técnica de Georget, Barker e Belton (2008). As amostras de filmes foram cortadas em quadrados de 1 cm^2 e foi utilizado o pó de CaCO_3 para obtenção dos espectros de transmitância. A análise foi realizada em um espectrofotômetro (PERKIN ELMER, Spectrum Two IR Spectrometer, EUA) com 10 varreduras, na região de 4000 a 400 cm^{-1} , intervalo de 2 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

4.2.2.3. Tamanho de Partícula

As análises do tamanho do CaCO_3 foram realizadas em um equipamento de dispersão dinâmica de luz (MALVERN, Zetaziser Nano ZS, Reino Unido). As amostras de CaCO_3 foram dispersas em uma solução de 95% (v/v) de etanol e água. A proporção de CaCO_3 adicionado foi de 0,02 g para 150 mL de solução com agitação magnética por 10 min sem aquecimento.

As amostras foram submetidas a três processos de agitação para verificar a dispersão de agregados. O primeiro tratamento foi a aplicação de agitação mecânica com frequência de rotação de 650 rpm por 30 min e

os tratamentos restantes tiveram a aplicação de ultrassom de 400 W em diferentes tempos (15 e 30 min.), os quais receberam a denominação 30min/Mec, 15min/Ult e 30min/Ult, respectivamente. A primeira análise foi realizada imediatamente após a dispersão. Após 24 h em repouso à temperatura de 25 °C, foi realizada uma segunda análise, a fim de verificar a estabilidade das partículas em repouso, onde as amostras receberam a denominação 30min/Mec₂₄, 15min/Ult₂₄ e 30min/Ult₂₄, respectivamente. A Tabela 1 apresenta os tratamentos e a codificação de cada amostra.

Tabela 1 - Codificação das amostras de dispersão de CaCO₃ com agitação mecânica ou ultrassom.

Tempo (min)	Tratamento	Codificação	
		0 hora	24 horas
15	Ultrassom	15min/Ult	15min/Ult ₂₄
30	Ultrassom	30min/Ult	30min/Ult ₂₄
30	Agitação mecânica	30min/Mec	30min/Mec ₂₄

Fonte: Elaborado pelo autor.

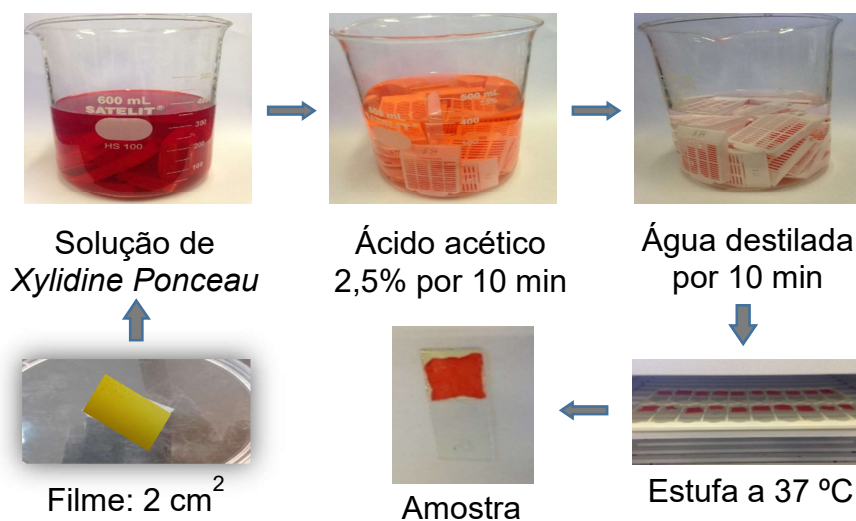
As amostras foram acondicionadas por 5 minutos a 25 °C antes de cada análise para assegurar a homogeneidade da temperatura. O teste foi realizado em triplicata e constituído de 10 leituras.

4.2.2.4. Microscopia Óptica

A uniformidade da superfície foi determinada por microscopia óptica. Os filmes foram tingidos com uma solução de *Xylidine Ponceau* seguindo o método descrito por Almeida (2010). Os filmes foram cortados em quadrados de 2 cm² e depois imersos em uma solução de *Xylidine Ponceau* por 30 min. Após o tingimento, as amostras foram lavadas em uma solução de ácido acético a 2,5% por 10 min e, depois, em água destilada por 10 min. Os filmes tingidos foram posicionados em lâminas

de microscópio e dispostos por 24 horas em uma estufa a 37 °C. Após a secagem, os filmes foram fixados com bálsamo do Canadá e lamínula de vidro, cuja montagem foi armazenada em temperatura ambiente por um período mínimo de 24 horas (Figura 12). As imagens foram captadas com um microscópio óptico (Olympus CX 31) equipado com um sistema de captura de imagem (Olympus CellSens Standards 1.11), utilizando um aumento de 100x.

Figura 12 - Diagrama de tingimento com solução de Xylidine Ponceau.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As estruturas da superfície e do corte lateral dos filmes foram observadas em um microscópio eletrônico de varredura (CARL ZEISS, EVO LS15, Alemanha) equipado com um detector de elétrons secundário (SE) em alto vácuo a temperatura constante. A análise foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do Departamento de Física da Unesp de Presidente Prudente (FCT).

As amostras de filmes para a análise superficial foram cortadas em quadrados de 1 cm² e as amostras para análise da superfície seccionada foram obtidas através de fraturas criogênicas após a imersão em

nitrogênio líquido durante 2 minutos. As amostras foram fixadas com uma fita condutora dupla face de carbono no *stub* (porta amostra) e metalizadas com uma fina camada de ouro utilizando o *sputtering* (QUORUM, Q 150R ES, Inglaterra). As imagens foram capturadas a 15-20kV com ampliações de 1000x e 5000x, respectivamente.

4.2.2.6. Espessura

A espessura dos filmes foi medida com um micrômetro digital (DIGIMESS, IP54, Brasil) de 0.001mm de precisão. Os cálculos foram realizados com a média aritmética de seis pontos medidos aleatoriamente.

4.2.2.7. Transparência / Opacidade

Seis amostras de cada filme foram testadas de acordo com Pena-Serna e Lopes-Filho (2013). Os filmes foram cortados em formatos retangulares de 9 mm por 43 mm e dispostos na parede interna da cubeta de varredura do espectrofotômetro (Bioespectro SP-220) a 600 nm. A Equação 1 foi utilizada para o cálculo da opacidade.

$$\text{Opacidade} = \frac{A_{600}}{x} \quad (1)$$

onde: A_{600} é absorvância medida a 600 nm e a espessura média do filme representada pelo x .

4.2.2.8. Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes foi determinada gravimetricamente de acordo com a norma ASTM E 96/96M-16 (ASTM, 2016) pelo método dessecante. As amostras de cada filme foram seladas hermeticamente em células de permeação de acrílico com área de exposição de 8,04 cm². As células de permeação continham dessecante (sílica gel) e foram acondicionadas em câmaras controladas

(dessecadores) contendo água destilada a 25°C. As determinações foram realizadas em triplicata com seis registros de aumento de peso das células em balança analítica (0,0001 g). A PVA foi calculada de acordo com a equação (2):

$$PVA = \frac{G \cdot X}{t \cdot A \cdot S \cdot P} \quad (2)$$

onde G é a mudança de peso na célula; X é a espessura média do filme; t é o tempo de medição durante o ganho de massa, A é a área de teste; S é a pressão do vapor saturado na temperatura do teste (3169 Pa em 25°C) e P é a diferença de pressão de vapor d'água interna e externa da célula de permeação. A relação G/t foi obtida pela fração linear do gráfico G vs. t. (WANG; PADUA, 2004; GAONA-SÁNCHEZ et al., 2015).

4.2.2.9. Solubilidade em água

A solubilidade em água foi obtida por meio da relação entre a matéria seca final e a matéria seca inicial dividida pela matéria seca inicial, ilustrado pela equação 3.

$$\text{Solubilidade em água (\%)} = \frac{w_i - w_f}{w_i} \quad (3)$$

Amostras de filme foram cortadas com 2,0 cm de diâmetro e submetidas à secagem por 24h a 105 °C, sendo posteriormente pesadas (peso inicial, W_i). As amostras secas foram imersas em 50 mL de água destilada e mantidas sob agitação lenta e constante (72 rpm) em shaker (MARCONI, MA-410, Brasil) por 24h à temperatura de 25 °C. Após este período, a água foi retirada e as amostras secas em estufa a 105 °C por 24h, para determinação da massa seca final (W_f).

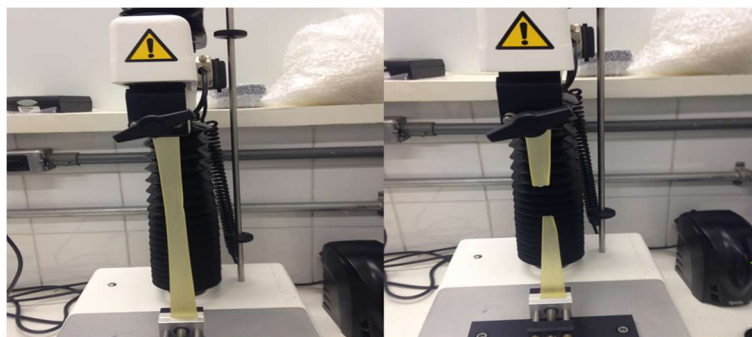
4.2.2.10. Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram analisadas de acordo com a norma ASTM D882-12 (ASTM, 2012), com modificações. Um

analisador de textura (Figura 13 - STABLE MICRO SYSTEMS®, TA.XT PLUS, Reino Unido) com o software Exponent e garras modelo A/TG foi utilizado na verificação da porcentagem de alongação na ruptura (%E), do limite de resistência à tração ($R_{m\acute{a}x}$) e do módulo de Young (E).

Os filmes foram cortados em tiras retangulares de 50 mm de comprimento por 25 mm de largura, cuja espessura foi medida com um micrômetro digital com 0.001 m de precisão. O valor da média aritmética de dez pontos aleatórios foi utilizada nos cálculos. A separação inicial entre as garras foi de 30 mm e a velocidade da análise ajustada para 500 mm/min. A tensão e a deformação de pelo menos 5 amostras de cada filme foram registradas durante a extensão das garras até a ruptura de cada filme para o cálculo das propriedades mecânicas (BASIAK; DEBEAUFORT; LENART, 2016; MASAMBA; LI; ZHONG, 2016).

Figura 13 - Análise das propriedades mecânicas TA.XT PLUS.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.3. Delineamento Experimental

O experimento foi realizado para um delineamento fatorial casualizado 4x2 com duas repetições, totalizando 16 tratamentos, para determinar a influência da adição de micro e nanopartículas de carbonato de cálcio (CaCO_3) e de diferentes tipos de agitação nas propriedades funcionais dos filmes à base de zeína.

O primeiro fator corresponde à adição de CaCO_3 e foi estudada em 4 níveis que foram relativos a filmes de zeína sem CaCO_3 e filmes com adição de 1, 2 e 3% (em massa de zeína) de CaCO_3 , sendo o valor codificado máximo igual a +2 e o mínimo, -2. O segundo fator, que se refere à agitação do sistema, conteve 2 variáveis categóricas: agitação mecânica (Mec) e aplicação de ultrassom (Ult), com a codificação 1 e 0, respectivamente. Cada combinação dos níveis dos fatores corresponde a um tratamento, sendo a adição de CaCO_3 (x1) e a agitação do sistema (x2). A Tabela 2 apresenta os valores codificados dos fatores.

Tabela 2 - Planejamento fatorial 4x2 com tratamento aleatorizado e valores codificados dos fatores.

Ensaio	Tratamento Aleatorizado	Fatores	
		CaCO_3 (%) - X_1	Agitação - X_2
1	11	1% CaCO_3 (-1)	Mec (1)
2	5	2% CaCO_3 (1)	Mec (1)
3	15	3% CaCO_3 (2)	Mec (1)
4	4	1% CaCO_3 (-1)	Ult (0)
5	12	1% CaCO_3 (-1)	Ult (0)
6	10	Zeína (-2)	Ult (0)
7	3	1% CaCO_3 (-1)	Mec (1)
8	7	3% CaCO_3 (2)	Mec (1)
9	13	2% CaCO_3 (1)	Mec (1)
10	1	Zeína (-2)	Mec (1)
11	14	2% CaCO_3 (1)	Ult (1)
12	8	3% CaCO_3 (2)	Ult (0)
13	9	Zeína (-2)	Mec (1)
14	6	2% CaCO_3 (1)	Ult (0)
15	16	3% CaCO_3 (2)	Ult (0)
16	2	Zeína (-2)	Ult (0)

Fonte: Elaborado pelo autor.

O modelo de efeitos linear descrito por Montgomery (2013) foi ajustado para descrever cada variável resposta na pela equação 4.

$$y_i = \mu_0 + \mu_1 x_1 + \mu_2 x_2 + \mu_{12} x_1 x_2 + \varepsilon_i \quad (4)$$

onde: y_i é a variável resposta; μ_0 , μ_1 , μ_2 e μ_{12} são os coeficientes do modelo; x_1 e x_2 são os fatores (variáveis independentes) de adição de CaCO_3 e agitação do sistema, respectivamente; as interações são representas por $x_1 x_2$; e o componente de erro para cada resposta é representado por ε_i .

4.2.4. Análises estatísticas

Os dados foram analisados com software Minitab (Minitab Inc., State College, PA), em que foi utilizado a ANOVA para a avaliação dos resultados experimentais de caracterização da microestrutura com o teste de Tukey para comparação das médias e o mesmo software foi utilizado para o delineamento fatorial das propriedades funcionais. O nível de significância de 0.05 foi utilizado para avaliar todas as análises, afim de analisar a microestrutura, estimar os efeitos e interações dos fatores e verificar a influência na variável resposta.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO CaCO_3

As propriedades da partícula (tamanho e geometria) influenciam nas características do compósito. No caso das propriedades mecânicas, a tensão e a força máxima de cisalhamento são fortemente afetadas pela área superficial específica do reforço, ou seja, as propriedades mecânicas geralmente são melhoradas à medida que o tamanho da partícula decresce (KISS; FEKETE; PUKÁNSZKY, 2007). A caracterização do CaCO_3 foi realizada antes da modificação da superfície por meio de

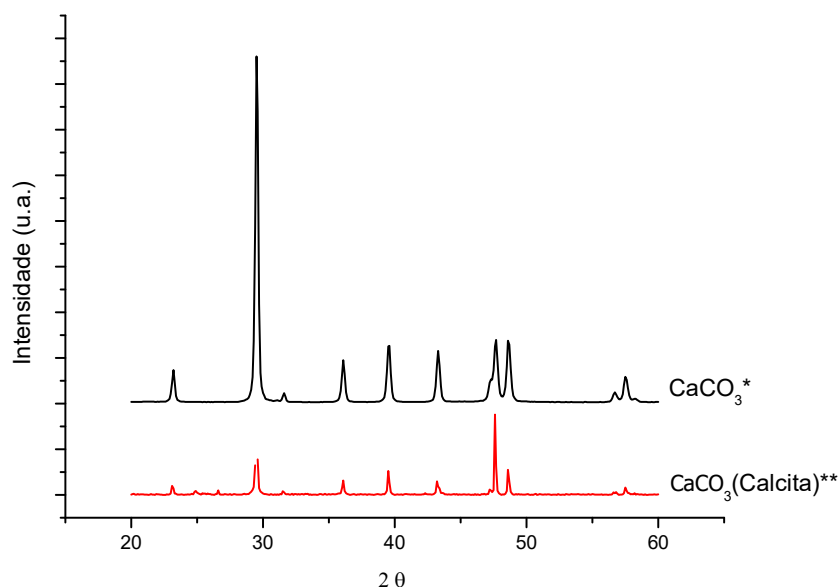
análises de WAXS, FT-IR e tamanho de partícula para analisar a pureza e a configuração do reagente.

5.1.1. WAXS do CaCO_3

A difração de raio-X é uma técnica eficiente para investigar as estruturas cristalinas e físico-químicas de cristais. A comparação entre os padrões permite a identificação da fase cristalina da calcita pura da amostra de CaCO_3 , conforme as distâncias dos grupos na comparação do espaço d , que é o espaçamento interplanar e representa a magnitude da distância entre dois planos paralelos e adjacentes, calculado pela Lei de Bragg dos planos do cristal.

Os padrões de difração do CaCO_3 e da conformação padrão normal da calcita (HARIHARAN, 2014) estão apresentados na Figura 14.

Figura 14 - Padrões de difração de raio-X em alto ângulo (WAXS) das partículas de CaCO_3 .



Fonte: *Elaborado pelo autor. **RRUFF project, 2016a.

A Tabela 3 apresenta os picos de difração encontrado nos padrões de raios x com a face do cristal do CaCO_3 . O valor do espaço d foi

calculado pelo programa PDXL2, que utiliza o método de Halder-Wagner para fornecer o tamanho médio do cristal.

Tabela 3 - Picos de difração, face do cristal e espaço d do CaCO_3 .

2 θ dos picos CaCO_3^*	23,2	29,5	31,6	36,1	39,6	43,3	47,7	48,6	56,7	57,5
Face do cristal**	012	104	006	110	113	202	018	116	211	122
Espaço d ($\text{\AA}$) [*]	3,83	3,03	2,83	2,49	2,27	2,09	1,91	1,87	1,62	1,60

Fonte: *Elaborado pelo autor. **WEI et al., 2013, p. 47. ; LIXIA et al., 2015, p. 567.

O método de Halder-Wagner determina o tamanho médio do cristal por meio do espaço d e da largura total medida na altura média da intensidade máxima dos maiores picos. O valor encontrado pelos cálculos dos picos foi de $32,6 \pm 4,6$ nm de diâmetro médio do cristal. O tamanho obtido pelos cálculos confirma as proporções nanométricas do reagente para aplicação no compósito. Nenhum pico de impurezas foi detectado, o que, segundo Hari-bala et al. (2006) e El-Sheikh et al. (2013), é uma indicação de que o pó de CaCO_3 possui uma alta pureza na forma cristalina da calcita.

5.1.2. FTIR-ATR do CaCO_3

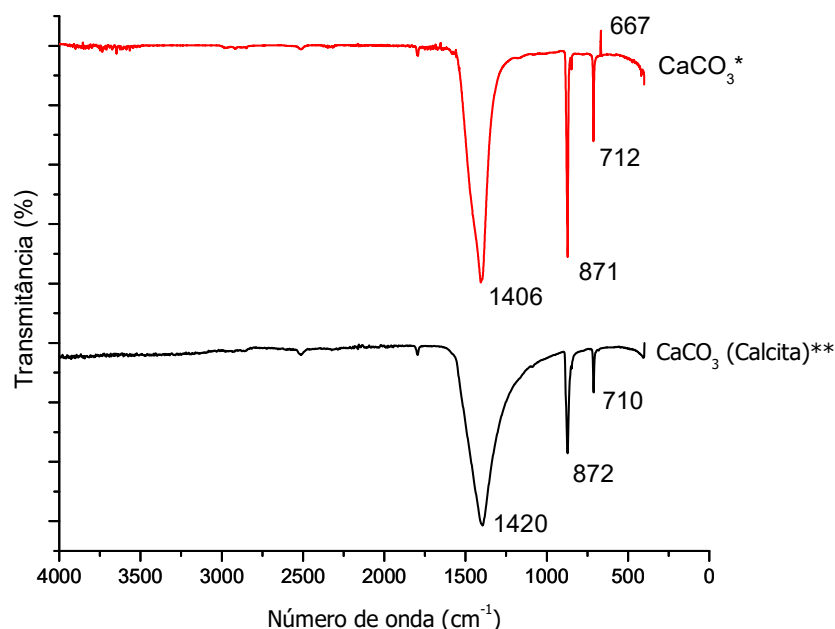
A Tabela 4 apresenta os picos característicos das diferentes morfologias do CaCO_3 . O CaCO_3 comum possui três picos distintos principais: ν_3 (com intensidade alta e base larga), ν_2 e ν_4 (com intensidades fracas e bases finas). Os picos de vibração do FTIR-ATR podem ser influenciados por defeitos existentes na estrutura cristalina do CaCO_3 , que produzem distorções nas vibrações que podem enfraquecer o sinal de transmitância ou até ocultar picos cristalinos (GUOHUA et al., 2007).

Tabela 4 - FTIR-ATR de diferentes morfologias do CaCO_3 .

Pico (cm^{-1})	CaCO_3^*	Calcita**	Aragonita**	Vaterita**
ν_2	871	872	851	870
ν_3	1406	1420	1465	1420, 1490
ν_4	712	710	692, 707	750
outros ν			1077	1070, 1085

Fonte: *Elaborado pelo autor; **GUOHUA et al., 2007, p. 85.

O espectro de FTIR-ATR do CaCO_3 está representado na Figura 15 junto com o espectro padrão normal da calcita. O espectro obtido apresentou vibrações nas bandas de 1406 cm^{-1} , 871 cm^{-1} , 712 cm^{-1} , que indica as vibrações conformacionais do plano do carbonato (CO_3^{2-}) (EL-SHAikh et al., 2013; LIXIA et al., 2015). Além dos picos obtidos, a ausência de picos próximo à região de 1000 cm^{-1} correlaciona o CaCO_3 ao espectro padrão da calcita.

Figura 15 - Espectrogramas do reagente e do padrão de CaCO_3 .

Fonte: *Elaborado pelo autor. **RRUFF project, 2016b.

A possível vibração na banda de 667 cm^{-1} apresenta um pico na região acima dos 100% de transmitância, então pode ser relacionada a uma impureza ou interferência durante a análise. A análise de FTIR-ATR confirma os picos característicos dos grupos do carbonato da calcita principalmente pela presença do pico na banda de 872 cm^{-1} e ausência de picos próximo à região de 1000 cm^{-1} descrito por Hariharan et al. (2014). Os resultados são coerentes com os resultados dos padrões de difração da calcita e a pureza do reagente pode ser verificada pela ausência de picos nas demais regiões.

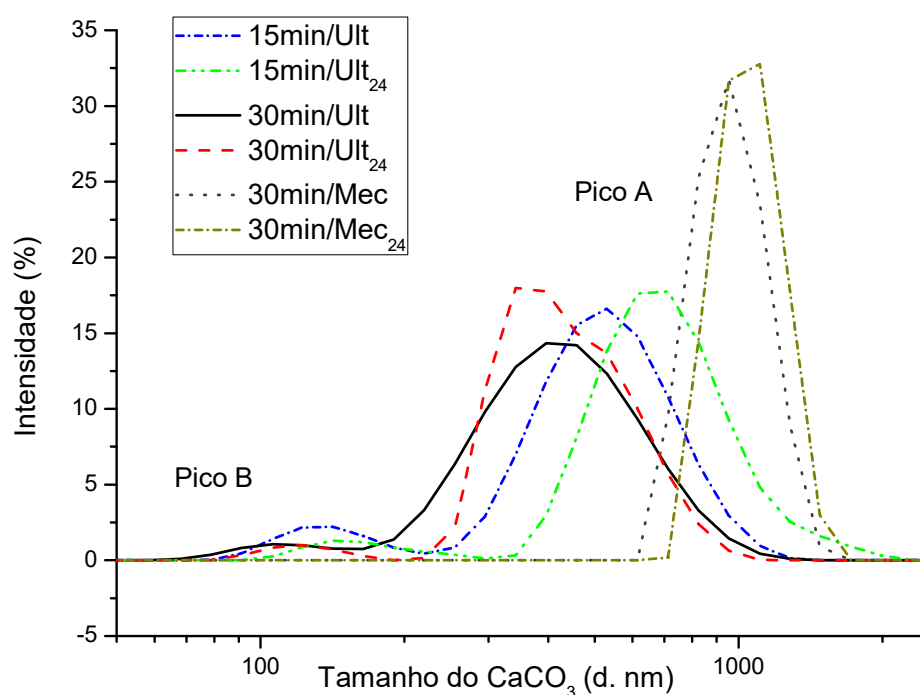
5.1.3. Tamanho de Partícula do CaCO_3

A nanopartícula de CaCO_3 é um material singular com característica de pó sólido ultrafino, cujo tamanho varia entre 10 a 100 nm. As nanopartículas de CaCO_3 tendem a se aglomerar por causa de sua alta hidrofiliabilidade e alta energia de superfície. Quanto menor o tamanho das partículas de CaCO_3 , mais provável é a aglomeração (ZHU et al., 2014).

A influência da agitação no tamanho médio do diâmetro da partícula de CaCO_3 foi analisada baseada em uma técnica de dispersão dinâmica de luz (dynamic light scattering – DLS) e está apresentada na Figura 16. As partículas analisadas apresentaram uma distribuição bimodal (2 picos) após o tratamento do ultrassom. O aparecimento de um segundo pico indica uma não uniformidade no processo ou a presença de partículas menores (KISS; FEKETE; PUKÁNSZKY, 2007).

O diâmetro médio da partícula nos tratamentos com o ultrassom apresenta valores distintos que diminuem à medida que se aumenta o tempo de exposição ao ultrassom. O tamanho do diâmetro médio em nanômetros de cada pico da Figura 16 está apresentado na Tabela 5.

Figura 16 - Distribuição dos tamanhos das partículas de CaCO_3 dispersas em uma solução aquosa de 95% (v/v) etanol e água em tipos de agitação e tempos diferentes: 30min/Mec, 15min/Ult e 30min/Ult, 30min/Mec₂₄, 15min/Ult₂₄ e 30min/Ult₂₄.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 - Diâmetro médio do CaCO_3 disperso em solução aquosa de 95% (v/v) etanol e água. ^{A, B, C, a} Os dados indicados por letras diferentes na mesma coluna representa uma diferença significativa ($p < 0.05$).

Tratamento	Pico A (d. nm)	Pico A (%)	Pico B (d. nm)	Pico B (%)
15min/Ult	564,2 ± 45,9 ^C	88,95	137,45 ± 12,49 ^a	11,05
15min/Ult ₂₄	819,0 ± 198,0 ^B	90,83	157,8 ± 41,6 ^a	9,17
30min/Ult	476,9 ± 32,0 ^C	92,17	115,2 ± 18,8 ^a	7,83
30min/Ult ₂₄	523,60 ± 8,77 ^C	92,0	122,35 ± 3,61 ^a	8,0
30min/Mec	968,6 ± 39,1 ^{A,B}	100	N/A	0
30min/Mec ₂₄	1059,2 ± 54,2 ^A	100	N/A	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

As partículas dispersas no tratamento 30min/Mec apresentaram um tamanho médio superior ($968,6 \pm 39,1$ nm) aos outros tratamentos e um sistema uniforme com apenas um pico de distribuição. Os tratamentos 15 min/Ult e 30 min/Ult apresentaram partículas com distribuição de tamanho menor e com intensidades maiores no diâmetro médio acima de 100 nm, caracterizando as micropartículas, sendo que o tratamento 30 min/Ult continha nanopartículas de CaCO_3 ($115,2 \pm 18,8$ nm). Segundo Yansheng et al. (2013), as partículas de CaCO_3 possuem afinidade com a água e tendem a se agregar durante a polimerização na matriz polimérica.

O diâmetro médio encontrado por Rui et al. (2015) da dispersão das nanopartículas de CaCO_3 na água pura foi de 367 nm. O valor encontrado é muito maior do que o tamanho das partículas em seu tamanho nativo, indicando possíveis aglomerações. A diminuição do diâmetro das partículas pela aplicação de ultrassom está de acordo com os dados reportados por Hassan et al. (2013), que utilizou o ultrassom para sintetizar nanopartículas de CaCO_3 a partir da casca do ovo e que podem ser aplicadas em compósitos poliméricos.

Após 24 horas em repouso, o diâmetro do tamanho das partículas não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), porém foi observado o aumento do desvio padrão do tamanho das partículas que representa a uniformidade do sistema. A grande área superficial e o estado de exposição dos átomos na superfície das nanopartículas de CaCO_3 tornam a molécula suscetível à perda de suas características superficiais por contaminação com outros átomos ou pelo meio. A influência desses fatores favorece a formação de agregados (RUI et al., 2015), assim como altas concentrações de nanopartículas diminuem a distância entre as partículas e formam agregados (WEI et al., 2013).

Segundo Bhanvase et al. (2011), a modificação da superfície de partículas inorgânicas com uma molécula orgânica é um dos métodos para reduzir a energia superficial e, simultaneamente, aumentar a compatibilidade com os compostos orgânicos da matriz polimérica. Desse

modo, a adição de compostos como o ácido oleico no tratamento da superfície do CaCO_3 é necessário para se alcançar uma boa dispersão e diminuir a adesão interfacial (YASHENG et al., 2013). A formulação dos filmes teve uma etapa de pré-tratamento das partículas de CaCO_3 com base na literatura (YASHENG et al. 2013; SWAIN et al. 2014) e nos resultados da análise do tamanho da partícula. CaCO_3 foi disperso com a aplicação de ultrassom e ácido oleico foi adicionado para a modificação da superfície.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

Os filmes obtidos apresentaram uma espessura uniforme com boa flexibilidade e foram retirados facilmente do suporte. A Figura 17 apresenta uma amostra do filme obtido.

Figura 17 - Filme de zeína.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os filmes possuem coloração amarela, a qual é atribuída aos carotenoides provenientes do milho, e uma percepção táctil gordurosa acentuada nos filmes adicionados com CaCO_3 , assim como descrito por Ribeiro (2014). O glicerol pode migrar da matriz polimérica para a superfície dos filmes devido à fraca interação existente com a zeína, causando a sensação gordurosa (PENA-SERNA; LOPES-FILHO, 2013). A adição de CaCO_3 pode ter afetado as interações entre os plastificantes

adicionados e a matriz polimérica, favorecendo a migração dos plastificantes para a superfície.

5.2.1. Microestrutura

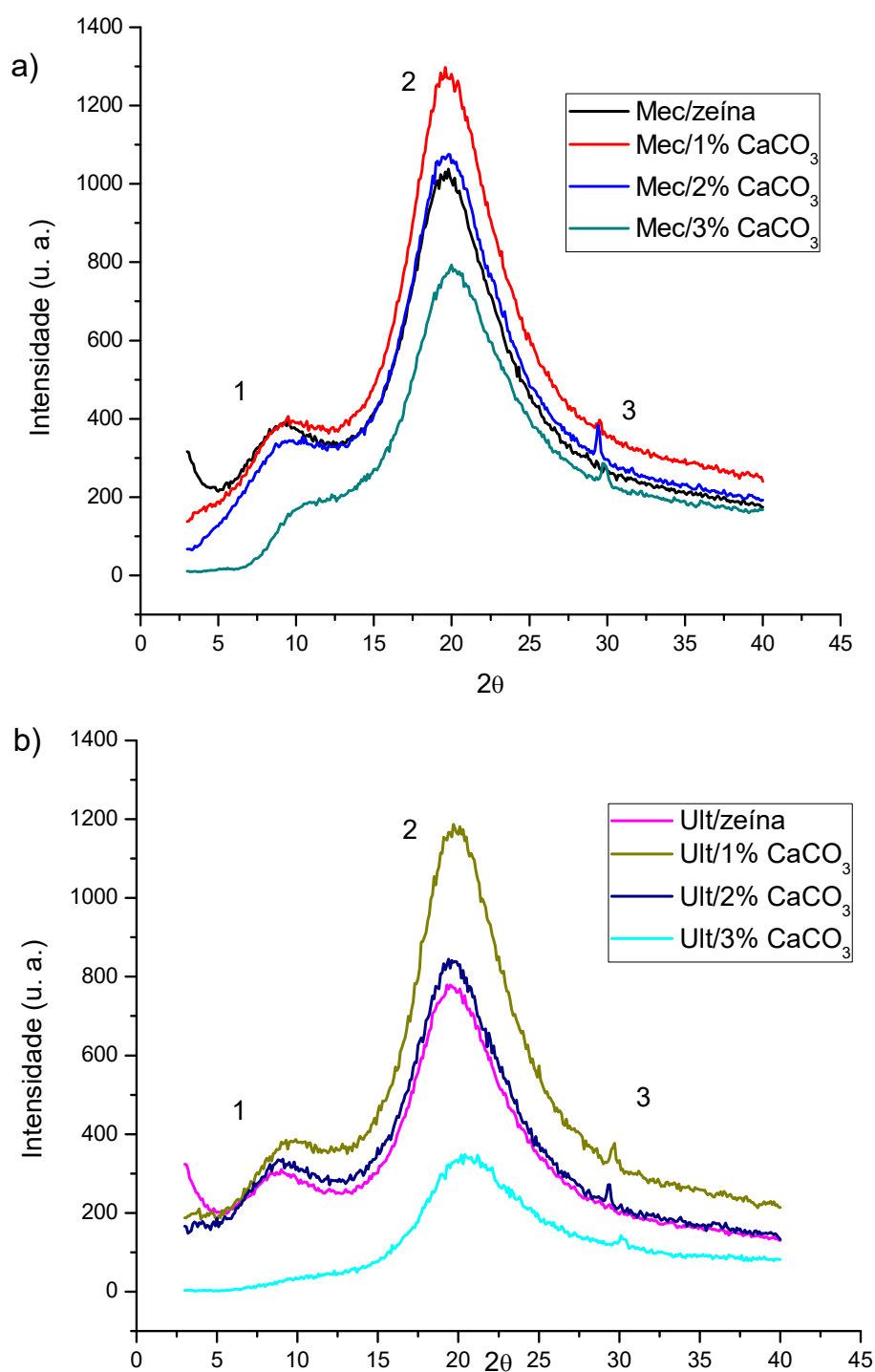
5.2.1.1. WAXS dos Filmes

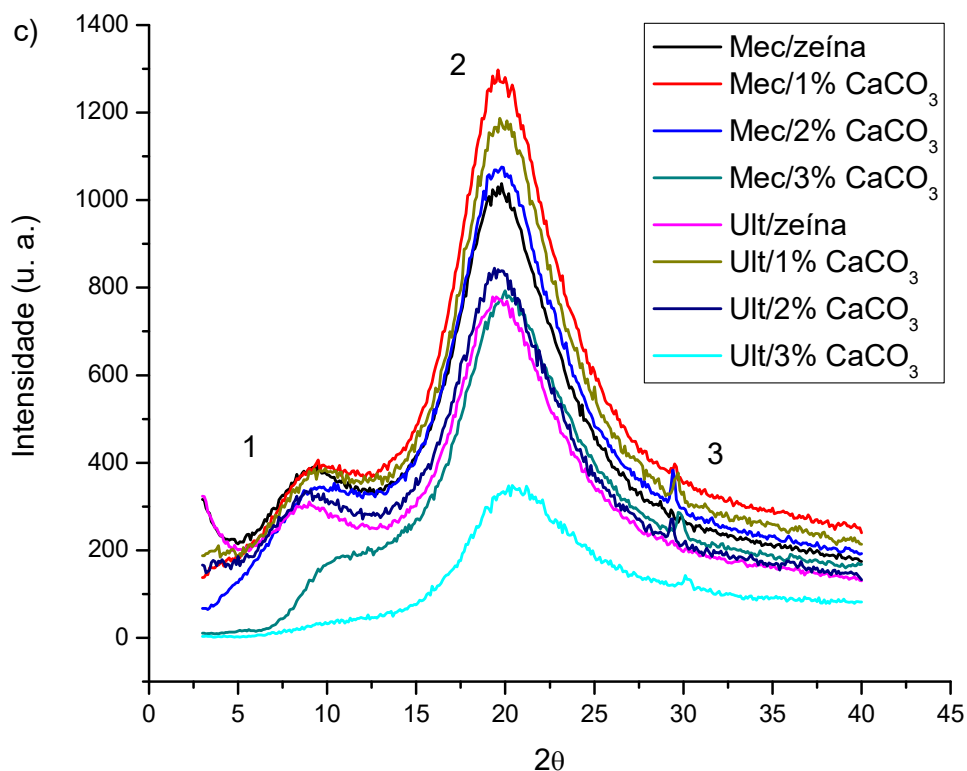
Segundo Heeley et al. (2014), a análise permite o estudo da estrutura cristalina de blendas ao longo de uma escala ampla, que contém informações sobre a estrutura cristalina (micromorfologia) e a ordem morfológica (macromorfologia), e foi realizada para verificar a influência dos tratamentos no empacotamento da estrutura da matriz polimérica dos filmes biodegradáveis.

A Figura 18 apresenta os difratogramas obtidos dos filmes com diferentes tratamentos. Segundo Wang et al. (2005), a zeína possui uma estrutura amorfa com picos de intensidade característicos e apresentam um espaçamento interplanar (espaço d) de 4,5 Å (representado como 2 na Figura 18) e outro de 10 Å (representado como 1 na Figura 18).

O espaçamento menor de 4,5 Å pode ser relacionado como a distância das bases entre as α -hélices ou representa os espaços entre as cadeias do ácido oleico (GORRASI; VERTUCCIO, 2016) e o empacotamento lateral das α -hélices gera o espaçamento maior de 10 Å. A α -hélice é a estrutura secundária mais abundante e estável nas proteínas e possui uma conformação com interações de hidrogênio intramoleculares (WANG et al., 2005).

Figura 18 - Difratogramas dos filmes de zeína adicionados com CaCO_3 em diferentes concentrações em diferentes processos de agitação: a) agitação mecânica; b) aplicação de ultrassom; c) agitação mecânica e aplicação de ultrassom.





Fonte: Elaborado pelo autor.

O aumento gradativo do elemento de reforço reduziu a intensidade dos picos de difração dos filmes e evidenciou o aparecimento dos picos de difração característico do CaCO₃ na região 2θ de ~29,5 (representado como 3 na Figura 18). Lian-Hua et al. (2014) observou o aparecimento de picos de difração na adição de CaCO₃ em compósitos de lignocelulose e atribuíram as mudanças de intensidade às interações entre o reforço inorgânico e a matriz polimérica.

As diferentes estruturas dos materiais podem ser refletidas nos padrões de WAXS, pois alterações na distância e no empacotamento das α-hélices podem causar a diminuição da intensidade dos picos de difração, o que indica possíveis dispersões nos agregados moleculares da zeína (WANG et al. 2005). As intensidades dos picos dos tratamentos com ultrassom foram menores, se comparados à agitação mecânica, principalmente com relação a distância das bases entre as α-hélices. A conformação das α-hélices pode ter sofrido alterações devido à aplicação

de ultrassom, já que o processo provoca alterações na estrutura das proteínas (HIGUERA-BARRAZA, 2016).

O aumento da intensidade dos picos de difração dos tratamentos com adição de 1% de CaCO_3 (Mec/1% CaCO_3 e Ult/1% CaCO_3) é relacionado à região amorfa do material que tende à organização da matriz polimérica com uma integração maior dos componentes dos filmes. Assim como observado por González e Igarzabal (2015) em que a adição de nanocristais de amido em uma matriz de proteína de soja refletiu em um aumento geral na intensidade dos picos de difração dos filmes.

A intensidade do pico de difração na região 2θ de ~ 9 a 10 diminui com o aumento da concentração de CaCO_3 (Mec/3% CaCO_3 e Ult/3% CaCO_3) e pode ser relacionado com a possível dispersão do agente de reforço entre o empacotamento das α -hélices. A ausência da curva característica na região de 2θ de ~ 9 a 10 no filme Ult/3% CaCO_3 não possibilita o cálculo do espaço d . Os valores do espaço d calculado para todos os picos dos filmes estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Espaço d dos filmes de zeína adicionados com CaCO_3 (0, 1, 2 e 3%) em diferentes sistemas de agitação (mecânica e ultrassom).

Filmes	1		2		3	
	2θ	espaço d	2θ	espaço d	2θ	espaço d
Mec/zeína	9,425	9,376	19,76	4,489	N/A	N/A
Mec/1% CaCO_3	9,645	9,162	19,66	4,512	29,46	3,030
Mec/2% CaCO_3	9,090	9,721	19,66	4,512	29,57	3,018
Mec/3% CaCO_3	10,18	8,682	19,98	4,440	29,88	2,988
Ult/zeína	8,766	10,079	19,76	4,489	N/A	N/A
Ult/1% CaCO_3	9,316	9,485	19,76	4,489	29,68	3,008
Ult/2% CaCO_3	8,876	9,954	19,55	4,537	29,46	3,030
Ult/3% CaCO_3	N/A	N/A	20,42	4,346	30,22	2,955

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os valores encontrados para o espaço d dos picos de difração estão de acordo com a literatura (WANG et al.; 2005) e representam a conformação estrutural proteica característica das zeínas. A adição contínua de CaCO_3 indica o aparecimento de um pico de difração na região 2θ de $\sim 29,5$, cujo valor do espaço d corresponde à face do cristal (104, Tabela 5) do CaCO_3 .

A cristalinidade relativa dos filmes, que é a divisão da intensidade máxima dos planos de difração pela intensidade de difração mínima do material amorfo (LIAN-HUA et al. 2014), está apresentada na Tabela 7. Os valores da cristalinidade relativa dos filmes com agitação mecânica não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) com o aumento da concentração de CaCO_3 , cuja variação incluiu o intervalo dos valores encontrados nos filmes com aplicação de ultrassom. Os maiores valores de cristalinidade relativa entre os filmes com aplicação de ultrassom ocorreram nos filmes Ult/zeína e Ult/2% CaCO_3 , o qual também está no intervalo dos menores valores, que foram observados nos filmes Ult/1% CaCO_3 e Ult/3% CaCO_3 .

Tabela 7 - Cristalinidade relativa dos filmes de zeína com CaCO_3 (0, 1, 2 e 3%) em diferentes sistemas de agitação (mecânica e ultrassom).

Filmes	Cristalinidade relativa
Mec/zeína	$24,502 \pm 0,217^{ab}$
Mec/1% CaCO_3	$24,035 \pm 0,717^{ab}$
Mec/2% CaCO_3	$23,849 \pm 1,922^{ab}$
Mec/3% CaCO_3	$23,432 \pm 0,616^{ab}$
Ult/zeína	$27,752 \pm 1,360^a$
Ult/1% CaCO_3	$20,789 \pm 1,304^b$
Ult/2% CaCO_3	$24,284 \pm 0,935^{ab}$
Ult/3% CaCO_3	$21,609 \pm 1,297^b$

Fonte: Elaborado pelo autor.

Segundo Lian-Hua et al. (2014), as alterações nos valores de cristalinidade relativa podem ser causadas pela dissolução de áreas cristalinas e não-cristalinas (amorfa) da matriz polimérica. A causa principal é a quebra das interações de hidrogênio intra e intermoleculares com o aumento da concentração de CaCO_3 .

A adição de grandes concentrações de CaCO_3 pode levar a maiores taxas de agregação do cristal e afetar a estrutura amorfa do filme. Fatores externos como a presença de água ou outras moléculas podem influenciar fortemente no empacotamento da estrutura dos filmes ao competir com as interações de hidrogênio das moléculas de zeína (YI-LONG et al., 2014).

5.2.1.2. FTIR-ATR dos Filmes

Os picos do grupo amino da proteína são caracterizados pelo espectro FTIR-ATR, em que os grupos peptídeos apresentam as maiores intensidades. Os espectros do infravermelho característicos de cada substância são alterados quando são formadas blendas com duas ou mais substâncias. As ligações físicas podem ser visualizadas pelas interações químicas (ZHE et al., 2014).

A tabela 8 apresenta a banda de absorção das estruturas da zeína e seus respectivos comprimentos de onda. Os filmes produzidos com diferentes concentrações de CaCO_3 e sistemas de agitação apresentaram as bandas de absorção característica dos filmes de zeína. Os espectros dos filmes apresentaram poucas alterações entre os picos dos filmes com e sem CaCO_3 , assim como observado por Tavares (2010) que formulou filmes de zeína com argilas modificadas e verificou a possível interação entre a zeína e os plastificantes (glicerol e ácido oleico), contudo não foi possível afirmar se houve interação entre a matriz polimérica e as partículas adicionadas devido à ausência de picos característicos.

Tabela 8 - Picos de FTIR-ATR de diferentes morfologias do CaCO_3 .

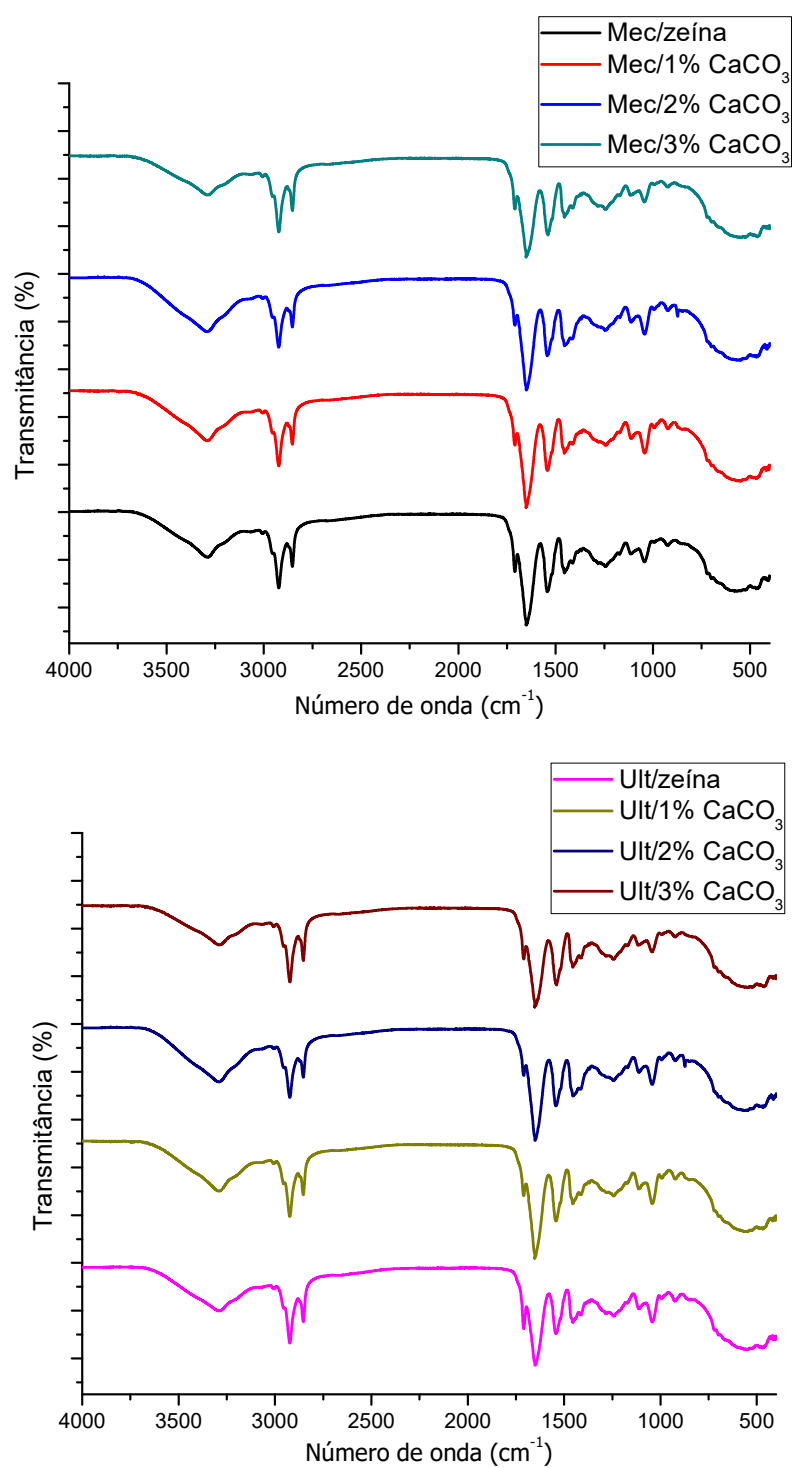
Estrutura	Comprimento de onda (cm^{-1})		Grupos associados
	Fílmes de zeína	Amostras	
Amida I	1640*	1650~1645	Estiramento do $\text{C}=\text{O}^*$
Amida II	1540*	1643~1638	Combinação do estiramento do $\text{C}-\text{N}$ e dobramento do $\text{N}-\text{H}^*$
Amida III	1400*	1415~1410	Combinação do estiramento do $\text{C}-\text{N}$ e dobramento do $\text{N}-\text{H}$
Amida A	3300*	3295~3292	Estiramento da hidroxila*
Ácidos graxos	2840*	-	Vibração do estiramento do $\text{C}-\text{H}$ do CH_3 e CH_2^*
Ácido oleico	2920*	2925~2923	
	1750**	1715~1713	
	2850**	2854~2850	Ácido oleico**
	2950**	2956~2950	

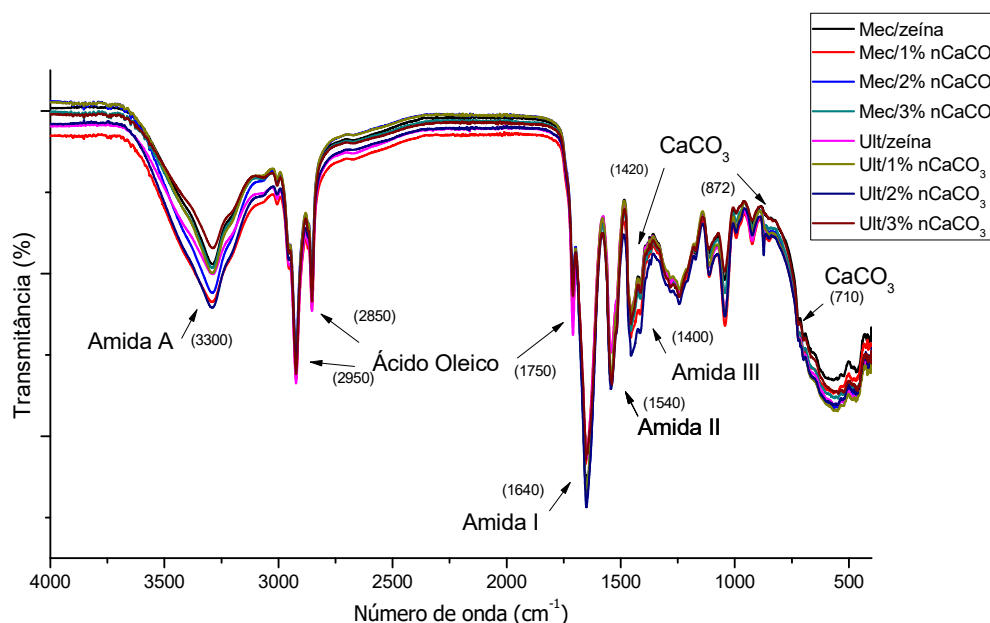
Fonte: *BARTH, 2007, p.1080; **TAVARES et al., 2012, p. 319.

A Figura 19 apresenta os resultados das análises de FTIR-ATR para todos os filmes. Os picos característicos da calcita foram apresentados na Tabela 6 e coincidem com as bandas de absorção dos filmes de zeína.

A estrutura da zeína contém ácidos graxos livres, como as cadeias laterais de certos aminoácidos e a presença de componentes alifáticos. As conformações α e β são as estruturas secundárias predominantes na estrutura da zeína e estão presentes nos filmes, pois existem picos na posição das bandas de absorção na região entre 1400 até 1800 cm^{-1} das amidas I, II e III. As diferenças na intensidade da transmitância são usuais e não representam uma alteração na constituição da estrutura secundária (ALMEIDA et al., 2010; FORATO; BERNARDES-FILHO; COLNAGO, 1998).

Figura 19 - Espectros do FTIR-ATR dos filmes à base de zeína adicionados com CaCO_3 em diferentes concentrações em diferentes processos de agitação: a) agitação mecânica; b) aplicação de ultrassom; c) agitação mecânica e aplicação de ultrassom.





Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.1.3. Microscopia Óptica

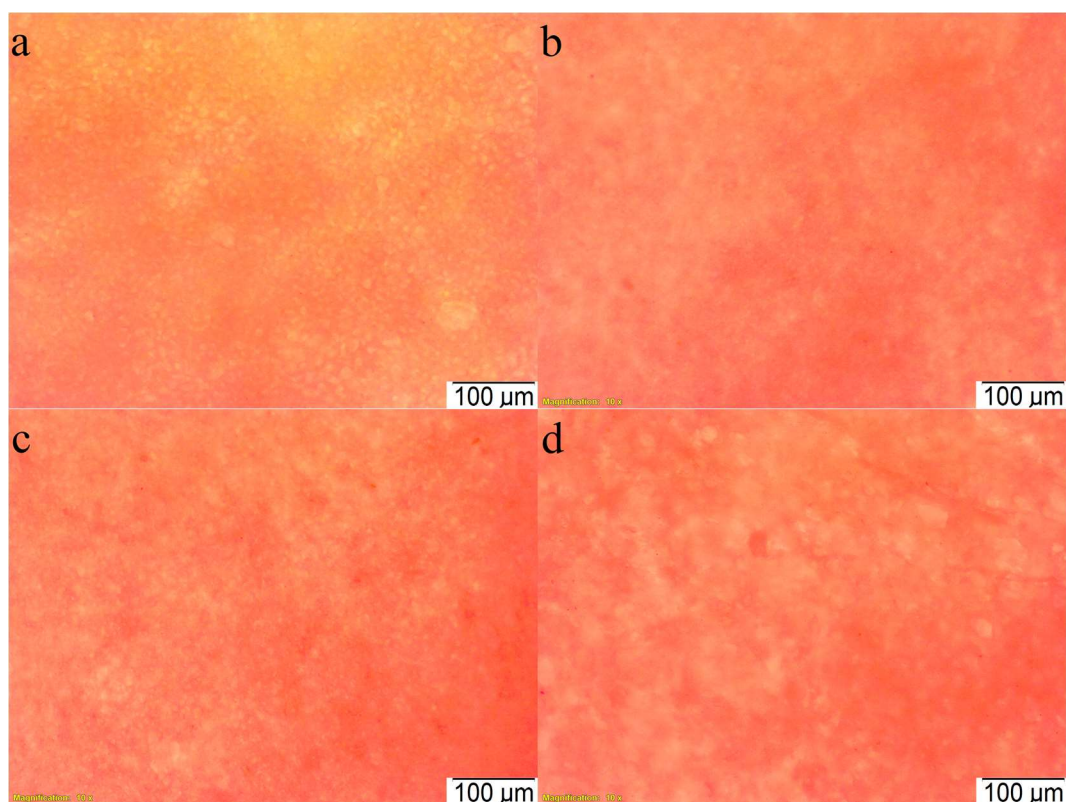
A microscopia óptica dos compósitos é um dos métodos mais utilizados para detectar agregados e caracterizar a estrutura, já que a quantidade de aglomerados depende do tipo de partícula (KISS; FEKETE; PUKÁNSZKY, 2007), além de complementar a MEV na identificação dos compostos presentes no filme (JÄÄSKELÄINEN et al., 2013). A Figura 20 apresenta as micrografias dos filmes de zeína com um aumento de 100x.

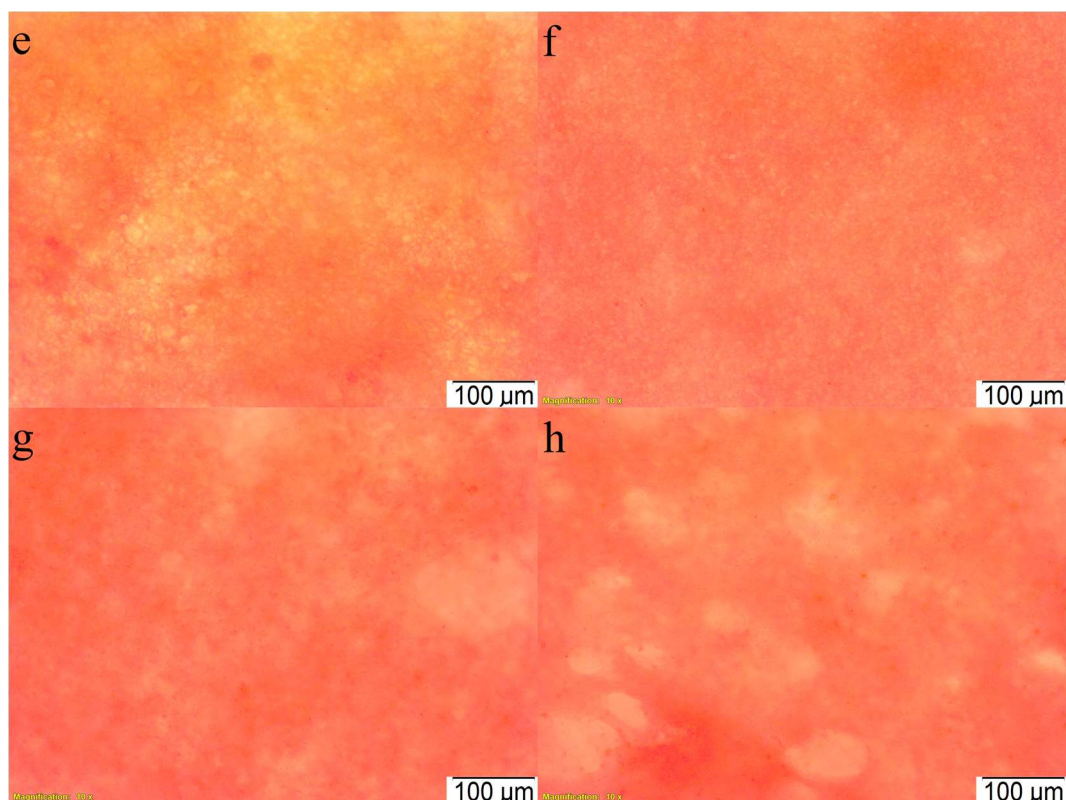
A microscopia óptica foi aplicada para observar a influência da concentração de CaCO_3 da agitação na uniformidade e na distribuição dos glóbulos de lípidios na matriz proteica. O tingimento com *Xyldine Ponceau* (pH=3.5) possibilita a identificação dos radicais proteicos catiônicos (amidas). As proteínas são tingidas em vermelho e os lípidios permanecem brancos (ALMEIDA et al., 2010).

A adição de glicerol e ácido oleico causou uma heterogeneidade na matriz polimérica com a ocorrência de aglomerados brancos que foi influenciada pela adição de CaCO_3 . A adição de 1 e 2% de CaCO_3 (Figura 20b-c e Figura 20f-g) modificaram a geometria globular, apresentaram

uma distribuição dos lipídios mais dispersa e micrografias com cores diferentes, se comparados aos filmes sem adição de CaCO_3 (Figura 20a e Figura 20e). As superfícies com coloração diferente visualizada nas microscopias indica uma variação na densidade dos filmes (KISS; FEKETE; PUKÁNSZKY, 2007).

Figura 20 - Microscopia Óptica dos filmes à base de zeína adicionados de CaCO_3 em diferentes concentrações e diferentes tipos de agitação: a) Mec/zeína; b) Mec/1% CaCO_3 ; c) Mec/2% CaCO_3 ; d) Mec/3% CaCO_3 ; e) Ult/zeína; f) Ult/1% CaCO_3 ; g) Ult/2% CaCO_3 ; h) Ult/3% CaCO_3 .





Fonte: Elaborado pelo autor.

O tamanho de particulados brancos aumentou gradualmente junto à quantidade de CaCO_3 adicionado, assim como a deformação da geometria. Os filmes com 3% de CaCO_3 (Figura 20d e Figura 20h) demonstrou uma matriz polimérica não uniforme com maior concentração de plastificantes na superfície. A presença de agregados de CaCO_3 rompe as interações de hidrogênio, modifica as interações entre os componentes da matriz e pode formar filmes heterogêneos (ARFAT et al. 2017), possibilitando a difusão e aglomeração dos plastificantes na superfície do filme.

A diferença entre os particulados brancos dos filmes com mesma concentração de CaCO_3 demonstra que a agitação influenciou na uniformidade do filme. A aplicação de ultrassom pode diminuir o tamanho da proteína (MARCUIZZO et al., 2010) e auxiliar na dispersão dos componentes e CaCO_3 na matriz polimérica.

A microscopia dos filmes não apresentou aglomerados de CaCO_3 na superfície do filme, contudo a adição em menor quantidade da partícula de reforço formaram filmes com dispersão dos componentes mais uniforme.

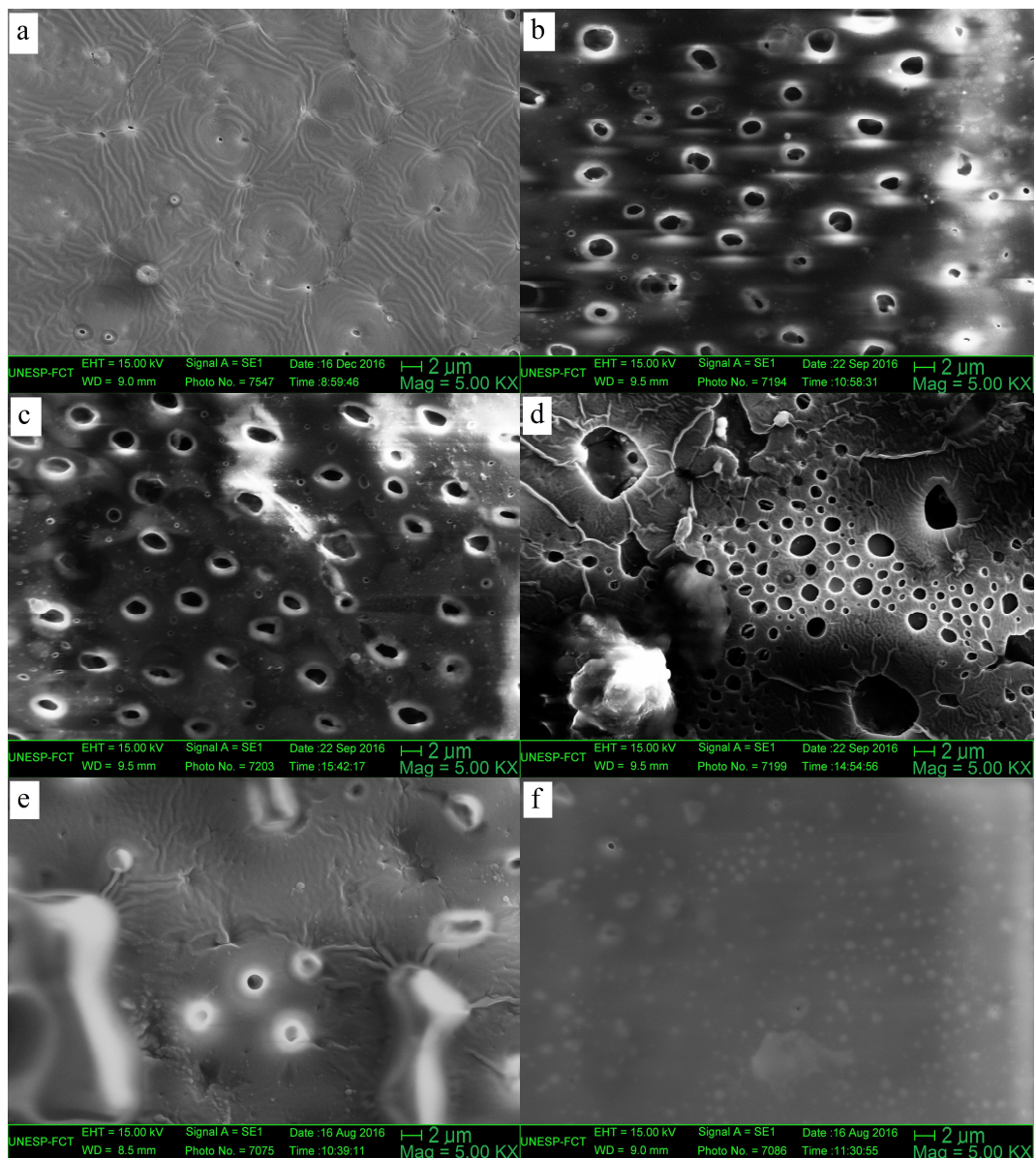
5.2.1.4. *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

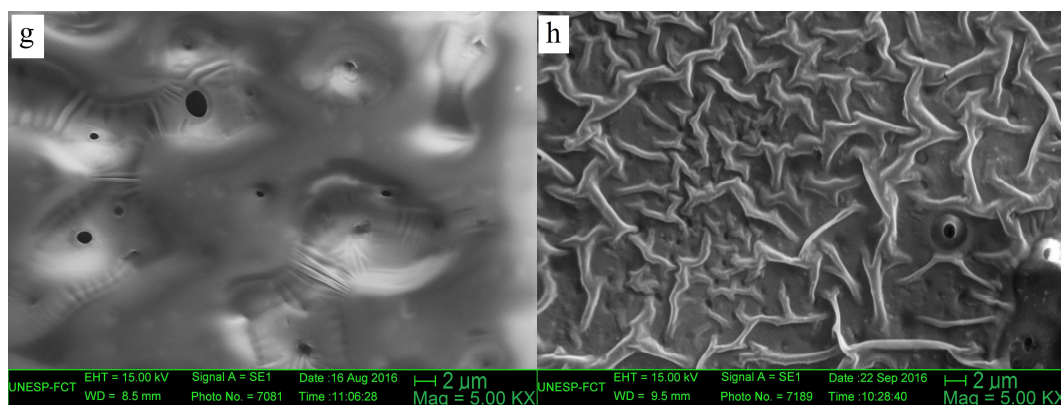
A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é amplamente utilizada no entendimento da microestrutura dos materiais e possibilita a observação da homogeneidade e a integração dos componentes na matriz polimérica devido às recentes melhorias da imagem, difração e análise dos elementos em termos de sensibilidade e resolução espacial (SUGA et al., 2014). As informações das análises de MEV e microscopia óptica complementam os estudos de compósitos. A MEV oferece evidências da localização e acúmulo de partículas na amostra, enquanto que a microscopia óptica proporciona informações biológicas relevantes (KEMPEN et al., 2015). As micrografias superficiais dos filmes estão apresentadas na Figura 21.

Os filmes apresentaram pequenas cavidades e poros na superfície, assim como observado por Soliman et al. (2014) em filmes de zeína. Os filmes sem adição de CaCO_3 (Figura 21a e 21b) apresentaram uma estrutura compacta e densa. O efeito do ultrassom pela cavitação pode influenciar os componentes da matriz polimérica ao diminuir os aglomerados de proteína e alterar suas interações com o meio (HIGUERA-BARRAZA et al., 2016).

A adição de 1%, 2% e 3% de CaCO_3 com agitação mecânica influenciou o surgimento de microcavidades, que aumentaram o tamanho e a geometria irregular na superfície dos filmes, conforme a concentração de CaCO_3 aumentou (Figura 21b-d), sendo que o filme Mec/3% CaCO_3 (Figura 21d) apresentou uma superfície heterogênea. As microcavidades podem ser resultado da difusão dos plastificantes para a superfície do filme.

Figura 21 - Microscopia eletrônica de varredura da superfície dos filmes à base de zeína adicionados de CaCO_3 em diferentes concentrações e diferentes tipos de agitação com aumento de 5000x: a) Mec/zeína; b) Mec/1% CaCO_3 ; c) Mec/2% CaCO_3 ; d) Mec/3% CaCO_3 ; e) Ult/zeína; f) Ult/1% CaCO_3 ; g) Ult/2% CaCO_3 ; h) Ult/3% CaCO_3 .





Fonte: Elaborado pelo autor.

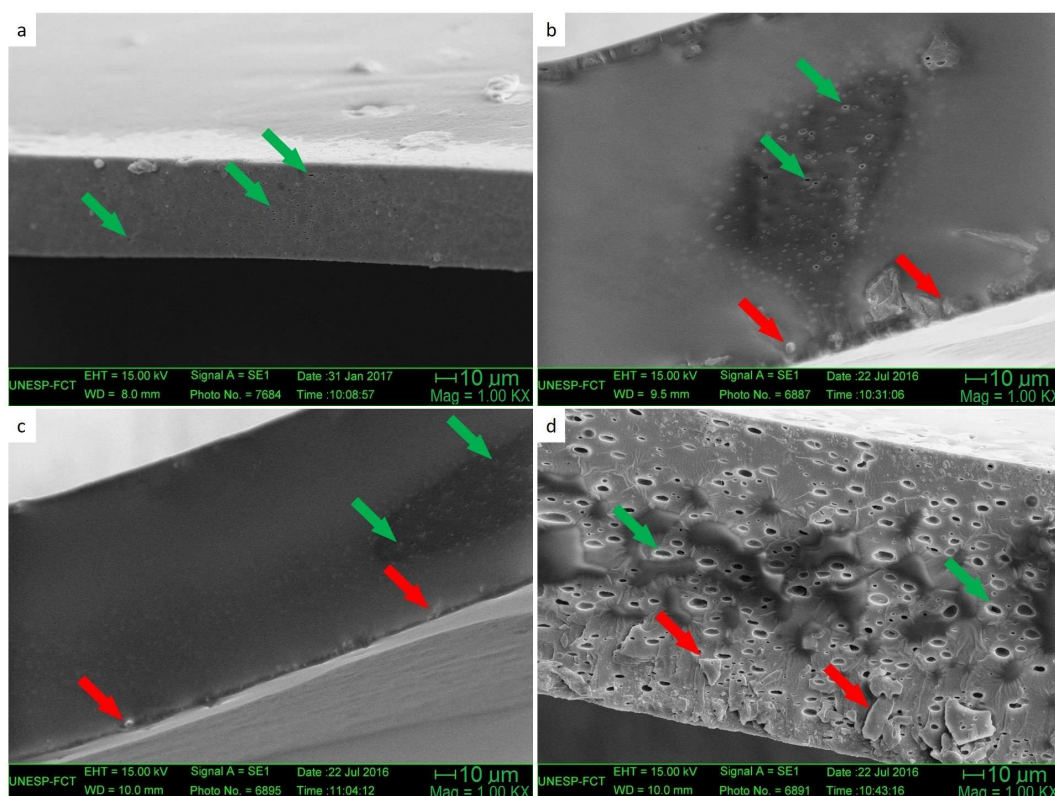
Os filmes com aplicação de ultrassom formaram superfícies com menos microcavidades e o aumento da concentração de CaCO_3 favoreceu a formação de pontos com concentração de tensão (Figura 21f-h), sendo que o filme Ult/1% CaCO_3 (Figura 21f) apresentou uma superfície uniforme. Lai e Padua (1997) observaram na microestrutura de filmes de zeína estruturas emaranhadas semelhantes à fios de fitas que podem representar um estiramento irregular ou uma não uniformidade na orientação da matriz polimérica. O estiramento irregular na matriz pode ser associado a gradientes de tensão na superfície da amostra que se concentraram perto das microcavidades no filme Ult/2% CaCO_3 (Figura 21g) e em toda superfície do filme Ult/3% CaCO_3 (Figura 21h).

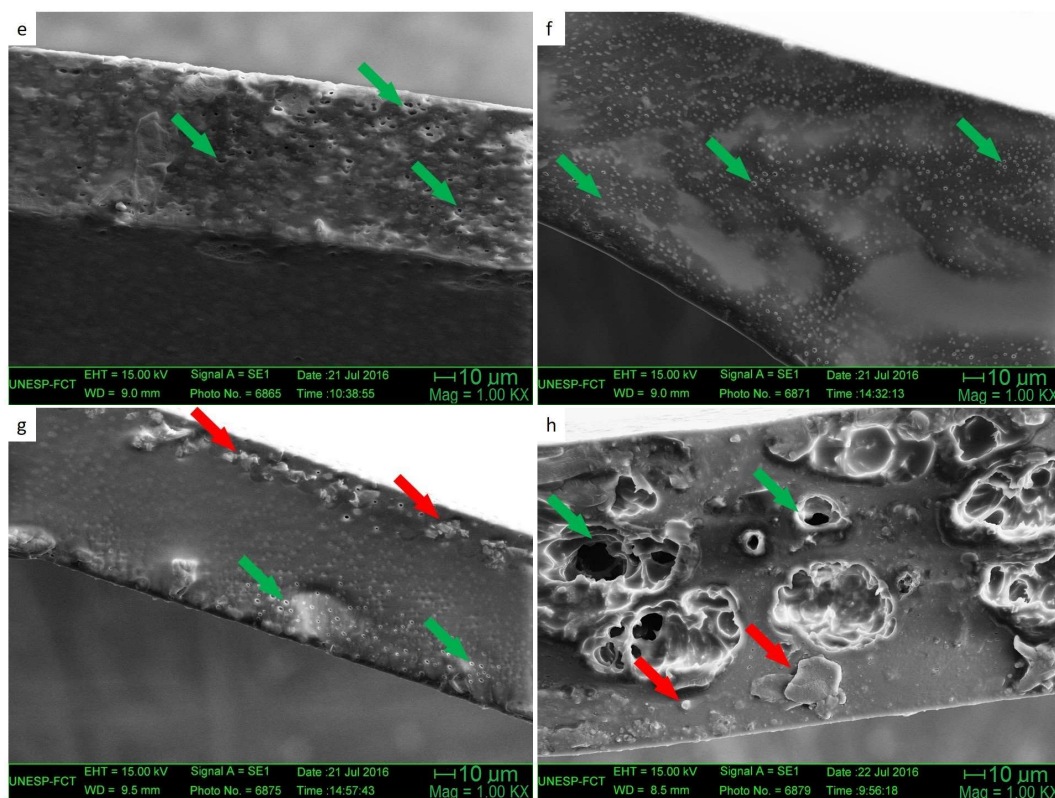
As micrografias das superfícies seccionadas dos filmes estão apresentadas na Figura 22. Os glóbulos dos plastificantes (ácido oleico e glicerol) dispersos na matriz polimérica e a evaporação do etanol causam uma aparência de poros e cavidades na microestrutura dos filmes de zeína, que estão indicados com a flecha verde nas micrografias da superfície seccionada dos filmes (TAVARES et al. 2012; PENA-SERNA; LOPES-FILHO, 2015).

O filme Mec/zeína (Figura 22a) apresentou a microestrutura mais homogênea e compacta entre os filmes produzidos. A adição de CaCO_3 com agitação mecânica produziu regiões com concentração de

plastificantes e agregados de CaCO_3 , próximo às paredes dos filmes, que estão indicados com as flechas vermelhas (Figura 22b-d). A adição de 3% de CaCO_3 afetou a homogeneidade da microestrutura com uma quantidade superior de agregados em diversos tamanhos.

Figura 22 - Microscopia eletrônica de varredura da superfície seccionada dos filmes à base de zeína adicionados de CaCO_3 em diferentes concentrações e diferentes tipos de agitação com aumento de 1000x: a) Mec/zeína; b) Mec/1% CaCO_3 ; c) Mec/2% CaCO_3 ; d) Mec/3% CaCO_3 ; e) Ult/zeína; f) Ult/1% CaCO_3 ; g) Ult/2% CaCO_3 ; h) Ult/3% CaCO_3 .





Fonte: Elaborado pelo autor.

A superfície seccionada do filme Ult/zeína (Figura 22e) apresenta uma estrutura heterogênea, que ficou mais uniforme com a adição de 1% de CaCO_3 (Ult/1% CaCO_3 , Figura 22f). O aumento contínuo da concentração de CaCO_3 propiciou a formação de aglomerados nas extremidades dos filmes Ult/2% CaCO_3 e Ult/3% CaCO_3 (Figura 22g-h, respectivamente). As possíveis agregações, indicadas pelas flechas vermelhas, podem ser a causa dos pontos de concentração de tensão próximos à superfície dos filmes (Figura 21g-h). As micrografias das superfícies seccionadas demonstraram que a adição de CaCO_3 modificou a microestrutura dos filmes, concordando com as análises de WAXS e microscopia óptica.

A agitação mecânica produziu filmes mais compactos, contudo não foi capaz de evitar a formação de agregados de carbonato de cálcio. O efeito do ultrassom nas moléculas de zeína pode melhorar as interações

das moléculas com o meio ao diminuir os agregados e alterar as propriedades físico-químicas da proteína (ZISU et al., 2011). A aplicação de ultrassom contribuiu para microestruturas homogêneas e favoreceu a dispersão do CaCO_3 ao inibir a formação de agregados, contudo, o aumento da concentração das partículas de CaCO_3 favoreceu a formação de aglomerados.

5.2.2. PROPRIEDADES FUNCIONAIS

As limitações na aplicação industrial dos biomateriais são relacionadas às propriedades mecânicas e à hidrofiliabilidade da matriz. O filme de zeína pode substituir agentes de cobertura comerciais como a cera de carnaúba e a goma-laca. Além dos biopolímeros serem uma alternativa para aplicações descartáveis como talheres, copos, sacos de lixo, entre outros (CORRADINI et al., 2014; RHIM; PARK; HA, 2013).

A Tabela 9 apresenta os resultados das variáveis dependentes: espessura, solubilidade, opacidade e permeabilidade ao vapor d'água dos filmes obtidos pelo fatorial da Tabela 2. A Tabela 10 apresenta o nível de significância da ANOVA de cada fator e suas interações com um nível de significância de 0,05 para a análise dos resultados.

Tabela 9 - Resultados de Espessura (mm), Opacidade (Abs mm⁻¹), Solubilidade (%) e PVA (g/m.s.Pa) dos filmes.

Filme	Espessura (mm)	Opacidade (Abs.mm ⁻¹)	Solubilidade (%)	PVA (g/m.s.Pa)x10 ⁻¹⁰
Mec/zeína	0,1240 ± 0,018	6,300 ± 1,154	7,615 ± 1,010	0,881 ± 0,009
Mec/1%CaCO ₃	0,1530 ± 0,020	3,892 ± 0,503	7,960 ± 1,500	1,136 ± 0,128
Mec/2%CaCO ₃	0,1255 ± 0,019	3,710 ± 0,642	8,458 ± 0,345	0,900 ± 0,022
Mec/3%CaCO ₃	0,1420 ± 0,003	4,245 ± 0,339	10,119 ± 0,609	1,138 ± 0,337
Ult/zeína	0,1045 ± 0,032	6,869 ± 0,428	7,377 ± 0,698	1,064 ± 0,248
Ult/1%CaCO ₃	0,1620 ± 0,028	3,220 ± 1,324	8,309 ± 0,450	1,214 ± 0,333
Ult/2%CaCO ₃	0,1275 ± 0,030	4,170 ± 0,533	8,870 ± 2,520	0,809 ± 0,020
Ult/3%CaCO ₃	0,1655 ± 0,035	4,572 ± 1,218	12,100 ± 1,510	1,182 ± 0,001

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 10 - Nível de significância dos efeitos principais e das interações segundo a análise de variância (ANOVA) da Espessura (mm), Opacidade (Abs mm⁻¹), Solubilidade (%) e PVA (g/m.s.Pa) dos filmes.

Efeitos principais e das interações	Espessura (mm)	Opacidade (Abs.mm-1)	Solubilidade (%)	PVA (g/m.s.Pa)
	Valor p			
A (CaCO ₃)	0,108	0,004	0,018	0,205
B (agitação)	0,773	0,699	0,357	0,642
A*B	0,687	0,726	0,660	0,855

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.2.1. Espessura

A espessura pode ser controlada dependendo da técnica de polimerização e do suporte utilizado, já que a formação dos filmes ocorre nas etapas de evaporação. Todos os filmes foram formados pela técnica *casting*, em que a mesma proporção de peso x área foi aplicada nos suportes de mesma geometria. A aplicação da ANOVA e os valores “p” apresentados na Tabela 10 indicaram que não houve influência significativa dos efeitos nos tratamentos, nem uma interação significativa entre os fatores. A adição das quantidades de CaCO_3 ou a aplicação de ultrassom nas condições do experimento não afetaram significativamente a espessura que apresentou um valor médio de $0,138 \pm 0,028$ mm.

Durante a evaporação do solvente (orgânico ou água) a conformação da proteína passa por mudanças e ocorre a formação dos filmes por meio de uma reorganização das cadeias poliméricas e fenômenos de transferência de massa (MORAES et al., 2015). O tipo e a proporção de ligações covalentes (S-S) ou não covalentes (hidrogênio, iônicas e interações hidrofóbicas) entre as cadeias da matriz é determinado pela taxa de desnaturação ou abertura da estrutura da proteína. A diferença entre as espessuras foi insignificante ($p < 0,05$) demonstrando um processo de formação de filme uniforme, já que a espessura pode ser afetada por condições específicas de secagem, variações de umidade relativa, teor de umidade da solução filmogênica e outros fatores externos (DENA VI, 2009).

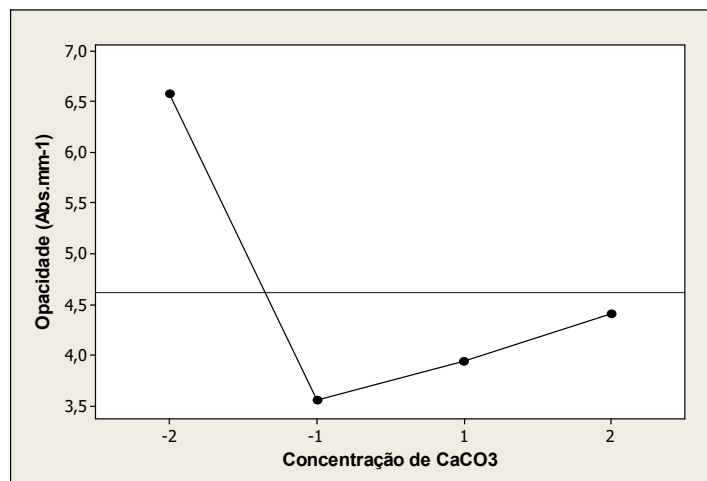
5.2.2.2. Transparência / Opacidade

A quantidade de luz que atravessa um material pode ser indicada pela opacidade ou pelos valores de transparência. A baixa transparência indica uma menor quantidade de luz que atravessa o filme, sendo que esta propriedade de barreira pode ser importante para controlar a incidência de luz em produtos revestidos. Normalmente, a aplicação de

filmes para embalagens requer uma maior transparência para uma melhor aceitação do produto, devido ao conteúdo visível.

Alterações nas características dos filmes, como coloração e opacidade, também não são desejáveis ao longo do tempo, já que podem prejudicar a aceitação do produto acondicionado (ALMEIDA, 2010). A Figura 23 apresenta o gráfico do aumento contínuo da concentração de CaCO_3 na opacidade dos filmes.

Figura 23 - Gráfico do efeito do aumento contínuo da concentração de CaCO_3 na opacidade dos filmes.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A aplicação da ANOVA indica que há um efeito significativo da adição de CaCO_3 na opacidade (Tabela 10). A adição de CaCO_3 diminuiu a média da opacidade dos filmes, contudo a maior concentração de CaCO_3 possui uma tendência de aumentar a opacidade dos filmes. A equação 5 apresenta o modelo de efeitos da opacidade representado pela variável y_1 .

$$y_1 = 4,622 - 1,962x_1 \quad (5)$$

A opacidade de filmes de zeína aumenta quando melhorias na solubilização da zeína ou elementos que ampliam a afinidade das cadeias poliméricas e dos componentes são aplicados. A dispersão e a distribuição uniforme ao longo da matriz do ácido oleico melhoram as forças intermoleculares e previnem a passagem da luz através do filme com uma matriz mais densa e resistente (WANG, 2014). Os efeitos da agitação e da interação entre a agitação e a adição de CaCO_3 não apresentaram uma diferença significativa ($p < 0,05$) na opacidade.

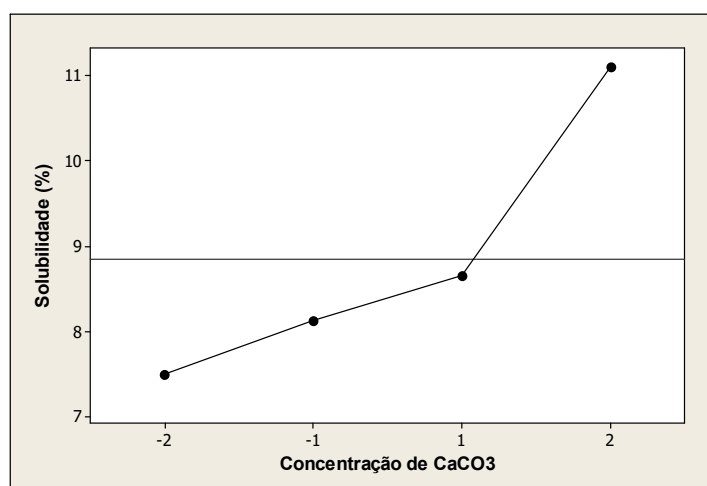
A adição de CaCO_3 , pelas análises da microestrutura, alterou a região amorfa, modificando os espaços entre as cadeias da proteína e a homogeneidade do filme, e diminuiu a densidade do material que pôde possibilitar a passagem da luz e reduzir a opacidade do filme (PENA-SERNA; LOPES-FILHO, 2013). O carbonato de cálcio melhora a opacidade e o brilho do produto da indústria de papel devido à dispersão da luz (PARK et al., 2008; TEIR; ELONEVA; ZEVENHOVEN, 2005), portanto o acréscimo da concentração de CaCO_3 apresentou uma tendência à elevação da opacidade. A opacidade também pode aumentar quando elementos hidrofílicos estão presentes na matriz polimérica em maior quantidade, já que a água na superfície e nos espaços internos da microestrutura pode influenciar na dispersão da luz (YI-LONG et al. 2014).

5.2.2.3. *Solubilidade em Água*

O grau de solubilidade em água do material é uma característica determinante na aplicação na indústria de alimentos. Alta solubilidade pode ser benéfica em alguns casos, como os filmes projetados para serem solúveis antes do consumo do produto, mas a maioria das aplicações necessita de materiais insolúveis para manter a integridade dos produtos (GHASEMLOU; KHODAIYAN; OROMIEHIE, 2011). Geralmente, a natureza hidrofílica da proteína e a quantidade adicionada de plastificantes hidrofílicos, como o glicerol, podem enfraquecer as

ligações covalentes intermoleculares das cadeias dos polipeptídeos e melhorar a flexibilidade do filme, mas influenciam na baixa resistência à água. (LUPING; MIAO; JINGWEN, 2013). A Figura 24 apresenta o gráfico do aumento contínuo da concentração de CaCO_3 na solubilidade dos filmes.

Figura 24 - Gráfico do efeito do aumento contínuo da concentração de CaCO_3 na solubilidade dos filmes.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Há um efeito significativo da adição de CaCO_3 na solubilidade (Tabela 10) e a incorporação de CaCO_3 nas cadeias poliméricas teve um efeito positivo, ou seja, a adição de maiores quantidades de CaCO_3 aumenta a solubilidade dos filmes. A equação 6 apresenta o modelo de efeitos da solubilidade representado pela variável y_2 .

$$y_2 = 8,851 + 1,356.x_1 \quad (6)$$

Os valores de solubilidade estão no intervalo encontrado na literatura de 7 a 12,5% (PENA-SERNA; LOPES-FILHO, 2013). Quando os filmes são expostos à água, as interações de van der Waals entre as cadeias poliméricas são dissociadas por uma competição com as

moléculas de água, resultando na deformação e dissolução das partículas hidrofílicas do filme (KIM et al., 2015). Os efeitos da agitação e da interação entre a agitação e a adição de CaCO_3 não apresentaram uma diferença significativa ($p < 0,05$) na solubilidade dos filmes.

A boa resistência dos filmes de zeína à água se deve à natureza hidrofóbica da proteína, mas a afinidade dos plastificantes e dos elementos adicionados na cadeia polimérica influenciam a solubilidade (GU; WANG; ZHOU, 2013). A concentração em maior quantidade de CaCO_3 aumentou os elementos hidrofílicos do filme, além de modificar a homogeneidade da matriz polimérica e apresentar agregados de CaCO_3 que podem criar espaços maiores entre as cadeias da matriz, possibilitando as moléculas de água penetrarem e dissolver os elementos solúveis do filme mais facilmente (WANG et al., 2017).

5.2.2.4. Permeabilidade ao vapor d'água (PVA)

Permeabilidade ao vapor d'água (PVA) corresponde geralmente à taxa de transmissão das moléculas de água através da área exposta, da espessura do filme e à diferença da força de pressão do vapor de água entre os ambientes. A homogeneidade da microestrutura, a superfície hidrofóbica, a presença de poros ou cavidades, impedimento estérico, a tortuosidade na microestrutura e a relação hidrofílica/hidrofóbica do polímero são os principais fatores que influenciam a PVA (SHI et al., 2012; WANG; PADUA, 2005).

A permeabilidade dos filmes pode ser alterada por vários fatores, como a natureza química da matriz polimérica, a quantidade e tipo de plastificante utilizado e outros fatores que alteram a interação do filme com a água. A zeína forma filmes com PVA relativamente mais baixo que as outras proteínas devido à característica hidrofóbica da grande proporção de amino ácidos hidrofóbicos (WANG; PADUA, 2004). Conforme a Tabela 9, os valores da PVA variaram de $(0,809 \pm 0,203) \times 10^{-}$

¹⁰ até $(1,214 \pm 0,333) \times 10^{-10}$ (g)/(s-m-Pa) para todos os filmes. Era esperado uma tendência hidrofílica na matriz polimérica com a adição de CaCO_3 que aumentou a heterogeneidade da microestrutura, contudo a diferença entre os valores de PVA não foi significativa.

A água possui um efeito plastificante nos filmes à base de proteína, mesmo não sendo necessariamente um bom solvente. A plastificação é atribuída à teoria do volume livre, em que a água aumenta o volume livre do polímero e possibilita uma mobilidade maior das cadeias poliméricas. A flexibilidade maior na matriz possibilita a difusão da água, resultando em uma alta PVA (WANG; PADUA, 2004). Então a utilização de plastificantes hidrofóbicos, como o ácido oleico, e a presença de caminhos tortuosos nas camadas da matriz polimérica, além da redução da porosidade ou cavidades na superfície, podem inibir a difusão de água através do filme (YUEMENG et al., 2015).

5.2.2.5. *Propriedades Mecânicas*

As propriedades mecânicas refletem a durabilidade do filme e, dependendo da aplicação, a habilidade do filme em reforçar a integridade mecânica dos produtos (WANG et al., 2017). A rigidez do material é, usualmente, o principal motivo da utilização de partículas de reforço, as quais se desprendem da matriz polimérica quando uma força de cisalhamento é aplicada. O desprendimento da partícula altera o estado de tensão do material em torno da partícula e induz uma extensa deformação plástica nas cadeias poliméricas, como fissuras múltiplas e forças de cisalhamento (MELO; AOUADA; MOURA, 2017; ZUIDERDUIN et al., 2003).

As propriedades mecânicas dos filmes são diretamente associadas à distribuição dos elementos e às interações intra e intermoleculares. A combinação, orientação e uniformidade da rede das cadeias poliméricas afetam a força dos filmes compósitos (WANG et al., 2017).

A Tabela 11 apresenta os resultados das variáveis dependentes: alongação na ruptura (E%), força máxima (N) e módulo de Young (E), dos filmes obtidos pelo esquema fatorial da Tabela 2. A Tabela 12 apresenta o nível de significância da ANOVA de cada fator e suas interações.

Tabela 11 - Resultados de Alongação na Ruptura (%), Limite de Resistência à Tração (MPa) e Módulo de Young (MPa) dos filmes.

Filme	Alongação na Ruptura (%)	Limite de Resistência à Tração (MPa)	Módulo de Young (MPa)
Mec/zeína	74,000 ± 15,600	2,317 ± 1,298	0,846 ± 0,732
Mec/1%CaCO ₃	90,660 ± 8,260	1,839 ± 0,165	0,762 ± 0,657
Mec/2%CaCO ₃	72,140 ± 11,550	2,075 ± 0,154	0,725 ± 0,238
Mec/3%CaCO ₃	6,342 ± 0,876	4,978 ± 0,918	98,683 ± 0,694
Ult/zeína	40,350 ± 8,940	2,744 ± 0,115	1,522 ± 0,131
Ult/1%CaCO ₃	68,600 ± 12,580	2,186 ± 0,437	0,973 ± 0,067
Ult/2%CaCO ₃	46,200 ± 10,710	2,186 ± 0,432	6,590 ± 1,620
Ult/3%CaCO ₃	2,860 ± 3,280	4,130 ± 0,828	67,140 ± 1,173

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 12 - Nível de significância dos efeitos principais e das interações segundo a análise de variância (ANOVA) das propriedades mecânicas dos filmes.

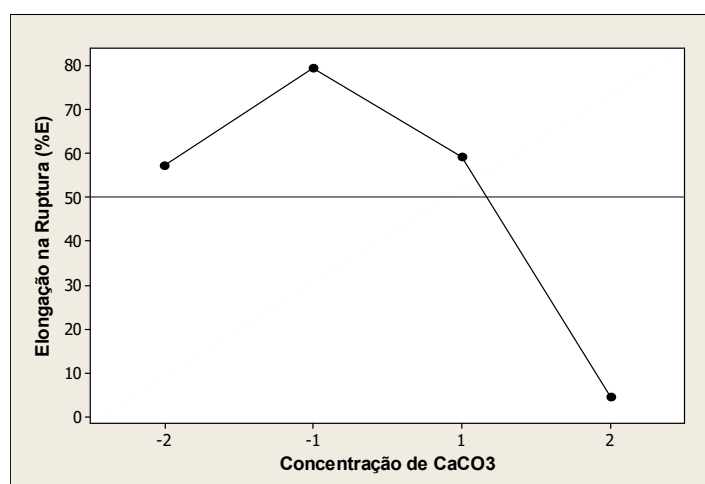
Efeitos principais e interações	Alongação na ruptura (%E)	Limite de resistência à tração (R _{máx})	Módulo de Young (E)
	Valor p		
A (CaCO ₃)	<0,001	0,002	<0,001
B (agitação)	0,003	0,978	<0,001
A*B	0,259	0,550	<0,001

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os filmes de zeína sem a adição de plastificantes são frágeis e possuem valores baixos de resistência à tração e pouca elongação na ruptura, os quais são os dois parâmetros utilizados normalmente para avaliar as propriedades mecânicas de um filme. A adição de ácido oleico e glicerol alteram as propriedades mecânicas dos filmes de zeína, em que o efeito plastificante atua na estrutura molecular com interações hidrofóbicas (ácido oleico) e hidrofílicas (glicerol) da proteína (SCRAMIN et al., 2011; XU; CHAI; ZHANG, 2012).

A Figura 25 apresenta o gráfico dos efeitos do aumento contínuo da concentração de CaCO_3 e da agitação na elongação dos filmes. A porcentagem de elongação dos filmes de zeína foi calculada pela divisão da elongação determinada pela curva de tensão obtida no experimento pelo comprimento original da amostra (LAI; PADUA; WEI, 1997) e foi alterada significativamente ($p < 0,05$) pelos efeitos do aumento da concentração de CaCO_3 e da agitação (Tabela 12).

Figura 25 - Gráfico dos efeitos do aumento contínuo da concentração de CaCO_3 e da agitação na elongação dos filmes.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A equação 7 apresenta o modelo de efeitos da porcentagem de alongação à ruptura representado pelas variáveis y_3 .

$$y_3 = 50,143 + 29,488.x_1 + 10,639.x_2 \quad (7)$$

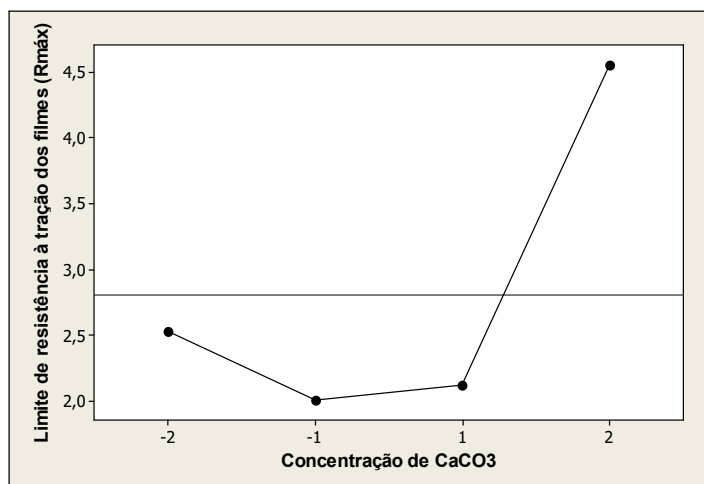
As partículas de reforço apresentaram um efeito positivo no filme com 1% de CaCO_3 , aumentando a alongação do filme. A partícula pode ter facilitado o deslizamento entre as cadeias poliméricas durante a deformação, resultando em uma porcentagem de alongação maior (WANG et al., 2017).

Partículas grandes, ou agregados como observados nos filmes com 2 e 3% de CaCO_3 , alteram a abrasão e a aparência do filme, além de proporcionar um forte efeito adverso durante a deformação e, formar falhas na microestrutura, que diminuem a porcentagem de alongação (ZUIDERDUIN et al., 2003).

A aplicação de ultrassom apresentou valores de alongação menores com relação aos filmes com agitação mecânica que pode ser devido à heterogeneidade da microestrutura. Segundo Higuera-Barraza et al. (2016), o ultrassom rompe os agregados de zeína, os quais se reorganizam durante a etapa de formação do filme, e altera as interações hidrofóbicas e a microestrutura dos filmes. O efeito da interação entre a agitação e a adição de CaCO_3 não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) na alongação dos filmes.

O limite de resistência à tração é usualmente relacionado à tensão máxima que o material pode suportar antes de uma deformação permanente ou fratura (LAI; PADUA; WEI, 1997). A Figura 26 apresenta o gráfico do aumento contínuo da concentração de CaCO_3 no limite de resistência à tração dos filmes. A adição de CaCO_3 alterou significativamente ($p < 0,05$) os valores do limite de resistência dos filmes ($R_{\text{máx}}$).

Figura 26 - Gráfico do efeito do aumento contínuo da concentração de CaCO_3 sobre o limite de resistência à tração dos filmes.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O aumento da concentração de CaCO_3 nos filmes com 1 e 2% de CaCO_3 apresentaram valores menores de $R_{máx}$. A equação 8 apresenta o modelo de efeitos da porcentagem de alongação representado pela variável y_4 .

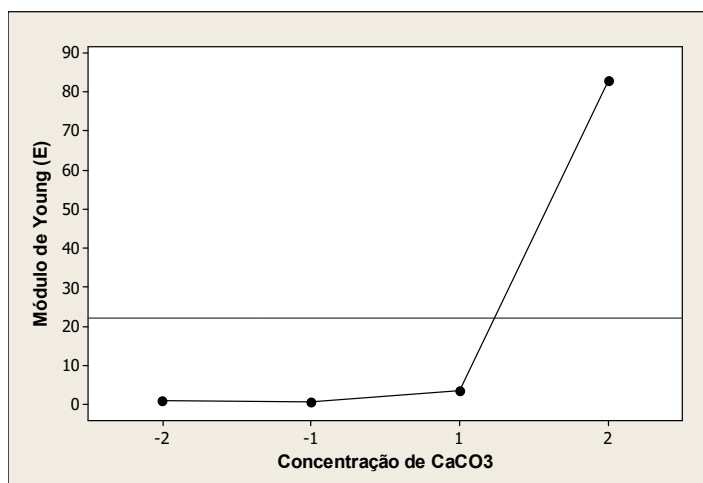
$$y_4 = 2,807 - 0,794.x_1 \quad (8)$$

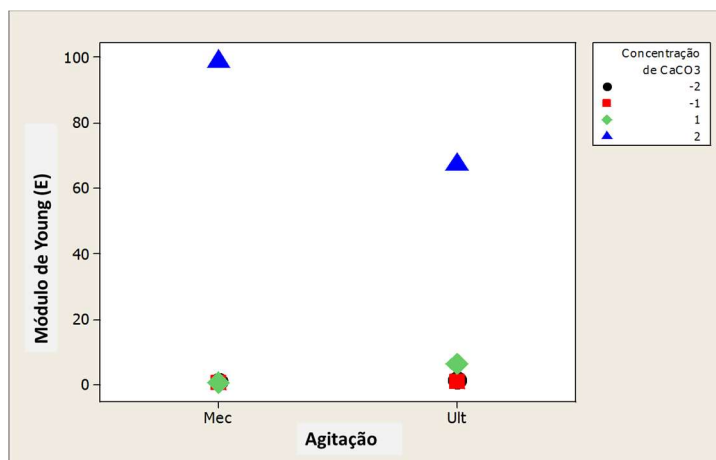
Os resultados são coerentes com as análises de FTIR que demonstrou a ausência de ligações químicas entre o elemento de reforço e a cadeia polimérica. A presença de CaCO_3 no filme modifica as interações da estrutura amorfa da zeína, como verificado pela análise de WAXS, em que a partícula desprende, ou desprende parcialmente, da matriz e distribui a tensão através da formação de espaços, resultando na diminuição da força de coesão entre as cadeias poliméricas. Os filmes com 3% de CaCO_3 continham as maiores partículas de agregados que elevam a rigidez e a força de impacto nos filmes ao causar uma homogeneização insuficiente (ZUIDERDUIN et al., 2003).

O limite de resistência à tração é analisado durante deformações consideráveis em que das propriedades mecânicas possuem uma dependência das interações entre a partícula e a cadeia polimérica. O limite de resistência aumenta quando a partícula não desprende da interface polimérica pela alta adesão e pode ser atribuído à presença de interações de hidrogênio entre a matriz e o elemento de reforço. As interações interfaciais permitem a transferência da tensão da matriz para as partículas, que aumentam a força do compósito ao suportar a distribuição de tensão (JIANG et al., 2016; LOREVICE et al., 2016).

O módulo de Young (E) pode ser relacionado à rigidez do material e pode ser medida pela força necessária para deformar um corpo de teste, que é representada pela divisão da tensão pela deformação na região elástica (LAI; PADUA; WEI, 1997). A Figura 27 apresenta o gráfico das interações do aumento contínuo da concentração de CaCO_3 e da agitação no módulo de Young dos filmes.

Figura 27 - Gráfico dos efeitos e da interação do aumento contínuo da concentração de CaCO_3 e do Módulo de Young nos filmes.





Fonte: Elaborado pelo autor.

A adição de CaCO₃ e a agitação alteraram significativamente ($p < 0,05$) os valores do módulo de Young, assim como a interação dos fatores. A equação 9 apresenta o modelo de efeitos dos fatores no módulo de Young (E) representado pela variável y_5 .

$$y_5 = 22,155 - 20,971x_1 + 3,099.x_2 - 3,437.x_1x_2 \quad (9)$$

A adição de partículas de reforço teve pouca influência no módulo de Young em baixas concentrações (1 e 2% de CaCO₃), contudo sofre uma grande variação nos filmes com 3% de CaCO₃. Segundo Menbari, Ghasemi e Ghasemi (2016) existem duas propostas para este tipo de comportamento: 1. A adesão entre a matriz e a partícula é forte o bastante para favorecer o aumento do módulo de elasticidade, o qual é calculado na região elástica de baixa deformação. 2. A grande área superficial e a alta energia superficial das nanopartículas de CaCO₃ favorece a formação de aglomerados que agem como locais de concentração de tensão, e, conseqüentemente, iniciam a falha.

A uniformidade maior da microestrutura dos filmes com a agitação mecânica apresentou resultados superiores do módulo de Young e da porcentagem de alongação à ruptura nos filmes com 3% de CaCO₃, se comparado aos filmes com aplicação de ultrassom, evidenciando a

correlação entre a densidade da microestrutura e das interações entre as cadeias poliméricas nas propriedades mecânicas (DEPALLE et al., 2014).

A aplicação de ultrassom inibiu a formação de agregados e produziu filmes com maior força de adesão entre as partículas e o polímero, resultando em módulos de elasticidade superiores nos filmes abaixo da concentração crítica (1 e 2% de CaCO_3). O módulo de elasticidade é relacionado com a resistência do material à deformação elástica ou rigidez, onde quanto mais rígido o material, maior é o valor do módulo ou menor é a deformação elástica frente a aplicação de uma dada tensão (CALLISTER, 2000). Contudo, a agitação mecânica apresentou melhores valores na porcentagem de alongação, já que as partículas com tamanho superior possuem força de adesão menor e desprendem mais facilmente das cadeias poliméricas, facilitando o modelo descrito por Zuiderduin et al., (2003).

O aumento da concentração de CaCO_3 chega a uma quantidade crítica nos filmes com 2% de CaCO_3 , verificado por meio da análise WAXS e MEV. Segundo Arfat et al. (2017), a adição de partículas acima da concentração crítica, como os filmes com 3% CaCO_3 , resulta em uma sobrecarga ou acumulação de partículas, que forma agregados, e filmes heterogêneos. A incorporação de CaCO_3 nos filmes melhora as propriedades mecânicas, contudo o material precisa de uma microestrutura homogênea. Altas concentrações de CaCO_3 podem formar agregados que comprometem as propriedades mecânicas dos filmes.

6. CONCLUSÃO

As partículas de CaCO_3 (calcita) tendem a se agregar durante o processo de dispersão em solução de etanol a 95% (v/v) e precisam de técnicas como a aplicação de ultrassom para alcançar as dimensões nanométricas, contudo o ultrassom não é uma técnica uniforme e

ocasiona o aparecimento de uma curva de distribuição de tamanho bimodal.

O CaCO_3 foi incorporado entre as ligações de α -hélices laterais dos filmes de zeína segundo os difratogramas do WAXS, sendo que os filmes de zeína com 3% de CaCO_3 apresentaram a maior heterogeneidade da microestrutura devido à ausência do espaço d característico dos filmes de zeína.

A adição de 1% de CaCO_3 aumentou a intensidade dos picos de difração com uma integração maior dos componentes dos filmes, contudo o aumento da concentração de CaCO_3 pode formar agregados que apresentam o efeito contrário na região amorfa dos filmes.

A interação dos componentes e a dispersão dos plastificantes é afetada com o aumento da concentração de CaCO_3 na matriz polimérica, que forma agregados e deixam a superfície e a microestrutura dos filmes heterogêneas.

A aplicação de ultrassom inibiu o aparecimento de agregados nos filmes com adição de 1% de CaCO_3 , que apresentou microestrutura mais homogênea, contudo com a adição 3% de CaCO_3 , apresentou aspecto e microestrutura mais heterogênea.

A espessura e a PVA não foram influenciados significativamente ($p < 0,05$) pelos fatores concentração de CaCO_3 e agitação.

O aumento da concentração de partículas de reforço tenderia a aumentar a opacidade devido as propriedades de dispersão da luz do CaCO_3 , mas produziu filmes com microestruturas menos densas que possibilitaram a passagem de luz e apresentaram opacidade menor com relação ao biomaterial sem adição de CaCO_3 .

A adição de CaCO_3 nos filmes possibilitou a difusão da água nas regiões hidrofílicas da microestrutura que foram solubilizadas mais facilmente durante a análise de solubilidade.

Os efeitos da agitação foram significativos somente na porcentagem de alongação e no módulo de Young dos filmes, sendo que a interação dos fatores ocorreu somente no módulo de Young.

A porcentagem de alongação apresentou resultados positivos com a adição de 1% de CaCO_3 , sendo que agitação mecânica formou filmes com partículas com tamanho superior, as quais possuem menor força de adesão e desprendem mais facilmente das cadeias poliméricas.

O limite de resistência à tração dos filmes apresentou resultados coerentes com as análises de microestrutura, onde a heterogeneidade e a presença de agregados aumentam a rigidez e a força de impacto dos filmes.

A aplicação de ultrassom inibiu a formação de agregados e produziu filmes com maior força de adesão entre as partículas e o polímero, resultando em módulos de elasticidade superiores.

Os filmes com 3% de CaCO_3 apresentaram microestruturas heterogêneas com propriedades mecânicas características de um material rígido: valores superiores de limite de resistência a tração e do módulo de Young, mas com baixa elasticidade.

A incorporação de CaCO_3 nos filmes melhorou as propriedades mecânicas, contudo altas concentrações de CaCO_3 pode formar agregados que comprometem as propriedades mecânicas dos filmes.

6.1. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

As conclusões deste trabalho sugerem propostas para futuros trabalhos com filmes a partir de zeína e incorporação de partículas de CaCO_3 .

Uma das propostas é a continuidade do estudo da incorporação do material na matriz polimérica, utilizando outras técnicas de dispersão ou alteração química da partícula de CaCO_3 afim de proporcionar a distribuição homogênea e, principalmente, evitar a aglomeração de partículas durante a dispersão.

Outra proposta é a variação da concentração dos plastificantes e a avaliação da interação dos efeitos do mesmo com a presença de partículas de reforço.

Outra possibilidade é a variação da partícula e do tamanho da mesma, afim de alterar as propriedades do filme como as interações hidrofóbicas / hidrofílicas do biomaterial e a adesão da partícula na matriz polimérica, para futuras aplicações.

Por fim sugere-se a continuidade dos estudos das propriedades funcionais, da análise toxicológica e da biodegradabilidade dos filmes para a realização de testes de aplicação do material. Testes como o recobrimento de frutas e hortaliças, utilização de embalagens secundárias para alimentos e produção em escala industrial seria alguns exemplos de aplicações.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C.B.; **Características estruturais e funcionais de biofilmes produzidos com zeína e óleos vegetais comestíveis**. São José do Rio Preto, SP: 2010. Originalmente apresentada como dissertação de doutorado, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista, 2010.

ALMEIDA, C.B.; CATELAM, K.T.; CORNÉLIO, M.L.; LOPES-FILHO, J.F. Morphological and structural characteristics of zein biofilms with added xanthan gum. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 48, n. 1, p. 19-27, 2010.

ANDERSON, T.J.; LAMSAL, B.P. Development of new method for extraction of α -Zein from corn gluten meal using different solvents. **Cereal Chemistry**, Minnesota, v. 88, n. 4, p. 356-362, 2011.

ARFAT, Y.A.; AHMED, J.; HIREMATH, N.; AURAS, R.; JOSEPH, A. Thermo-mechanical, rheological, structural and antimicrobial properties of bionanocomposite films based on fish skin gelatin and silver-copper nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 62, p. 191-202, 2017.

ARGOS, P.; PEDERSEN, K.; MARKS, M.D.; LARKINS, B.A. A structural model for maize zein proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 257, p. 9984–9990, 1982.

ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D882 – 12 – Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting**. West Conshohocken, 2012.

ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM E96/E96M – 16 – Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials**. West Conshohocken, 2016.

AWAD, T.S.; MOHARRAM, H.A.; SHALTOUT, O.E.; ASKER, D.; YOUSSEF, M.M. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. **Food Research International**, Amsterdam, v. 48, p. 410-427, 2012.

BARTH, A. Review: infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Budapest, v. 1767, n. 9, p. 1073-1101, 2007.

BASIAK, E.; DEBEAUFORT, F.; LENART, A. Effect of oil lamination between plasticized starch layers on film properties. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 195, p. 56-63, 2016.

BHANVASE, B.A.; PINJARI, D.V.; GOGATE, P.R.; SONAWANE, S.H.; PANDIT, A.B. Process intensification of encapsulation of functionalized CaCO₃ nanoparticles using ultrasound assisted emulsion polymerization. **Chemical Engineering and Processing**, Amsterdam, v. 50, p. 1160-1168, 2011.

BHANVASE, B. A.; SONAWANE, S.H. Ultrasound assisted in situ emulsion polymerization for polymer nanocomposite: A review. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, Amsterdam, v. 85, p. 86-107, 2014.

BOUWMEESTER, H.; BRANDHOFF, P.; MARVIN, H.J.P.; WEIGEL, S.; PETERS, R.J.B. State of the safety assessment and current use of

nanomaterials in food and food production. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 40, p. 200-210, 2014.

CALLISTER, W.D. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. 5ª edição. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

CARTER, R., RECK, D.R. **Low temperature solvent extraction process for producing high purity zein**. U.S. patent 3,535,305, 20 out. 1970.

CORRADINI, E.; CURTI, P.S.; MARTINS, A.F.; RUBIRA, A.F.; MUNIZ, E. C.; Recent advances in food-packing, pharmaceutical and biomedical applications of zein and zein-based materials. **International Journal of Molecular Science**, Basel, v. 15, n. 12, p. 22438-22470, 2014.

COLES, D.; FREWER, L.J. Nanotechnology applied to European food production – A review of ethical and regulatory issues. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 34, p. 32-43, 2013.

DASGUPTA, N.; RANJAN, S.; MUNDEKKAD, D.; RAMALINGAM, C.; SHANKER, R.; KUMAR, A. Nanotechnology in agro-food: From field to plate. **Food Research International**, Amsterdam, v. 69, p. 381-400, 2015.

DELMAS, H.; BARTHE, L. Ultrasonic mixing, homogenization, and emulsification in food processing and other applications. In: GALLEGU-JUÁREZ, J. A.; GRAFF, K. F. **Power ultrasonics: application of high-intensity ultrasound**. Amsterdam: Elsevier, 2015. Cap. 4, p. 757-791.

DENAVI, G.; TAPIA-BLÁCIDO, D.R.; AÑON, M.C.; SOBRAL, P.J.A.; MAURI, A.N.; MENEGALLI, F.C. Effects of drying conditions on some

physical properties of soy protein films. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 90, p. 341-349, 2009.

DEPALLE, B.; QIN, Z.; SHEFELBINE, S.J.; BUEHLER, M.J. Influence of cross-link structure, density and mechanical properties in the mesoscale deformation mechanisms of collagen fibrils. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Amsterdam, v. 52, p. 1-13, 2014.

EL-SHEIKH, S.M.; EL-SHERBINY, S.; BARHOUM, A.; DENG, Y. Effects of cationic surfactant during the precipitation of calcium carbonate nanoparticles on their size, morphology, and other characteristics. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 422, p. 44-49, 2013.

ESEN, A. Separation of alcohol-soluble proteins (zeins) from maize into 3 fractions by differential solubility. **Plant Physiol**, Columbia, v. 80, p. 623–627, 1986.

ESEN, A. A proposed nomenclature for the alcoholsoluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays* L.). **Journal of Cereal Science**, Amsterdam, v. 5, p. 117–128, 1987.

FORATO, L.A.; BERNARDES-FILHO, R.; COLNAGO, L.A. Protein structure in KBr pellets by infrared spectroscopy. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v. 259, p. 136-141, 1998.

FABRA, M.J.; LÓPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J.M. On the use of different hydrocolloids as electrospun adhesive interlayers to enhance the barrier properties of polyhydroxyalkanoates of interest in fully renewable food

packaging concepts. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 39, p. 77-84, 2014.

GAONA-SÁNCHEZ, V.A.; CALDERÓN-DOMÍNGUEZ, G.; MORALES-SÁNCHEZ, E.; CHANONA-PÉREZ, J.J.; VELÁSQUEZ-DE LA CRUZ, G.; MÉNDEZ-MÉNDEZ, J.V.; TERRÉS-ROJAS, E.; FARRERA-REBOLLO, R.R. Preparation and characterisation of zein films obtained by electrospraying. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 49, p. 1-10, 2015.

GEORGET, D.M.R.; BARKER, S.A.; BELTON, P.S. A study on maize proteins as a potential new tablet excipient. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam v. 69, n. 2, p. 718-726, 2008.

GHANBARZADEH, B.; OROMIEHIE, A.R.; MUSAVI, M.; D-JOMEH, Z.M.; RAD, E.R.; MILANI, J. Effect of plasticizing sugars on rheological and thermal properties of zein resins and mechanical properties of zein films. **Food Research International**, Amsterdam v. 39, n. 8, p. 882-890, 2006.

GHASEMLOU, M.; KHODIYAH, F.; OROMIHIE, A. Physical, mechanical, barrier, and thermal properties of polyol-plasticized biodegradable edible film made from kefir. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, n. 84, p. 477-483, 2011.

GONZÁLEZ, A.; IGARZABAL, C.I.A. Nanocrystal-reinforced soy protein films and their application as active packaging. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 43, p. 777-784, 2015.

GORRASI, G.; VERTUCCIO, L. Evaluation of zein/halloysite nanocontainers as reservoirs of active molecules for packaging applications:

preparation and analysis of physical properties. **Journal of Cereal Science**, Amsterdam, v. 70, p. 66-71, 2016.

GU, L.; WANG, M.; ZHOU, J. Effects of protein interactions on properties and microstructure of zein–gliadin composite films. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 119, p. 288-298, 2013.

GUOHUA, W.; YUJUN, W.; SHENLIN, Z.; JIADING, W. Preparation of ultrafine calcium carbonate particles with micropore dispersion method. **Powder Technology**, Amsterdam, v. 172, p. 82 – 88, 2007.

HANDFORD, C.; DEAN, M.; HENCHION, M.; SPENCE, M.; ELLIOTT, C.T.; CAMPBELL, K. Implications of nanotechnology for the agri-food industry: Opportunities, benefits and risks. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 40, p. 226-241, 2014.

HARI-BALA; XUEFENG, D.; YIMING, G.; YANHUI, D.; CHENGYU, W.; MINGGANG, L.; ZICHEN, W. Multigram scale synthesis and characterization of monodispersed cubic calcium carbonate nanoparticles. **Materials Letters**, Amsterdam, v. 60, p. 1515-1518, 2006.

HARIHARAN, M.; VARGHESE, N.; CHERIAN, A.B; SREENIVASAN, P.V.; PAUL, J.; ANTONY, A. Synthesis and characterisation of CaCO₃ (Calcite) nano particles from cockle shells using chitosan as precursor. **International Journal of Scientific and Research Publications**, AHMEDABAD, v. 4, n. 10, p. 1-5, 2014.

HASSAN, T.A.; RANGARI, V.K.; RANA, R.K.; JEELANI, S. Sonochemical effect on size reduction of CaCO₃ nanoparticles derived from waste

eggshells. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 20, p. 1308-1315, 2013.

HEELEY, E.L.; HUGHES, D.J.; EL AZIZ, Y.; TAYLOR, P.G.; BASSINDALE, A.R. Morphology and crystallization kinetics of polyethylene/long alkyl-chain substituted Polyhedral Oligomeric Silsesquioxanes (POSS) nanocomposite blends: A SAXS/WAXS study. **European Polymer Journal**, Amsterdam, v. 51, p. 45-56, 2014.

HIGUERA-BARRAZA, O.A.; DEL TORO-SANCHEZ, C.L.; RUIZ-CRUZ, S.; MÁRQUEZ-RÍOS, E. Effects of high-energy ultrasound on the functional properties of proteins. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 36, p. 558-562, 2016.

HUEY-MIN, L.; PADUA, G.W. Water vapor barrier properties of zein films plasticized with oleic acid. **Cereal Chemistry**, Minnesota, v. 75, n. 2, p. 194-199, 1998.

JÄÄSKELÄINEN, A.S.; HOLOPAINEN-MANTILA, U.; TAMMINEN, T.; VUORINEN, T. Endosperm and aleurone cell structure in barley and wheat as studied by optical and Raman microscopy. **Journal of Cereal Science**, Amsterdam, v. 57, n. 3, p. 543-550, 2013.

JIANG, S.; LIU, C.; WANG, X.; XIONG, L.; SUN, Q. Physicochemical properties of starch nanocomposite films enhanced by self-assembled potato starch nanoparticles. **LWT – Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 69, p. 251-257, 2016.

JIN, J.; MA, H.; WANG, K.; YAGOUB, A.E.A.; OWUSU, J.; QU, W.; He, R.; ZHOU, C.; Ye, X. Effects of multi-frequency power ultrasound on the

enzymolysis and structural characteristics of corn gluten meal, **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 24, p. 55-64, 2015.

JUN, L.; QIUYANG, X.; SIMON, W.; JI, L.; QINGRONG, H.; LUDESCHER, R. D. Influence of glycerol on the molecular mobility, oxygen permeability and microstructure of amorphous zein films. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 44, p. 94-100, 2015.

KIM, S.R.B.; CHOI, Y.-G.; KIM, J.-Y.; LIM, S.-T. Improvement of water solubility and humidity stability of tapioca starch film by incorporating various gums. **LWT – Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 64, p. 475-482, 2015.

KISS, A.; FEKETE, E.; PUKÁNSZKY, B. Aggregation of CaCO₃ particles in PP composites: effect of surface coating. **Composites Science and Technology**, Amsterdam, v. 67, n. 7-8, p. 1574-1583, 2007.

KNOOR, D.; FROEHLING, A.; JAEGER, H.; REINEKE, K.; SCHLUETER, O.; SCHOESSLER, K. Emerging technologies in food processing. **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 2, p. 203–235, 2011.

LAI, H.M.; PADUA, G.W. Properties and microstructure of plasticized zein films. **Cereal Chemistry**, Minnesota, v. 74, p. 771–775, 1997.

LAI, H.M.; PADUA, G.W.; WEI, L.S. Properties and Microstructure of Zein Sheets Plasticized with Palmitic and Stearic Acids. **Cereal Chemistry**, Minnesota v. 74, p. 83–90, 1997.

LAWTON, J. W. Zein: a history of processing and use. **Cereal Chemistry**, Minnesota, v. 79, n. 1, p. 1-18, 2002.

LIAN-HUA, F.; MING-GUO, M.; JING, B.; FU, D.; XUAN, D. Research on the formation mechanism of composites from lignocelluloses and CaCO_3 . **Materials Science and Engineering C**, Amsterdam, v. 44, p. 216-224, 2014.

LIXIA, B.; SIMEI, Y.; XIN, L.; JINGXIN, L.; QIUE, C.; JILIANG, W. Fabrication and characterization of a novel hydrophobic CaCO_3 grafted by hydroxylated poly(vinyl chloride) chains. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 357, p. 564-572, 2015.

LOREVICE, M.V.; OTONI, C.G.; MOURA, M.R.; MATTOSO, L.H.C. Chitosan nanoparticles on the improvement of thermal, barrier, and mechanical properties of high- and low-methyl pectin films. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 52, p. 732-740, 2016.

LUPING, G.; MIAO, W.; JINGWEN, Z. Effects of protein interactions on properties and microstructure of zein–gliadin composite films. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 119, n. 2, p. 288-298, 2013.

MAGOSHI, J.; NAKAMURA, S.; MURAKAMI, K.I. Structure and physical-properties of seed proteins.1. Glass-transition and crystallization of zein protein from corn. **Journal of Applied Polymer Science**, Nova York, v. 45, p. 2043–2048, 1992.

MARCUZZO, E.; PERESSINI, D.; DEBEAUFORT, F.; SENSIDONI, A. Effect of ultrasound treatment on properties of gluten-based film.

Innovative Food Science and Emerging Technologies, Amsterdam, v. 11, p. 451-457, 2010.

MASAMBA, K.; LI, Y.; ZHONG, F. Effect of homogenization stirring speed on mechanical and water barrier properties of gallic acid treated zein-oleic acid composite films. **Food Packaging and Shelf Life**, Amsterdam, v. 10, p. 97-105, 2016.

MATSUSHIMA, N.; DANNO, G.; TAKEZAWA, H.; IZUMI, Y. Three-dimensional structure of maize alpha-zein proteins studied by small-angle X-ray scattering. **Biochimica et Biophysica Acta**, Budapeste, v. 1339, p. 14–22, 1997.

MELO, P.T.S.; AOUADA, F.A.; MOURA, M.R. Fabricação de Filmes Bionanocompósitos à Base de Pectina e Polpa de Cacau com Potencial Uso como Embalagem para Alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 247-251, 2017.

MIHINDUKULASURIYA, S.D.F.; LIM, L. -T.; Nanotechnology development in food packaging: A review. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam v. 40, n. 2, p. 149-167, 2014.

MIRANDA, R.A.; DUARTE, J.O.; GARCIA, J.C. Mercado e comercialização. **Embrapa Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, Out. 2012. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_8_ed/mercado.htm>. Acesso em: 18 jul. 2016.

MONNIER, H.; WILHELM, A.M.; DELMAS, H. The influence of ultrasound on micromixing in a semi-batch reactor. **Chemical Engineering Science**, Amsterdam v. 54, p. 2953–2961, 1999.

MONTGOMERY; D. C. Introduction to factorial designs. In:_____. **Design and Analysis of Experiments**. 6. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2013. cap. 5, p. 183-225.

MORAES, J.O.; SCHEIBE, A.S.; AUGUSTO, B.; CARCIOFI, M.; LAURINDO, J.B. Conductive drying of starch-fiber films prepared by tape casting: drying rates and film properties. **LWT – Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 64, p. 356-366, 2015.

NADERINEJAD, S.; ZAEFARIAN, F.; ABDLLAHI, M.R.; HASSANABADI, A.; KERMANSHAHI, H.; RAVINDRAN, V. Influence of feed form and particle size on performance, nutrient utilisation, and gastrointestinal tract development and morphometry in broiler starters fed maize-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 215, p. 92-104, 2016.

NARA, S., KOMIYA, T., Studies on the relationship between water-saturated state and crystallinity by the diffraction method for moistened potato starch. **Starch/Starke**, Nova York, v. 35, p. 407–410, 1983.

OTHMAN, S.H. Bio-nanocomposite Materials for Food Packaging Applications: Types of Biopolymer and Nano-sized Filler. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, Amsterdam, v. 2, p. 296-303, 2014.

PAES, M.C.D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. **Embrapa Milho e Sorgo: Circular técnica 75**, Sete Lagoas, Dez. 2006. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2006/circular/Circ_75.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2016.

PALIWAL, R.; PALAKURTHI, S. Zein in controlled drug delivery and tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 189, p. 108-122, 2014.

PANDA, A.K.; LAVANYA, G.; REDDY, E.P.K.; RAO, S.V.R.; RAJU, M.V.L.N.; SUNDER, G. S. Utilization of quality protein maize in the diet of white leghorn layers. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 172, p. 210-216, 2012.

PAPALIA, I.S.; LONDERO, P.M.G. Extração de zeína e sua aplicação na conservação dos alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 2, p. 552-559, 2015.

PEELMAN, N.; RAGAERT, P.; MEULENAER, B.; ADONS, D.; PEETERS, R.; LUDWIG, C.; IMPE, F.V.; DEVLIEGHERE, F. Application of bioplastics for food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 128-141, 2013.

PARK, W.K.; KO, S.-J.; LEE, S. W.; CHO, K.-H; AHN, J.-W.; HAN, C. Effects of magnesium chloride and organic additives on the synthesis of aragonite precipitated calcium carbonate. **Journal of Crystal Growth, Amsterdam**, v. 310, p. 2593-2601, 2008.

PENA-SERNA, C.; LOPES-FILHO, J.F.; Influence of ethanol and glycerol concentration over functional and structural properties of zein-oleic acid films. **Materials Chemistry and Physics**, Amsterdam, v. 142, n. 2-3, p. 580-585, 2013.

PENA-SERNA, C.; LOPES-FILHO, J.F.; Biodegradable Zein-Based Blend Films: Structural, Mechanical and Barrier Properties. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 53, n. 3, p. 348–353, 2015.

PRANDINI, A.; SIGOLO, S.; MORLACCHINI, M.; MAROCCO, A.; LO-PINTO, M. High-protein maize in diets for growing pigs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 165, p. 105-110, 2011.

RHIM, J.-W.; PARK, H.-M; HA, C.-S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, Amsterdam, v. 38, p. 1629-1652, 2013.

RIBEIRO, W.X. **Caracterização de biofilme à base de zeína e ácido oléico adicionado de nanocarbonato**. São José do Rio Preto, SP: 2014. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista, 2014.

RODRIGUES, D.C.; CUNHA, A.R.; BRITO, E.S.; AZEREDO, H.M.C.; GALLÃO, M.I. Mesquite seed gum and palm fruit oil emulsion edible films: influence of oil content and sonication. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 56, p. 227-235, 2016.

RRUFF project. Calcite_R0400701_Infrared_Infrared_Data_Processed_224.txt. Disponível em <<http://rruff.info/calcite/display=default/R040070>>. Acesso em: 29 de julho, 2016a.

RRUFF project. Calcite_R040070-1_Powder_Xray_Data_XY_Processed_3328.txt. Disponível em <<http://rruff.info/calcite/display=default/R040070>>. Acesso em: 29 de julho, 2016b.

RUI, Z.; LEI, Y.; RUI, T.; JINHUA, H.; JIXING, W.; JINWEI, Z.; DAJUN, C. Emulsion phase inversion from oil-in-water (1) to water-in-oil to oil-in-water (2) induced by in situ surface activation of CaCO₃ nanoparticles via adsorption of sodium stearate. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 477, p. 55-62, 2015.

SCRAMIN, J.A.; BRITTO, D.; FORATO, L.A.; BERNARDES-FILHO, R.; COLNAGO, L.A.; ASSIS, O.B.G. Characterisation of zein–oleic acid films and applications in fruit coating. **International Journal of Food Science & Technology**, Nova Jersey, v. 46, p. 2145-2152, 2011.

SHI, K.; YU, H.; HAO, S.L.; LEE, T.-C. Improved Mechanical Property and Water Resistance of Zein Films by Plasticization with Tributyl Citrate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Munique, v. 60, p. 5988-5993, 2012.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 13, p. 171-192, 2001.

SIANG-YING, C.; BE-JEN, W.; YIH-MING, W. Antioxidant and antimicrobial edible zein/chitosan composite films fabricated by incorporation of phenolic compounds and dicarboxylic acids. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 115-121, 2015.

SILVA, K.S.; MAURO, M.A.; GONÇALVES, M.P.; ROCHA, C.M.R. Synergistic interactions of locust bean gum with whey proteins: Effect on physicochemical and microstructural properties of whey protein-based films. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 54, p. 179-188, 2016.

SINGH, N.; ECKHOFF, S.R. Wet milling of corn: A review of laboratory-scale and pilot plant-scale procedures. **Cereal Chemistry**, Minnesota, v. 73, n. 6, p. 659-67, 1996.

SOLIMAN, E.A.; KHALIL, A.A.; DERAZ, S.F.; EL-FAWAL, G.; ABD-ELRAHMAN, S. Synthesis, characterization and antibacterial activity of biodegradable films prepared from Schiff bases of zein. **Journal Food & Science Technology**, v. 51, n. 2425–2434, 2014.

SWAIN, S. K; DASH, S.; KISKU, S.D.; SINGH, R.K. Thermal and oxygen barrier properties of chitosan bionanocomposites by reinforcement of calcium carbonate nanopowder. **Journal of Materials Science & Technology**, Amsterdam, v. 30, n. 8, p. 791-795, 2014.

SUGA, M.; ASAHINA, S.; SAKUDA, Y.; KAZUMORI, H.; NISHIYAMA, H.; NOKUO, T.; ALFREDSSON, V.; KJELLMAN, T.; STEVENS, S.M.; HAE, S.C.; MINHUNG, C.; LU, H.; SHUNAI, C.; ANDERSON, M.W.; SCHÜTH, F.; HEXIANG, D.; YAGHI, O.M.; ZHENG, L.; HU, Y. J.; STEIN, A.; SAKAMOTO, K.; RYOO, R.; TERASAKI, O. Recent progress in scanning electron microscopy for the characterization of fine structural details of nano materials. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 42, n. 1-2, p. 1-21, 2014.

TAVARES, L.L. **Efeito da adição de argilas modificadas na estrutura e propriedades funcionais de biofilmes produzidos a base de zeína**. São José do Rio Preto, SP: 2010. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista, 2010.

TAVARES, L.L.; ALMEIDA, C.B.; CARUSO, I.P.; CORNÉLIO, M.L.; LOPES-FILHO, J.F. Effect of modified clays on the structure and functional properties of biofilms produced with zein. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 2, p. 314-322, 2012.

TEIR, S.; ELONEVA, S.; ZEVENHOVEN, R. Production of precipitated calcium carbonate from calcium silicates and carbon dioxide. **Energy Conversion and Management**, v. 46, p. 2954-2979, 2005.

TEIXEIRA, S.C.S.; MOREIRA, M.M.; LIMA, A.P.; SANTOS, L.S.; ROCHA, B.M.; LIMA, E.S.; COSTA, R.A.A. F.; SILVA, A.L.N.; ROCHA, M.C.G.; COUTINHO, F.M.B. Study of blends of HDPE and different grades of CaCO₃ Part I. Factorial experimental design. **Polymer Testing**, Amsterdam, v. 24, p. 983-987, 2005.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **World agricultural supply and demand estimates**: WASDE - 555. Washington, p. 38, 2016.

WANG, K.; WANG, W.; YE, R.; LIU, A.; XIAO, J.; LIU, Y.; ZHAO, Y. Mechanical properties and solubility in water of corn starch-collagen composite films: effect of starch type and concentrations. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 216, p. 209-216, 2017.

WANG, Q.; XIAN, W.; LI, S.; LIU, C; PADUA, G.W. Topography and biocompatibility of patterned hydrophobic/hydrophilic zein layers. **Acta Biomaterialia**, Amsterdam, v. 4, p. 844-851, 2008.

WANG, Q.; PADUA, G.W. Properties of zein films coated with drying oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Munique, v. 53, p. 3444-3448, 2005.

WANG, Y.; LIU, A.; YE, R.; WANG, W.; LI, X. Transglutaminase-induced crosslinking of gelatin–calcium carbonate composite films. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 166, p. 414-422, 2015.

WANG, Y.; LOPES-FILHO, J.F.; GEIL, P.; PADUA, G.W. Effects of processing on the structure of zein/oleic acid films investigated by x-ray diffraction. **Macromolecular Bioscience**, Nova York, v. 5, p. 1200-1208, 2005.

WANG, Y.; PADUA, G.W. Water sorption properties of extruded zein films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Munique, v. 52, p. 3100-3105, 2004.

WANG, Z.; SUN, X.; LIAN, Z.; WANG, X.; ZHOU, J.; MA, Z. The effects of ultrasonic/microwave assisted treatment on the properties of soy protein isolate/microcrystalline wheat-brain cellulose film. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 114, p. 183-191, 2013.

WANG, Z.; ZHOU, J.; WANG, Z.; ZHANG, N.; SUN, Z.; MA, Z. The effects of ultrasonic/microwave assisted treatment on the water vapor barrier properties of soybean protein isolate-based oleic acid/stearic acid blend edible films. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 35, p. 51-58, 2014.

WEI, G.; XIAOYU, M.; YAN, L.; ZICHEN, W.; YANCHAO, Z. Effect of calcium carbonate on PET physical properties and thermal stability. **Powder Technology**, Amsterdam, v. 244, p. 45-51, 2013.

WEIDA, S.; DUMONT, M.J. Review: bio-based films from zein, keratin, pea, and rapeseed protein feedstocks. **Journal of Materials Science**, Berlin, v. 49, n. 5, p. 1915-1930, 2014.

WILSON, C.M. Multiple zeins from maize endosperms characterized by reversed-phase high-performance liquid-chromatography. **Plant Physiol**, Columbia, v. 95, p. 777–786, 1991.

XINSHEN, D.; YINGPING, L.; XING, L.; XIONG, W.; HUSELSTEIN, C.; YANTENG, Z.; CHANG, P.R.; YUN, C. Fabrication and evaluation of physical properties and cytotoxicity of zein-based polyurethanes. **Journal of Materials Science Materials in Medicine**, Berlin, v. 25, n. 3, p. 823-833, 2014.

XU, H.; CHAI, Y.; ZHANG, G. Synergistic effect of oleic acid and glycerol on zein film plasticization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Munique, v. 60, p. 10075-10081, 2012.

YANSHENG, Z.; YI, H.; YONGQUAN, Q.; CHUANBO, H.; QIAN, M. Preparation of superhydrophobic coating using modified CaCO_3 . **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 265, p. 532-536, 2013.

YE, C.; RAN, Y.; JUN, L. Effects of different concentrations of ethanol and isopropanol on physicochemical properties of zein-based films. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 53, p. 140-147, 2014.

YE-CHONG, Y.; SHOU-WEI, Y.; XIAO-QUAN, Y.; CHUAN-HE, T.; SHAO-HONG, W.; ZHUO, C.; BANG-JIE, X.; LEI-YAN, W. Surface modification of

dodium caseinate films by zein coatings. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 36, p. 1-8, 2014.

YI-LONG, H.; QIN, X.; ZHI-QIAN, L.; JIN-YE, W.; Preparation of transparent zein films for cell culture applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 120, p.55-62, 2014.

ZHE, W.; JING, Z.; XIAO-XUAN, W.; NING, Z.; XIU-XIU, S.; ZHONG-SU, M. The effects of ultrasonic/microwave assisted treatment on the water vapor barrier properties of soybean protein isolate-based oleic acid/stearic acid blend edible films. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 35, p. 51-58, 2014.

ZHU, Y.D.; ALLEN, G.C.; JONES, P.G.; ADAMS, J.M.; GRITTINS, D.I.; HEARD, P.J.; SKUSE, D.R. Dispersion characterisation of CaCO_3 particles in PP/ CaCO_3 composites. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, Amsterdam, v. 60, p. 38-43, 2014.

ZISU, B.; LEE, J.; CHANDRAPALA, J.; BHASKARACHARYA, R.; PALMER, M.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. Effect of ultrasound on the physical and functional properties of reconstituted whey protein powders. **Journal of Dairy Research**, v. 78, p. 226-232, 2011.

ZUIDERDUIN, W.C.J.; WESTZAAN, C.; HUÉTINK, J.; GAYMANS, R.J. Toughening of polypropylene with calcium carbonate particles. **Polymer**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 261-275, 2003.

Anexo A – Trabalho enviado ao V Simpósio de Engenharia e Ciência de Alimentos



XI Brazilian Meeting on Chemistry of Food
and Beverages
V Simpósio de Engenharia e Ciência de
Alimentos
28 de novembro a 02 de dezembro de 2016
Universidade Estadual Paulista
São José do Rio Preto, SP
Brasil



PRODUÇÃO DE FILMES COMESTÍVEIS A BASE DE ZEÍNA COM APLICAÇÃO DE ULTRASSOM

Raul Fujihara^{1*}, Gisandro Reis de Carvalho¹, Mariana Souza Costa¹,
Luzilene Souza Rosas¹, Crislene Barbosa de Almeida¹, José Francisco
Lopes Filho¹,

¹Universidade Estadual Paulista, Departamento de Engenharia e Tecnologia de
Alimentos

*e-mail: raulfujihara7@hotmail.com

RESUMO – Neste trabalho foram produzidos filmes com a aplicação de ultrassom à 120 W, 400 W e agitação mecânica à 650 rpm por 5 e 10 minutos. Os resultados da espectroscopia no infravermelho acoplada à técnica de reflectância total atenuada (FTIR-ATR) mostraram picos da estrutura básica da proteína, sem o aparecimento de novos compostos. O padrões de difração de raios-x em alto ângulo (WAXS) foram de acordo com o FTIR-ATR, foi observado a presença dos aglomerados moleculares dos filmes de zeína, com os espaçamentos encontrados na literatura. A microscopia óptica apresentou uma maior tamanho de glóbulos brancos com o aumento da potência e tempo de aplicação do ultrassom. Estudos dos efeitos de intensidades e tempos maiores são necessários.

ABSTRACT – In this work, films with ultrasound application at 120 W, 400 W and mechanical agitation at 650 rpm for 5 and 10 minutes were made. Fourier transforms infrared spectroscopy with attenuated total reflectance accessory (FTIR-ATR) spectrums showed the basic peaks of the protein microstructure without additional compounds. The wide angle x-ray diffraction (WAXS) patterns were according to the FTIR-ATR results, molecular aggregates of the zein films were observed with the d spaces found in the literature. Optical Microscopy showed a higher size of the white spots with a raise in the power and time of ultrasound application. Further studies in the microstructure and the effect of higher intensities of ultrasound is necessary.

INTRODUÇÃO

Na última década surgiram crescentes preocupações com o aquecimento global e descarte de materiais não biodegradáveis que promoveram um aumento no interesse de desenvolvimento de materiais que causam menor impacto ambiental. As proteínas possuem estruturas únicas que produzem uma grande variedade de propriedades funcionais, as quais dependem da origem e da concentração da proteína, devido ao seu alto potencial de ligações intermoleculares (NUR HANANI; ROOS; KERRY, 2014), além de ser obtida de produtos de fontes naturais, como biomassa e resíduos de indústrias alimentícias e agrícolas. Mudanças no processo podem modificar a estrutura e as interações da proteína para melhorar as propriedades dos filmes. Filmes biodegradáveis apresentam diferentes propriedades, pois dependem da matriz da estrutura da proteína, já que a reticulação intermolecular dos aminoácidos afeta a coesão estrutural (Kaewprachu, 2016).

Zeína é uma proteína do endosperma do milho que possui boas propriedades de formação de filmes com uma alta taxa de polimerização.

A estrutura molecular possui, em sua maioria, resíduos de aminoácidos não polares que a tornam hidrofóbica e solúvel em soluções alcoólicas. As cadeias da zeína podem formar interações de hidrogênio, ligações hidrofóbicas e algumas ligações de dissulfeto durante a polimerização (PAPALIA; LONDERO, 2015).

A tecnologia de ultrassom se baseia na propagação das ondas que produzem uma cavitação acústica que causam regiões de alta e baixa pressão. A diferença de pressão gera microbolhas que rapidamente crescem e colapsam, a energia liberada do colapso são distribuídas através de ondas de choque, forças de cisalhamento e turbulência, as quais geram ótimas condições para reações sonoquímicas (RODRIGUES et al, 2016). A sonificação melhora as propriedades funcionais das proteínas, mas o tempo e a intensidade podem causar uma perda na funcionalidade ou desnaturar a proteína. Alguns estudos reportam diminuição da partícula da proteína e melhora nas propriedades funcionais, como a solubilidade, congelamento/descongelamento e secagem (MARCUIZZO et al, 2010). Esse trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da aplicação de ultrassom durante a formação da matriz na microestrutura do filme.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Zeína foi adquirida da Sigma-Aldrich. Etanol (99.5%), glicerol e ácido oleico à nível analítico foram fornecidas pela Araçaprolab (Araçatuba, Brasil). O emulsificante da Duas Rodas Industrial Ltda., Brasil (Emustab), foi obtido no mercado local.

Preparo e composição dos filmes

Soluções de zeína foram preparadas com 10 gr. de zeína adicionados por 50 ml de etanol à 90% (v/v). As misturas foram mecanicamente agitadas a 25 °C por 5 minutos, então foram adicionados 7 gr. de ácido oleico, 3 gr. de glicerol e 0,5 gr. de emulsificante. As soluções foram tratadas com aplicação de ultrassom com um poder nominal de saída acústica de 120 W, 400 W e agitação mecânica por 5 e 10 minutos. O ultrassom foi operado a 24 kHz de frequência e equipado com uma sonda cilíndrica de 22 mm de diâmetro (HIELSCHER, UP 400S, Germany). Um banho termostático foi utilizado para pré-aquecer e restringir o aquecimento por cavitação da solução. Após o tratamento, 10 mililitros da solução foram aplicados em suportes circulares pelo método casting e deixados por 24 horas em temperatura ambiente para evaporação do solvente. Os filmes foram retirados e condicionados em um dessecador à 58% de umidade relativa (% UR) pelo menos 40 horas antes de cada análise.

Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier acoplada à Técnica de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

Os filmes de zeína foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho acoplada à técnica de reflectância total atenuada (FTIR-ATR) conforme Georget, Barker e Belton (2008). Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro (Spectrum TWO, FT-IR Spectrometer - Perkin Elmer) com 10 varreduras, na região de 4000 a 400 cm^{-1} , intervalo de 2 cm^{-1} e resolução 4 cm^{-1} .

Difração de Raio-X em Alto Ângulo (WAXS)

Os padrões de difração de raios-x em alto ângulo (WAXS) foram determinados utilizando-se um difractômetro de raios-X de bancada (Rigaku MiniFlex 300, Japão), com radiação de Cu, linha K, $\lambda = 1,542 \text{ \AA}$,

utilizando um porta amostra de alumínio vazado. A velocidade de varredura foi de 2°/min nas condições de 30 kV e 10 mA. A cristalinidade relativa será quantitativamente estimada seguindo o método de Nara e Komiya (1983), que é baseado na relação entre a área dos picos e área total dos difractogramas, utilizando o software Origin versão 7.5 (Microcal Inc., EUA).

Microscopia Óptica

A homogeneidade superficial foi determinada por microscopia óptica. As amostras foram cortadas em quadrados de 1 cm² e depois tingidas com uma solução de Xylidine Ponceau por 30 minutos. Os filmes tingidos foram lavados com uma solução de ácido acético e em um banho de água destilada por 10 minutos. Depois as amostras foram colocadas em uma lâmina de vidro e secadas em uma estufa por 24 horas à 37 °C. Após as 24 horas, os filmes secos foram fixados na lamínula de vidro com bálsamo do Canada. As análises foram feitas com um microscópio óptico (Olympus CX 31), equipado com um sistema de captura de imagem (Olympus CellSens Standards 1.11), utilizando um aumento de 10x após 24 horas de secagem da montagem da amostra em temperatura ambiente.

Análise Estatística

Os resultados foram analisados com a aplicação da Análise de Variância one-way (ANOVA) utilizando o programa Minitab (Minitab Inc., State College, PA). O teste de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças entre os valores das médias com um nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os filmes obtidos tinham uma estrutura compacta, superfície lisa, com boa manuseabilidade e foram retirados facilmente do suporte. A Tabela 1 apresenta a denominação das amostras.

Tabela 1: Tabela das amostras e tratamentos.

Film*	Time [min]	Treatment*
Zeína M05	5	650 rpm
Zeína M10	10	650 rpm
Zeína 1W05	5	120W
Zeína 1W10	10	120W
Zeína 2W05	5	400W
Zeína 2W10	10	400W

*Os códigos das amostras M, 1W e 2W representam os tratamentos mecânico e ultrassom (650 rpm, 120 W e 400 W); O tempo (5 e 10 minutos) é representado pelos números 05 e 10, respectivamente.

Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR-ATR)

Os picos do grupo amino da proteína são caracterizados pelo espectro, o qual os grupos peptídeos apresentam as maiores respostas. A Figura 1 apresenta os filmes analisados pelo FTIR-ATR de todos os filmes.

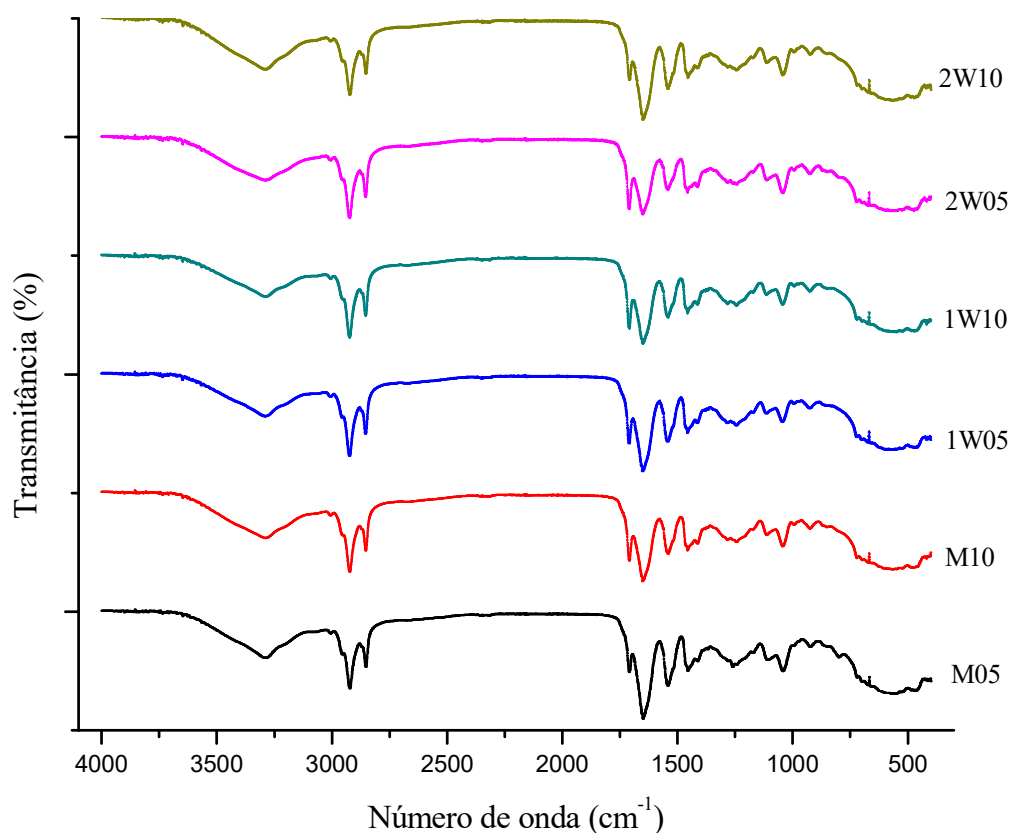


Figura 1: Espectros do FTIR-ATR dos filmes de zeína.

A banda de absorção das estruturas e seus respectivos comprimentos de onda estão apresentados na Tabela 2. Os ácidos graxos livres são provenientes da estrutura da zeína, como as cadeias laterais de certos aminoácidos e a presença de componentes alifáticos. As estruturas secundárias predominantes na estrutura da zeína, α e β , estão presentes nos filmes obtidos com ultrassom, pois geraram picos na região entre 1500 até 1800 cm^{-1} das amidas I e II. As diferenças na intensidade da transmitância são usuais e não representam uma alteração na constituição da estrutura II (ALMEIDA et al, 2010; FORATO; BERNARDES-FILHO; COLNAGO, 1998).

Tabela 2: Comprimentos de onda das estruturas da zeína do FTIR-ATR.

Estrutura	Comprimento de onda (cm^{-1})	Grupos associados
Amida I	1640	Vibração do estiramento do C=O*
Amida II	1540	Combinação da vibração do estiramento do C-N e dobramento do N-H*
Amida A	3300	Vibração do estiramento da hidroxila*
Ácidos graxos	2840 – 2920	Vibração do estiramento do C-H do CH ₃ e CH ₂ *
Ácido oléico	1750, 2850 e 2950	Ácido oléico**

(*BARTH, 2007; **TAVARES et al, 2012)

Assim, os materiais analisados apresentaram os mesmos constituintes e mantiveram a integridade da proteína, sem ocorrer a quebra e/ou surgimento de estruturas químicas. Guijin et al (2016) reportou resultados similares e não encontrou diferenças significantes na estrutura química da zeína quando aplicou um processo de diálise com ultrassom (BUDP) para produzir microesferas de zeína.

Difração de Raio-X em Alto Ângulo (WAXS)

A análise de difração foi realizada para verificar a influência dos tratamentos no empacotamento da estrutura dos filmes. A zeína apresenta dois picos de intensidade característicos, um a 4,5 e outro a 10 Å na análise de Difração de Raio-X em Alto Ângulo (WAXS). O menor espaço (d_1) de 4,5 Å pode ser relacionado à distância da base entre as α -hélices ou aos espaços entre as cadeias do ácido oléico (GORRASI; VERTUCCIO, 2016). O maior espaço (d_2) de 10 Å é proveniente do

empacotamento lateral das α -hélices. A estrutura secundária mais estável e abundante nas proteínas é a α -hélices com a conformação baseada em interações de hidrogênio intramoleculares (WANG et al, 2005). O espaço “d” está apresentado na tabela 3.

Tabela 3: Comprimentos de onda das estruturas da zeína do FTIR-ATR.

Amostra	d1	d2
M05	4,50 $\pm$ 0,01	10,78 $\pm$ 0,40
M10	4,54 $\pm$ 0,06	10,27 $\pm$ 0,02
1W05	4,51 $\pm$ 0,03	10,33 $\pm$ 0,08
1W10	4,60 $\pm$ >0,01	10,31 $\pm$ 0,18
2W05	4,60 $\pm$ >0,01	10,33 $\pm$ 0,29
2W10	4,56 $\pm$ 0,06	10,81 $\pm$ 0,31

Segundo WANG et al (2005), diferenças nas estruturas dos materiais podem ser refletidas nos padrões de WAXS. O empacotamento das inter-hélices é relacionado ao pico de 10 Å e alterações na distância podem causar a diminuição da intensidade, a qual indica possíveis dispersões nos agregados moleculares da zeína. Os valores d1 e d2 para os filmes não apresentaram uma diferença significativa (<0,05) e permaneceram próximo aos valores reportados na literatura. Os padrões WAXS dos filmes estão presentes na Figura 2 com a indicação dos pontos d1 e d2.

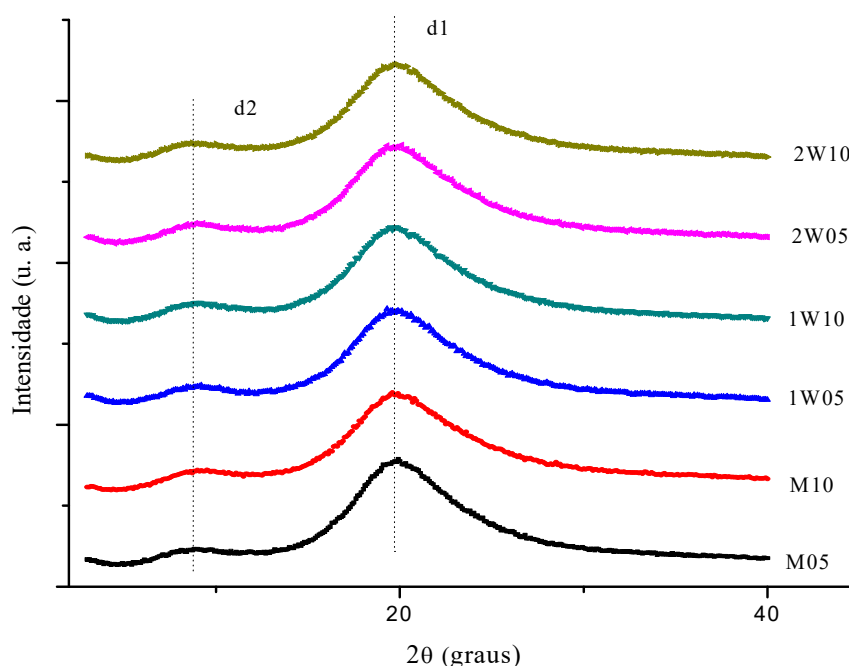


Figura 2: Padrões WAXS dos filmes de zeína.

Segundo YI-LONG et al (2014), a presença de moléculas de água podem influenciar fortemente no empacotamento da estrutura dos filmes ao competir com as interações de hidrogênio das moléculas de zeína. Todos os tratamentos possuíam a mesma formulação e, como esperado, apresentaram curvas de difração próximas e com poucas alterações na conformação da zeína, concordando com os resultados obtidos pelo FTIR-ATR.

Microscopia Óptica

A microscopia optica foi utilizada neste estudo para observar a distribuição e homogeneidade dos glóbulos de gordura na matriz proteica. O tingimento com Xylidine Ponceau (pH=3.5) possibilita a identificação dos radicais proteicos cationicos. As proteínas são tingidas em vermelho e os lipídios permanecem brancos (ALMEIDA et al, 2010). A Figura 3 apresenta os micrográficos dos filmes de zeína com um aumento de dez vezes (500 mm).

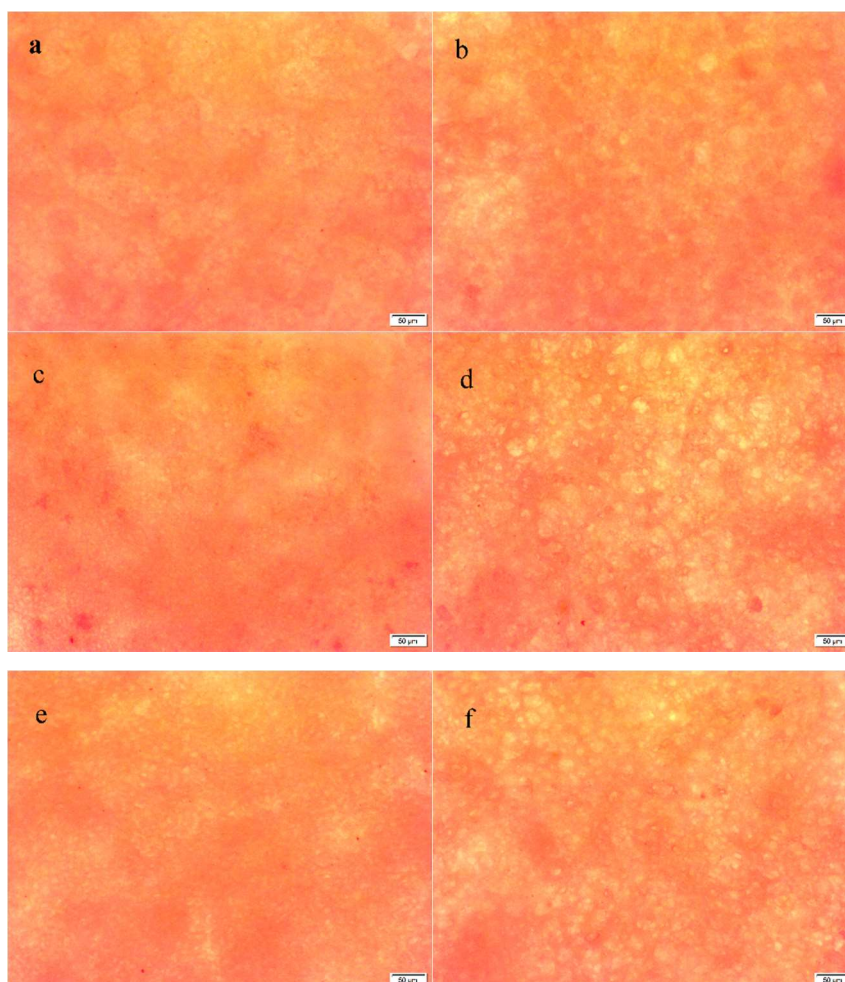


Figura 3: Micrográficos ópticos dos filmes de zeína.

Filmes de zeína formaram uma matriz mais homogênea nos tratamentos mecânicos e na aplicação de ultrassom em processos com menor tempo (Figura 3a, b, c e e). A adição de glicerol e ácido oléico causaram uma heterogeneidade na matriz com uma grande quantidade de pontos brancos, com um aumento no tamanho de acordo com o tempo do ultrassom (Figura 3d e f). Estudos adicionais na microestrutura com a aplicação de ultrassom em tempos de exposição e potências maiores são necessários.

CONCLUSÃO

Filmes comestíveis foram efetivamente preparados utilizando a aplicação de ultrassom. Os espectros do FTIR-ATR mostraram picos na região de comprimentos de onda encontrados na literatura, sem a presença de novos elementos. Os espaços d calculados a partir dos padrões WAXS não apresentaram diferenças significativas e estão de acordo com empacotamento característico da zeína. Apesar da aplicação de ultrassom poder produzir filmes, os efeitos na matriz da estrutura podem ser observados nos micrográficos da microscopia óptica, então estudos em maiores intensidades e tempos devem ser realizados.

RECONHECIMENTOS

Os autores expressam seus agradecimentos ao Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo auxílio no programa de pós-graduação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C. B.; CATELAM, K. T.; CORNÉLIO, M. L.; LOPES-FILHO, J. F. (2010). "Morphological and Structural Characteristics of Zein Biofilms with Added Xanthan Gum", *Food Technology and Biotechnology*, Zadar, Vol. 48, no. 1, pp. 19-27.

BARTH, A. (2007). "Review: Infrared spectroscopy of proteins". *Biochimica et Biophysica Acta*, Budapeste, Vol. 1767, n. 9, pp. 1073-1101.

FORATO, L. A.; BERNARDES-FILHO, R.; COLNAGO, L. A. (1998). "Protein structure in KBr pellets by infrared spectroscopy", *Analytical Biochemistry*, Nova York, Vol.259, pp. 136–141.

GEORGET, D. M. R.; BARKER, S. A.; BELTON, P. S. 2008. "A study on maize proteins as a potential new tablet excipient". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Estugarda, Vol. 69, pp. 718-726.

GORRASI, G.; VERTUCCIO, L. (2016). "Evaluation of zein/halloysite nano-containers as reservoirs of active molecules for packaging applications: Preparation and analysis of physical properties". *Journal of Cereal Science*, Londres, Vol. 70, pp. 66-71.

GU, L.; WANG, M.; ZHOU, J. (2013). "Effects of protein interactions on properties and microstructure of zein–gliadin composite films". *Journal of Food Engineering*, Londres, Vol. 119, pp. 288-298.

GUIJIN, L.; DONGWEI, W.; HONGDI, W.; YUTONG, JU.; YANBIN, J. (2016). "Self-assembly of zein microspheres with controllable particle size and narrow distribution using a novel built-in ultrasonic dialysis process". *Chemical Engineering Journal*, Amsterdam, Vol. 284, pp. 1094-1105.

KAEWPRACHU, P.; OSAKO, K.; BENJAKUL, S.; TONGDEESOONTORN, W.; RAWDKUEN, S. (2016). "Biodegradable Protein-based Films and Their Properties: A Comparative Study". *Packaging Technology and Science*, Nova York, Vol. 29, n. 2, pp. 77-90.

MARCUZZO, E.; PERESSINI, D.; DEBEAUFORT, F.; SENSIDONI, A. 2010. "Effect of ultrasound treatment on properties of gluten-based film". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Amsterdam, Vol. 11, pp. 451-457.

NARA, S., KOMIYA, T. (1983). "Studies on the relationship between water-saturated state and crystallinity by the diffraction method for moistened potato starch". *Starch/Starke*, Weinheim, Vol. 35, pp. 407–410.

NUR HANANI, Z. A.; ROOS, Y. H.; KERRY, J. P. (2014). "Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food products". *International Journal of Biological Macromolecules*, Guildford, Vol. 71, pp. 94-102.

PAPALIA, I. S.; LONDERO, P. M. G. (2015). "Extraction of zein and its application in food preservation". *Ciência Rural*, Santa Maria, Vol. 45, n. 2, pp. 552-559.

RODRIGUES, D. C.; CUNHA, A. P.; BRITO, E. S.; AZEREDO, H. M. C.; GALLÃO, M. I. 2016. "Mesquite seed gum and palm fruit oil emulsion edible films: Influence of oil content and sonication". *Food Hydrocolloids*, Oxford, Vol. 56, pp. 227-235.

TAVARES, L. L.; ALMEIDA, C. B.; CARUSO, I. P.; CORNÉLIO, M. L.; LOPES-FILHO, J. F. (2012). "Effect of modified clays on the structure and functional properties of biofilms produced with zein". *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, Vol.32, n. 2, pp. 314-322.

YI-LONG, H.; QIN, X.; ZHI-QIAN, L.; JIN-YE, W. (2014). "Preparation of transparent zein films for cell culture applications". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Amsterdam Vol. 120, pp. 55-62 .

Anexo B – Lei de Bragg (d-space) e Método de Halder-Wagner

LEI DE BRAGG

A difração de raio-x permite identificar, quantificar e caracterizar componentes em estruturas complexas. A radiação monocromática sofre uma difração quando incide em um plano de um cristal ou material policristalino. Cada conjunto de planos de um cristal gera um pico de difração no ângulo de 2θ (Equação 1) entre o raio-x incidente e o raio difratado de acordo com a fórmula da Lei de Bragg:

$$n \lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \quad (1)$$

O espaçamento interplanar d_{hkl} , que é a distância entre dois planos paralelos e adjacentes pode ser representada por uma função (Equação 2) dos índices de Miller (h , k e l) e dos parâmetros de rede, representado por a .

$$d_{hkl} = \frac{a}{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}} \quad (2)$$

A intensidade de difração é apresentada em um diagrama em função do ângulo 2θ que é característico de cada estrutura cristalina do material. Os registros dos padrões de difração identificam o material e a estrutura cristalina. A pureza pode ser encontrada na comparação de possíveis fases secundárias ou a presença de parâmetros estranhos aos planos cristalinos. A intensidade dos picos de difração depende dos múltiplos planos de difração, dos átomos contidos no plano pela suas posições e seus respectivos fatores de espalhamento.

MÉTODO DE HALDER-WAGNER

A largura na metade da altura do pico de difração nos permite determinar o tamanho de um cristalito. O raio de difração resulta de uma convolução entre o raio gerado e o raio do material difratado e pode ser influenciado por duas contribuições: o tamanho do cristal que não é infinito e as falhas presentes na estrutura cristalina (defeitos pontuais, deslocamentos, etc).

A princípio era necessário realizar uma correção em todos os picos gerados pelas curvas de resolução do registro do difratômetro com o monocristal. A largura na metade da altura do pico (indicado por β) era determinado pela medição de vários picos em diferentes ângulos θ de difração pela relação Equação 3.

$$\beta = \beta_{exp} - (\beta_{inst}^2 / \beta_{exp}) \quad (3)$$

A largura experimental era corrigida por meio da relação empírica de Wagner (Equação 4):

$$\beta_{inst} = X' \tan(\theta) + Y / \cos(\theta) \quad (4)$$

Onde β_{exp} é a largura obtida pelo difratograma e o β_{inst} é o valor calculado. Essa relação é utilizada no método de Halder e Wagner para determinar o tamanho do cristalito. A relação que permite a determinação do tamanho aparente do cristalito é representado pela Equação 5:

$$(\beta' / d')^2 = (1/\varepsilon) * \beta' / (d')^2 + (\eta/2)^2 \quad (5)$$

Onde ε era o diâmetro do cristalito, era a distorção e as variáveis era dados pela Equação 6:

$$\beta' = \beta \cos \theta / \lambda, d' = 2 \sin \theta / \lambda \quad (6)$$

O λ era o comprimento de onda da plotagem do raio x $(\beta' / d')^2 (\text{nm}^{-4})$ em função de $\beta' / (d')^2 (\text{nm}^{-3})$. O diâmetro médio era obtido

pelo inverso da angulação da linha obtida. A distorção é obtida pelo y de interceptação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CALLISTER JR., W. D. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. 5ª edição. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

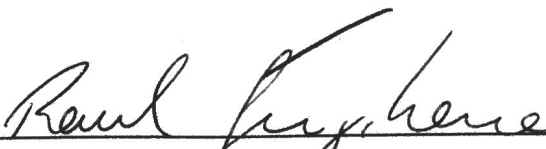
HAMIEH, T.; KAWTHARANI, F.; KASSAS, A.; QUERCIOLI, R.; HOUIVET, D.; BERNARD, J.; LAKISS, H.; TOUFAILY, J.; AOUN, R.; REDA, M. Ultrafine Grinding of MgTiO₃ based ceramic influencing the material properties, **Physical Chemistry & Biophysics**, Los Angeles, v. 3 , n. 3, p. 122-135, 2013.

GHOLIZADEH, A. X-ray peak broadening analysis in LaMnO₃+ δ nanoparticles with rhombohedral crystal structure. **Journal of Advanced Materials and Processing**, Najafabad, v. 3, n. 3, p. 71-83, 2015.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 22/06/2017


Assinatura do autor