

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

MAYCON DOS SANTOS

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE DA
VAGEM DE SOJA E AVALIAÇÃO DA SUA APLICAÇÃO EM FILMES DE
PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA**

Grupo de Pesquisa em Embalagens e Alimentos Funcionais – MFBIOPACK – UFGD

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DOURADOS - MS
2019**

MAYCON DOS SANTOS

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE DE
VAGEM DE SOJA E AVALIAÇÃO DA SUA APLICAÇÃO EM FILMES DE
PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sílvia Maria Martelli.

DOURADOS - MS
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S237o Santos, Maycon Dos

Obtenção e caracterização de nanocristais de celulose da vagem de soja e avaliação da sua aplicação em filmes de proteína isolada de soja [recurso eletrônico] / Maycon Dos Santos. -- 2019.
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Silvia Maria Martelli.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2018.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Nanocristais de celulose. 2. Vagem de soja. 3. Bionanocompósitos. 4. Filmes. I. Martelli, Silvia Maria. II. Título.

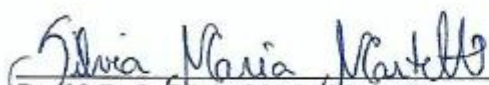
Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "**Extração e caracterização de nanocristais de celulose de vagem de soja e avaliação de sua aplicação em filmes de proteína isolada de soja**", de autoria de **Maycon dos Santos**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof.^a Dr.^a Silvia Maria Martelli
Presidente da banca examinadora

Prof.^a Dr.^a Farayde Matta Fakhouri - Participação remota
Membro Examinador (UFGD)



Prof. Dr. Eriton Rodrigo Botero
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 21 de março de 2018.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: TECNOLOGIA AMBIENTAL
LINHA DE PESQUISA: Potencial Tecnológico De Matérias Primas e Resíduos Agroindustriais

**DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO À DISTÂNCIA - SÍNCRONA - EM BANCA DE DEFESA DE
MESTRADO/ UFGRD**

Às 8h:30min do dia 21/03/2018, participei de forma síncrona com os demais membros que assinam a ata física deste ato público, da banca de Defesa da Dissertação de Mestrado do candidato **Maycon dos Santos**, do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Considerando o trabalho avaliado, as arguições de todos os membros da banca e as respostas dadas pelo candidato, formalizo para fins de registro, por meio deste, minha decisão de que o candidato pode ser considerado: **Aprovado**.

Atenciosamente,

Farayde Matta Fakhouri

Universidade Federal da Grande Dourados

Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

*Dedico este trabalho à minha mãe, Creuza dos Santos Cremonese,
por todo apoio e dedicação a mim oferecido.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida;

À minha mãe, por todo amor a mim transferido e por nunca ter duvidado de minha capacidade.

Aos meus irmãos, pelo apoio durante os dois anos da realização deste trabalho;

Aos professores Dr. Marco Antônio Utrera Martines e Dr. Marco Mariano, pela ajuda com algumas análises;

Às técnicas dos laboratórios da Engenharia de Alimentos, Andressa, Priscila, Mari e Lígia, pela disposição em ajudar todas as vezes em que precisei;

Agradeço imensamente à professora Dra. Farayde Matta Fakhouri, por me acalmar em momentos de tensão e pelos conhecimentos a mim transmitidos durante a realização deste trabalho. Obrigado!

À minha orientadora, Dra. Silvia Maria Martelli, pelo apoio, pela força, pelas vezes em que foi necessário me chamar a atenção, pelos ensinamentos, pela amizade, pelo conhecimento a mim transferido, enfim, por sempre estar disponível todas as vezes em que precisei de ajuda. Muito obrigado!

Aos amigos do grupo de pesquisa;

À minha amiga de longa data, Juliana Camila Fischer Karnopp, por estar sempre disponível para ouvir minhas reclamações, me auxiliar em momentos de dúvida em relação à pesquisa e em escolhas da vida. Por ter contribuído com as análises de DLS e potencial zeta, por ser minha amiga desde a época em que nossas maiores preocupações era a hora em que acabasse a aula do ensino médio para passar a tarde toda sem fazer nada;

Aos amigos que fiz durante estes dois anos de mestrado, em especial a Marivane Turim Koschevic, por ser o maior apoio que eu poderia ter durante esses dias. Esse trabalho não poderia ser realizado sem sua ajuda. Uma verdadeira amiga que a vida me trouxe.

*Já vi o fim do mundo algumas vezes e
na manhã seguinte, estava tudo bem – Guessinger.*

RESUMO

Proteínas são moléculas biológicas, com alta massa molecular, que podem ser definidas como polímeros naturais, capazes de formar estruturas amorfas tridimensionais estabilizadas, principalmente por ligações não-covalentes. Entre as proteínas, a proteína isolada de soja (SPI) destaca-se devido às suas propriedades estruturais e funcionais que permitem a formação de estruturas com características adequadas para sua utilização como embalagem. Existem tecnologias que visam melhorar as propriedades físico-químicas de filmes biodegradáveis, entre elas, o uso de nanocristais de celulose (CNC). Os CNC são nanopartículas cristalinas, que podem ser obtidas a partir da hidrólise ácida da região amorfa de materiais lignocelulósicos. Um exemplo é a vagem de soja, que é um resíduo agroindustrial de grande ocorrência, que apresenta um alto teor de celulose (>70%), tornando-a uma potencial fonte de CNC. A partir destas informações, este trabalho teve como objetivo analisar o efeito da adição de nanocristais de celulose (CNC) extraídos de vagem de soja afim de avaliar sua influência em algumas propriedades de filmes elaborados a partir de proteína isolada de soja (SPI). Foram elaboradas 5 concentrações de filmes de SPI, sendo elas: Controle (sem adição de CNC), SPI+CNC0,3 (contendo 0,3% de CNC), SPI+CNC0,5 (contendo 0,5% de CNC), SPI+CNC0,7 (contendo 0,7% de CNC) e SPI+CNC1,0 (Contendo 1,0% de CNC). A vagem de soja utilizada na obtenção dos CNC foi caracterizada pela determinação do teor de celulose, lignina e cinzas. Quanto aos CNC, avaliou-se o rendimento, e os mesmos foram caracterizados por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e pontencial Zeta. Os Filmes foram caracterizados por difratometria de raios-X (DRX), espessura, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor d'água (PVA), transmitância e ensaio mecânico de resistência à tração, tensão máxima, tensão na ruptura, deformação específica e módulo de elasticidade. Os resultados obtidos por DLS mostraram que os CNC possuem 75nm de tamanho e índice de polidispersão de 0,645, indicando que as nanopartículas estavam dispersas de forma homogênea em solução aquosa. A incorporação de CNC em matriz de SPI causou a diminuição da PVA dos filmes em 38%, além de provocar o aumento da cristalinidade. A solubilidade dos filmes não foi alterada em função da adição dos CNC nas formulações.

Palavras Chaves: Nanocristais de celulose, vagem de soja, bionanocompósitos, filmes.

ABSTRACT

Proteins are biological molecules with high molecular mass, which can be like natural polymers, capable of producing stabilized three-dimensional amorphous structures, mainly by non-covalent bonds. Among proteins, isolated soy protein (SPI) stands out due to its structural and functional properties that allow the formation of structures with characteristics suitable for their use as packaging. There are technologies that aim to improve the physical properties of biodegradable films, among them, the use of cellulose nanocrystals (CNC). CNCs are crystalline nanoparticles, which can be obtained from the acid hydrolysis of the amorphous region of lignocellulosic materials. An example is the soybean pod, which is a high-occurring agroindustrial residue, which presents a high content of cellulose (> 70%), making it a potential CNC source. From this information, the objective of this work was to analyze the effect of the addition of cellulose nanocrystals (CNC) extracted from soybean pod in order to evaluate its influence on some properties of films made from isolated soybean protein (SPI). Five concentrations of SPI films were prepared: Control (without addition of CNC), SPI + CNC0.3 (containing 0.3% CNC), SPI + CNC0.5 (containing 0.5% CNC), SPI + CNC0.7 (containing 0.7% CNC) and SPI + CNC1.0 (Containing 1.0% CNC). The soybean pod used in obtaining the CNC was characterized by the determination of the cellulose, lignin and ash content. As for the CNCs, the yield was evaluated, and they were characterized by dynamic light scattering (DLS) and Zeta-potential. The films were characterized by X-ray diffractometry (XRD), thickness, water solubility, water vapor permeability (PVA), transmittance and mechanical tensile strength test, maximum stress, strain at break, specific strain and modulus of elasticity. The results obtained by DLS showed that the CNCs have 75nm of size and polydispersity index of 0.645, indicating that the nanoparticles were dispersed homogeneously in aqueous solution. The incorporation of CNC in the SPI matrix caused the decrease of the PVA of the films by 38%, besides provoking the crystallinity increase. The solubility of the films was not altered due to the addition of the CNCs in the formulations.

Keywords: Cellulose nanocrystals, soybean pods, bionanocomposites, films.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura química de aminoácidos formando ligações peptídicas, dando origem às proteínas	23
Figura 2 Ilustração gráfica das estruturas possíveis para proteínas	24
Figura 3 Representação das regiões cristalinas e amorfas das fibras vegetais.	25
Figura 4 Fluxograma das etapas do processamento que a vagem de soja foi submetida, até a obtenção dos filmes de proteína isolada de soja.	27
Figura 5 Esquema representativo do processo de mercerização das fibras de vagem de soja in natura.	28
Figura 6 Vagem de soja, onde: a) recepção; b) peneiramento e limpeza; c) trituração; d) vagem triturada e e) armazenadas em dessecador.	29
Figura 7 Esquema representativo do processo de branqueamento das fibras de vagem de soja mercerizadas.....	29
Figura 8 Esquema simplificado dos procedimentos utilizados para a extração dos CNC.	30
Figura 9 Cubas herméticas e balança analítica utilizadas para a análise de PVA.....	35
Figura 10. Ensaio de tração, onde: a) mostra o preparo das amostras; b) o equipamento utilizado e; c) o software utilizado para a análise dos dados.....	36
Figura 11 Aspecto visual da fibra de vagem de soja durante os processos de trituração, Mercerização e branqueamento	39
Figura 12 Gráfico com a determinação do teor de celulose, lignina e cinzas das fibras.....	39
Figura 13 Espectro de FTIR para as amostras de vagem de soja in natura e branqueadas.	41
Figura 14 Gráfico do espalhamento de Luz Dinâmico dos CNC.....	43
Figura 15 Aspecto visual dos filmes de SPI após a secagem.....	44
Figura 16 Aspecto visual dos filmes de SPI momentos antes das análises.....	45
Figura 17. Difração de raios-x dos nanocompósitos e dos CNC liofilizados.....	46
Figura 18 Transmitância das amostras de filmes de SPI contendo CNC em sua estrutura.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Aminoácidos majoritários presentes em SPI.....	24
Tabela 2. Formulação de filmes de SPI 6% plastificados com 40% de glicerol com diferentes concentrações de CNC em suspensão, considerando-se 200mL de solução.....	31
Tabela 3 Principais vibrações na região do FTIR observadas para a vagem de soja in natura e branqueada	41
Tabela 4. Solubilidade em H ₂ O, PVA e espessura dos filmes e nanocompósitos.....	48
Tabela 5. Propriedades mecânicas dos filmes de proteína isolada de soja com nanocristais de vagem de soja.....	51
Tabela 6 Valores de transmitância (%) dos filmes de SPI contendo diferentes concentrações de CNC	53

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Cálculo do teor de umidade.....	32
Equação 2: Teor de celulose.	32
Equação 3: Teor de lignina insolúvel.....	32
Equação 4: Cálculo do teor de umidade.....	35

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ASTM	American Society for Testing and Materials
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CNC	Nanocristais de celulose
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DRX	Difraco de Raios-X
FDA	Fibra em detergente cido
FTIR	Espectroscopia no infravermelho pela
transformada de Fourier	
g	Gramas
g/cm ³	Gramas por centímetro cúbico
GPa	Giga Pascal
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	cido sulfúrico
Kg	Quilogramas
m/v	Massa por volume
MA	Massa da amostra
mA	miliAmpr
MC	Massa do cadinho limpo e seco
MCC	Massa do cadinho filtrante com cinzas
MCL	Massa do cadinho somada  massa de lignina
Mg(NO ₃)	Nitrato de magnésio
mg/mL	Miligramas por mililitro
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mol.L ⁻¹	molar por litro
N	Neutro
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
Nm	Nanometros
C	Graus Clsius
PDI	ndice de polidispersão
Pf	Peso final da amostra
pH	Potencial Hidrogeniônico
Pi	Peso inicial da amostra
PVA	Permeabilidade ao vapor d'água
rpm	Rotao por minute
SPI	Proteína Isolada de Soja
TNT	Tecido-não-tecido
TU%	Teor de umidade percentual
UFGD	Universidade Federal da Grande Dourados
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UR	Umidade relativa
v:v	Volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 Filmes	20
3.2 Proteína Isolada de Soja	22
3.3 Nanocristais de celulose	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 MATERIAIS	27
4.2 MÉTODOS	27
4.3. MERCERIZAÇÃO DA FIBRA DE VAGEM DE SOJA	28
4.4. BRANQUEAMENTO DA FIBRA DE VAGEM DE SOJA	28
4.5 EXTRAÇÃO DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE	29
4.6 OBTENÇÃO FILMES	30
4.7 CARACTERIZAÇÃO DA FIBRA, CNC E FILMES	32
4.7.1 Teor de Lignina, Celulose e Compostos Inorgânicos – Fibra de Vagem de Soja	32
4.7.2 Rendimento dos CNC e da Fibra.....	33
4.7.3 Espectroscopia no infravermelho (FTIR).....	33
4.7.4 Espalhamento de Luz Dinâmico E Potencial Zeta - CNC.....	33
4.7.5 Difração de Raios-X – CNC e Filmes	34
4.7.6 Espessura - Filmes.....	34
4.7.7 Solubilidade em Água - Filmes	34
4.7.8 Permeabilidade ao Vapor D'água - Filmes	34
4.7.9 Ensaio Mecânico de Resistência À Tração	36
4.7.10 Transmitância.....	36
4.7.11 Análise estatística.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Teor de Lignina, Celulose e Compostos Inorgânicos – Fibra de Vagem de Soja	38
5.2 Rendimento da Fibra e do CNC	42
5.3 Análise dos Nanocristais de Celulose - Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta	43
5.4 Filmes de Proteína Isolada de Soja	44
5.5 Difração de Raios-X – CNC e Filmes	45

5.6 Permeabilidade ao Vapor D'água, Solubilidade em Água e Espessura – Filmes	47
5.7 Ensaio Mecânico de Resistência À Tração	50
5.8 Transmitância	52
6. CONCLUSÃO	55
7. REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

O descarte inadequado de embalagens gera uma grande quantidade de resíduos, que pode causar desequilíbrio ambiental, tornando-se um caso de saúde pública. Embalagens de origem petroquímica apresentam características adequadas em termos de funcionalidade por apresentarem baixa permeabilidade a água, alta resistência mecânica, porém, não são biodegradáveis, causando problemas ambientais e podem ser fontes de proliferação de vetores de doenças. A busca por novos materiais que substituam parcialmente os materiais de fonte petroquímica leva em conta fatores como necessidade, sustentabilidade e impactos sobre a economia, sobre a vida das pessoas e sobre o meio ambiente, no qual há sempre um balanço entre perdas e ganhos entre estes fatores.

Apesar de ser uma alternativa viável, o uso de polímeros biodegradáveis pode possuir algumas limitações, como alta permeabilidade e baixa resistência mecânica e, devido a isso o interesse por pesquisas que visam otimizar estas embalagens tem crescido. Uma das alternativas para melhorar as propriedades desses materiais é a incorporação de nanocristais de celulose (CNC) em matrizes poliméricas advindas de fontes naturais, melhorando notavelmente as propriedades mecânicas e de barreira desses materiais (Dufresne & Belgacem, 2010; Sakanaka, 2007).

Indústrias de bioplásticos estão ainda em sua fase inicial, com a busca materiais voltados não somente para a biodegradabilidade, mas também para a reciclagem e/ou substituição dos plásticos de origem petroquímica por plásticos obtidos de fontes renováveis (Queiroz & Collares-Queiroz, 2009).

A celulose em escala nanométrica tem despertado o interesse tanto pela riqueza de fontes, quanto pela aplicabilidade na área de compósitos, principalmente em filmes de barreira nas indústrias de papel e embalagens, por possuírem grande potencial para serem utilizados como agente de reforço e como barreira física na permeabilidade ao vapor d'água, devido a sua relativa baixa densidade (1,566 g/cm³), alta tensão de ruptura (10 GPa) e alto módulo (143 GPa) (Elazzouzi-Hafraoui *et al.*, 2008(Hubbe, Rojas, Lucia, & Sain, 2008; Kalia et al., 2011).

Os nanocristais de celulose (CNC) são nanopartículas cristalinas obtidas de fibras de celulose, os quais são relevantes no desenvolvimento de novos materiais naturais com propriedades melhoradas, e podem ser produzidos através da hidrólise ácida das regiões amorfas das fibras de celulose. Tipicamente, a hidrólise com ácido sulfúrico é utilizada para produzir suspensões aquosas eletrostaticamente estabilizadas pelos grupos éster sulfato,

carregados negativamente, encontrados na superfície dos CNC e que promovem sua dispersão uniforme em água (Elazzouzi-Hafraoui *et al.*, 2008).

Ainda, essas nanopartículas podem ser inseridas em materiais que necessitam de características únicas, como por exemplo, as propriedades óticas que refletem um comprimento de onda específico da luz ou são transparentes. Eles são importantes para o desenvolvimento de artigos biomédicos, implantes, bem como, para indústria têxtil e alimentícia, uma vez que são biocompatíveis e não tóxicos.

O Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo, com uma produção estimada em 113,923 milhões de toneladas nas safras de 2016/2017, atrás apenas dos Estados Unidos da América, que obteve uma produção de 117,208 milhões de toneladas no mesmo período (EMBRAPA, 2018). A vagem de soja é um subproduto da agroindústria que tem seu potencial tecnológico pouco explorado. Durante o processamento, a vagem é descartada e pode ser utilizada como fonte de energia, através da queima. Porém, por ser uma fonte celulósica, também pode ser utilizada para a extração de CNC. Da soja são extraídos diversos subprodutos, como o óleo, a farinha e seu isolado proteico (Proteína isolada de soja - SPI).

Proteínas são moléculas de alta massa molecular formada por aminoácidos unidos entre si por ligações peptídicas e podem ser definidas como polímeros naturais capazes de formar estruturas amorfas tridimensionais estabilizadas principalmente por ligações não covalentes (Cuq, Gontard, & Guilbert, 1998).

Dentre os biopolímeros, as proteínas apresentam propriedades funcionais e estruturais que possibilitam o seu emprego como macromolécula na estrutura de filmes biodegradáveis. A SPI destaca-se entre as possíveis matrizes devido à grande produção do grão de soja no Brasil e tem sido estudada como matriz de filmes biodegradáveis devido as suas propriedades estruturais e funcionais que permitem a formação de estruturas com características adequadas para sua utilização como embalagem (Cho, Park, Batt, & Thomas, 2007; Denavi *et al.*, 2009; Hopkins, Chang, Lam, & Nickerson, 2015). Os materiais construídos a partir SPI encontram aplicação em diversos setores de atividade, tais como: adesivos, plásticos, filmes, revestimentos, emulsificantes na química de alimentos, terapêuticos, equipamentos para agricultura, automóveis, infraestrutura marinha e engenharia civil (Swain, Biswal, Nanda, & Nayak, 2004).

Filmes funcionais na indústria de alimentos são importantes na melhoria e conservação dos produtos, assim, filmes de proteína isolada de soja, combinados com nanocristais de celulose, podem apresentar vantagem correlacionadas, como a melhoria de sua qualidade e

resistência. Este estudo, surge da necessidade de desenvolver materiais biodegradáveis e eficientes, como uma alternativa aos polímeros sintéticos, como objetivo geral, preconiza-se o estudo de parâmetros de extração de CNC de vagem de soja, e analisar o efeito da incorporação destes CNC em matrizes biodegradáveis de proteína isolada de soja.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo analisar o efeito da adição de nanocristais de celulose (CNC) extraídos de vagem de soja afim de avaliar sua influência em algumas propriedades de filmes biodegradáveis de proteína isolada de soja (SPI).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir parâmetros de branqueamento das fibras de vagem de soja;
- Caracterizar a vagem da soja quanto a sua composição química antes a após o branqueamento,
- Analisar os grupos funcionais das fibras por espectroscopia de Infravermelho pela transformada de Fourier (FTIR);
- Obter CNC a partir da vagem de soja branqueada;
- Caracterizar estruturalmente os CNC obtidos, através de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), índice de polidispersão, potencial zeta;
- Avaliação da cristalinidade dos CNC e dos filmes, por difratometria de raios-X;
- Utilizar os CNC na formulação de filmes de proteína isolada de soja pela técnica de *casting* (deposição);
- Analisar o efeito dos CNC nas propriedades de resistência à tração, tensão máxima, tensão na ruptura, deformação específica e módulo de elasticidade dos filmes
- Analisar o efeito dos CNC nas propriedades de barreira, através da análise de permeabilidade ao vapor d'água dos filmes;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Filmes

Um das maiores restrições do mercado de alimentos é a vida útil limitada de produtos alimentícios, que tem como decorrência as reações de oxidação, como a degradação, escurecimento enzimático e o ranço oxidativo. Uma alternativa de novos materiais para reduzir a deterioração de alimentos é a utilização de filmes e/ou revestimentos naturais (biopolímeros). Existem diversos fatores que favorecem o uso de biopolímeros (LUZI, 2016), como o fato de serem relativamente baratos e se apresentam em abundância na natureza. A utilização deste artifício na conservação de alimentos é uma tecnologia em ascensão nesta área e também tem sido aplicada com eficiência a frutas ou a alimentos com alta perecibilidade, como é caso dos minimamente processados, com a finalidade de lhes proporcionar uma maior estabilidade ao longo do armazenamento (Eça, k.s; sartori, t.; menegalli, f.c., 2014).

Filmes devem possuir resistência mecânica adequada e extensibilidade para que possa manter a integridade e resistir aos danos físicos, químicos e microbiológicos que podem ocorrer durante o transporte, processamento, manipulação e armazenamento (Moraes *et al.*, 2012).

Para se obter filmes é necessário a utilização de diferentes componentes de características específicas, devendo conter pelo menos um agente formador de filme, ou seja, uma macromolécula, sendo que os principais grupos, entre os materiais provenientes de fontes renováveis utilizados, são as proteínas, os polissacarídeos e seus derivados e os lipídios, entre eles, os monoglicerídeos, ácidos graxos e ceras naturais. É necessária a solubilização da macromolécula em um solvente, entre eles a água e o etanol. A natureza do solvente interfere na solubilidade das proteínas, uma vez que a força de atração está relacionada com a constante dielétrica do solvente. E um plastificante, podem ser utilizados o glicerol, sorbitol, entre outros. O plastificante proporciona mudança nas propriedades físicas, químicas e mecânicas dos polímeros, alterando assim, sua flexibilidade, diminuindo possíveis descontinuidades e zonas quebradiças dos filmes. (Gontard & Gilbert, 2007). E por fim um agente regulador de pH, se for necessário. (Berbari *et al.*, 2011). As forças envolvidas na formação da matriz filmogênica são determinadas pelas interações entre os constituintes envolvidos em sua formulação.

Filmes são estruturas independentes, moldadas na forma de folhas sólidas e finas, que podem ser aplicadas como embalagem sobre o alimento ou entre seus componentes. Por ficar em contato com os alimentos, é desejável que os filmes, quando comestíveis apresentem

propriedades sensoriais neutras, devem ser transparentes, inodoros e insípidos, de modo a não alterar a qualidade dos mesmos (Eça, 2015).

Os métodos normalmente empregados para a conservação de frutas intactas na condição pós-colheita, ou após alguma etapa mínima de processamento, fazem uso, prioritariamente, de refrigeração associada ou não a embalagens com atmosferas controladas. As condições mais comuns, e de comprovada eficiência, têm por base procedimentos nos quais a temperatura é reduzida logo após a colheita e a cadeia do frio, a uma temperatura apropriada para cada produto, é mantida, preferencialmente em ambiente com alta umidade relativa, até a comercialização final (Barbosa-cánovas et al., 2003; costa e clemente, 2012).

As características finais dos filmes são resultantes das características das macromoléculas utilizadas, das interações entre os constituintes envolvidos na formulação, do processo de produção, do processo de dispersão e das condições de secagem. Quando se trata de embalagens biodegradáveis para alimentos, os principais parâmetros determinantes de sua utilização são: propriedades de permeabilidade ao vapor d'água (PVA), propriedades mecânicas e solubilidade em água. (Cuq et al., 1995).

A PVA consiste num processo de solução e difusão onde o permeante se dissolve em um lado do filme e se difunde até o outro lado. Filmes a base proteínas possuem baixa permeabilidade à gases e alta permeabilidade ao vapor d'água, sendo assim, esse parâmetro fundamental na aplicabilidade dos filmes. (Park et al., 1995). Dentre os principais fatores que afetam a PVA de filmes biodegradáveis, pode-se destacar a natureza química da macromolécula, característica estrutural da matriz polimérica, natureza do permeante e condições ambientais. Macromoléculas altamente polares (proteínas e polissacarídeos), contém grupos hidrofílicos, resultando em filmes com alta PVA. Normalmente, o grupo funcional das macromoléculas polares, interagem com a água através de pontes de hidrogênio, resultando na adsorção de água em altas umidades relativas.

Não obstante isso, as características estruturais da matriz polimérica também são determinantes nas propriedades de barreiras dos filmes. Matrizes formadas por cadeias poliméricas lineares simples, levam à um maior empacotamento e, conseqüentemente a filmes com baixa permeabilidade, enquanto que cadeias poliméricas formadas por grupos laterais volumosos conduzem a uma matriz pouco empacotada, aumentando espaços livres, proporcionando assim, um aumento em sua permeabilidade (Sobral 2000).

As propriedades mecânicas dos filmes biodegradáveis dependem da natureza do material filmogênico e da coesão envolvida na estruturação da matriz polimérica. A coesão está

relacionada com a aptidão do polímero para formar fortes e/ou numerosas ligações entre duas cadeias poliméricas, que dificultam sua separação, quando submetidas à força mecânica (Jiménez, 2007). A resistência mecânica depende da extensão da cadeia polimérica, da sua geometria, da dispersão da força molecular, da natureza da posição de grupamentos laterais, logo, dependem da formulação, do processo de obtenção, e modo de aplicação (Wang *et al.* 2007). O método utilizado na avaliação da resistência mecânica de filmes sintéticos pode ser empregado na avaliação de filmes biodegradáveis. Entre os métodos clássicos, estão os testes de tração. A tensão na ruptura a máxima força que um material pode sustentar. Essa medida pode dar informações da magnitude das forças intermoleculares na estabilização da matriz polimérica. A alongação é usualmente medida no ponto de ruptura do material (Wang *et al.* 2015). A alongação é uma medida importante, pois permite avaliar a habilidade do filme em esticar-se (elasticidade), onde um alto valor de alongação indica que um material pode absorver uma grande quantidade de energia antes do rompimento.

3.2 Proteína Isolada de Soja

Proteínas, de um modo geral são moléculas biológicas de alta massa molecular formada por aminoácidos unidos entre si por ligações peptídicas, como podemos observar na Figura 1. Estes aminoácidos contêm em sua estrutura molecular pelo menos um grupo amino primário (-NH₂) e um grupo carboxílico (-COOH). Além disso, cada aminoácido tem uma cadeia lateral característica (R) que influencia em suas propriedades físico-químicas e, portanto, nas propriedades das proteínas (Bobbio; Bobbio, 2003), e podem ser definidas como polímeros naturais capazes de formar estruturas amorfas tridimensionais estabilizadas principalmente por ligações não covalentes (Cuq, Gontard e Guilbert, 1998), como pode ser observado na Figura 1.

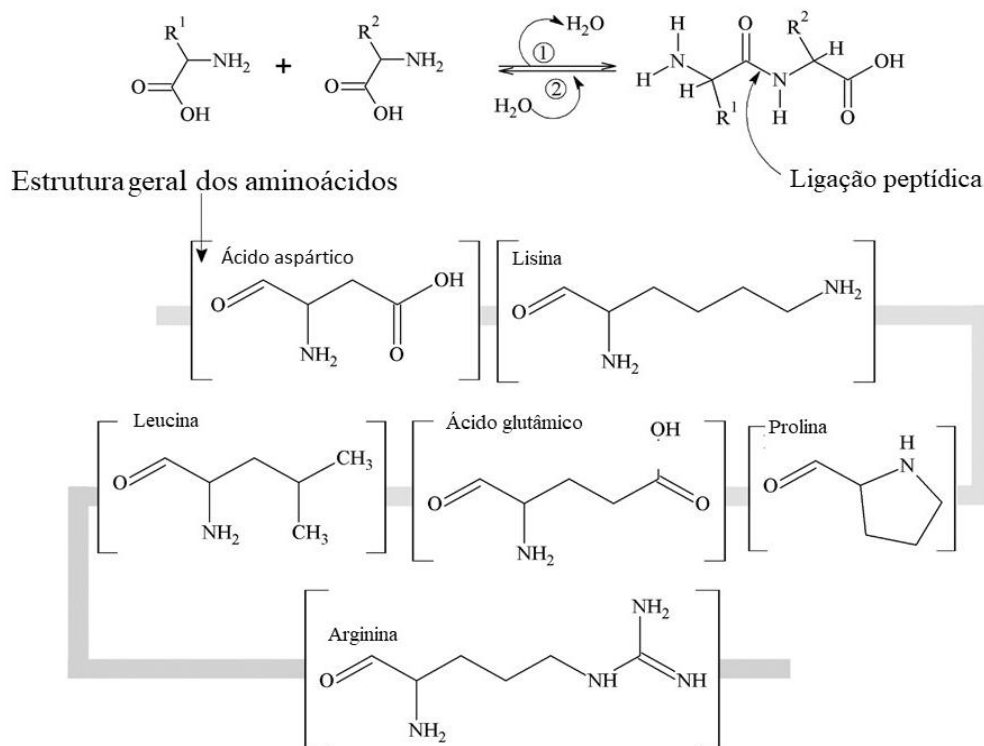


Figura 1 Estrutura química de aminoácidos formando ligações peptídicas, dando origem às proteínas
 Fonte: autoria própria

Uma classificação em termos de níveis de organização descreve as proteínas como possuindo estrutura primária, secundária, terciária e quaternária (Figura 2), onde a estrutura primária de uma proteína consiste na sequência de aminoácidos da sua cadeia polipeptídica ou das suas cadeias polipeptídicas, no caso de esta ser constituída de mais de uma cadeia (Creighton, 1996).

As estruturas secundária, terciária e quaternária destas macromoléculas podem ser modificadas por desnaturação, aumentando a interação entre as cadeias de aminoácidos sem que haja a quebra das ligações peptídicas, melhorando, conseqüentemente a qualidade dos géis e filmes formados, assim como as propriedades mecânicas (Kumar *et. al.*, 2002). A Figura 2 mostra graficamente as estruturas possíveis para as proteínas

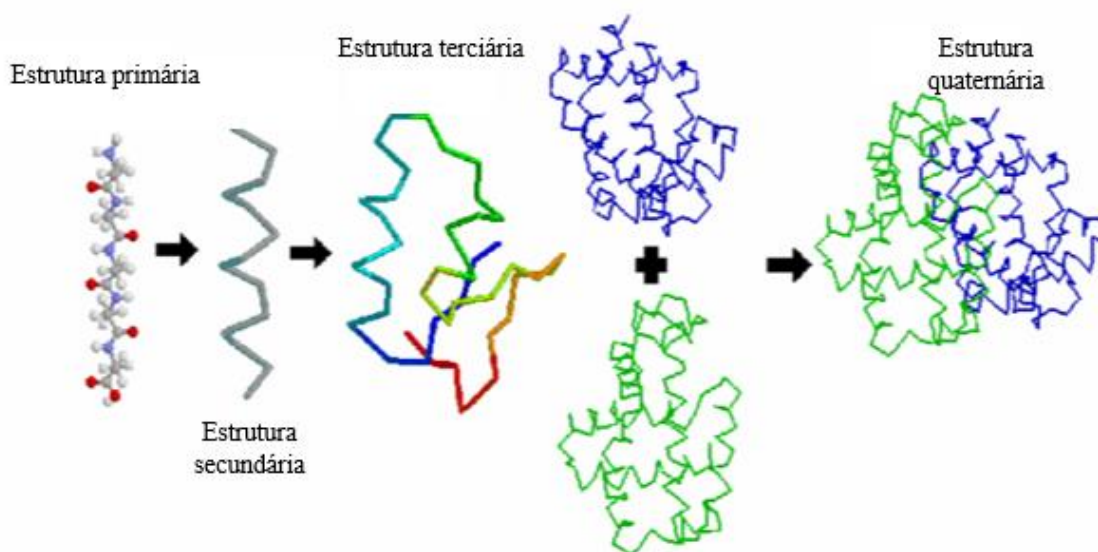


Figura 2 Ilustração gráfica das estruturas possíveis para proteínas
Adaptado de: (Giacomelli, 2005).

A soja é utilizada em diversos setores da economia devido a sua alta competitividade comercial. Dela é possível extrair diversos subprodutos, como o óleo, a farinha e seu isolado proteico. Entre as proteínas utilizadas para aplicação em filmes e coberturas comestíveis, a Proteína Isolada de Soja (SPI) destaca-se devido às suas propriedades estruturais e funcionais que permitem a formação de estruturas com características adequadas para sua utilização como embalagem (Cho et al., 2007; Denavi et al., 2009; Hopkins et al., 2015).

Os materiais construídos a partir da proteína de soja encontram aplicação em diversos setores de atividade, tais como: adesivos, plásticos, filmes, revestimentos, emulsificantes na química de alimentos, terapêuticos, equipamentos para agricultura, automóveis, infraestrutura marinha e engenharia civil (Swain, *et al.*, 2004). É uma proteína de base vegetal que contém uma qualidade protéica igual à da carne, leite e ovos. Seus benefícios nutricionais incluem uma boa fonte de fósforo, potássio, vitamina B, zinco, ferro e a vitamina antioxidante E, além de proporcionar redução do colesterol, aumentar a densidade óssea, prevenir contra o câncer de mama, próstata e tireóide e aliviar os sintomas da menopausa. (Solae Company, 2016). Através da Tabela 1 pode-se observar a composição em aminoácidos para a SPI.

Tabela 1 Aminoácidos majoritários presentes em SPI

Aminoácido	Composição (g/16g nitrogênio)
Metionina	1,26
Triptofano	1,28
Cisteína	1,33
Histidina	2,53

Tirosina	3,14
Treonina	3,86
Glicina	4,18
Alanina	4,26
Isoleucina	5,54
Valina	4,80
Fenilalanina	4,94
Serina	5,12
Prolina	5,49
Lysina	6,38
Arginina	7,23
Leucina	7,78
Ácido aspártico	11,70
Ácido glutâmico	18,70

3.3 Nanocristais de celulose

A celulose é a substância mais abundante do planeta e está presente em grande quantidade nas fibras vegetais. As plantas são consideradas compósitos naturais e seus principais constituintes são a celulose, a hemicelulose e a lignina (Sanjay *et al.*, 2018), como pode-se observar na Figura 3. As regiões nas quais formam-se emaranhados representam as regiões amorfas e as regiões em que se analisa uma ordenação estrutural, relaciona-se à celulose.

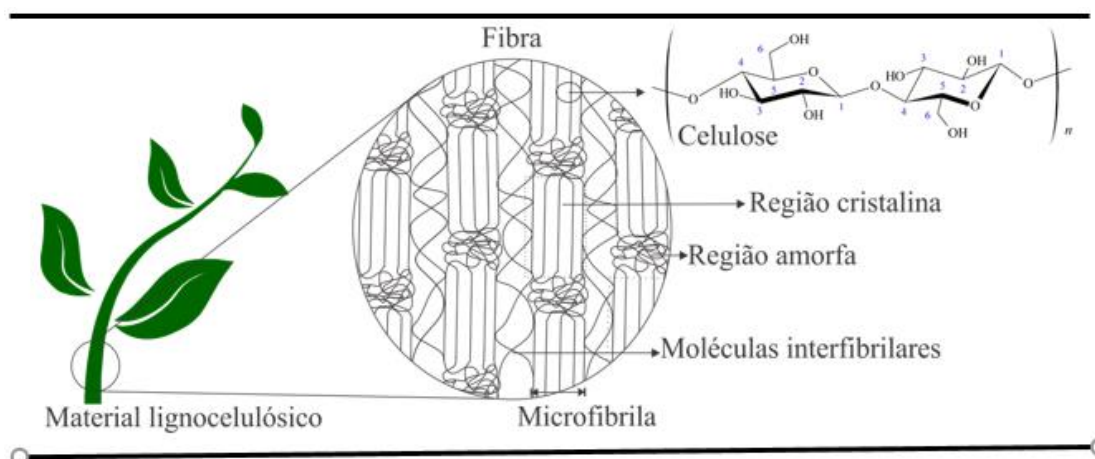


Figura 3 Representação das regiões cristalinas e amorfas das fibras vegetais.
Fonte: (Koschevic, dos Santos, de Faria, Fakhouri, & Martelli, 2018).

Os nanocristais de celulose (CNC) são partículas de celulose acirculares (aspecto físico de agulha) de alta cristalinidade (monocristais quase sem defeitos) e com, pelo menos, uma dimensão igual ou menor a 100 nanômetros (Flauzino Neto *et al.*, 2013) que podem ser extraídas de fibras vegetais. Essas nanoestruturas, quando isoladas, têm sido avaliadas como material de reforço em matrizes poliméricas pelo seu potencial em melhorar as propriedades mecânicas, ópticas, dielétricas, dentre outras, dessas matrizes (Hubbe *et al.*, 2008).

Entre as principais vantagens dos CNC destacam-se sua baixa densidade (cerca de $1,566\text{g/cm}^3$), natureza não abrasiva, caráter não-tóxico, além de ser biocompatível e biodegradável, permitem sua modificação química devido a sua estrutura molecular ter uma superfície reativa de grupos hidroxila laterais, que facilitam a enxertia de espécies químicas para atingir propriedades de superfície diferentes (Flauzino Neto *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Moon *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2011; Samir *et al.*, 2005).

Os CNC podem ser extraídos das fibras vegetais através de duas etapas: mercerização/branqueamento das fibras, que pode ser subdividida em outras duas etapas, a primeira com solução de hidróxido de sódio (NaOH) para remoção da lignina, região amorfa que interfere na eficácia do processo de extração dos CNC. Em seguida, a etapa de branqueamento, realizada normalmente com hipoclorito de sódio ou peróxido de hidrogênio. Esta etapa causa uma alteração na coloração das fibras, deixando-as com aspecto mais claro (Dufresne, 2010).

Após a etapa de mercerização e branqueamento, as fibras tratadas são submetidas à hidrólise ácida. Geralmente realizada com ácido sulfúrico (H_2SO_4) ou ácido clorídrico (HCl).

O isolamento de CNC com ácido sulfúrico foi reportado pela primeira vez por Ranby (1951). Em seguida foi descoberto que a obtenção de CNC também poderia ser alcançada com ácido clorídrico combinado com desintegração mecânica. Partículas obtidas com HCl exibem uma menor carga negativa do que as preparadas com H_2SO_4 , que produz soluções coloidais estáveis (Klemm *et al.*, 2011). A concentração do ácido, temperatura e tempo de hidrólise variam de acordo com a fonte da fibra a ser utilizado.

Esses fatores são de extrema importância para o processo de obtenção, levando-se em consideração que temperaturas muito altas, ácido muito concentrado ou tempo inadequado podem comprometer a estrutura cristalina dos CNC e no tamanho das partículas. A Figura 3 mostra a estrutura da celulose antes e após ser submetida à hidrólise ácida para a remoção da região amorfa e obtenção dos CNC.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

A busca por novos materiais que substituam parcialmente os materiais de fonte petroquímica leva em conta fatores como necessidade, sustentabilidade e impactos sobre a economia, sobre a vida das pessoas e sobre o meio ambiente, no qual há sempre um balanço entre perdas e ganhos entre estes fatores.

Hidróxido de sódio (NaOH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ambos da marca Vetec foram utilizados durante o processo de mercerização e branqueamento. Para a extração dos nanocristais de celulose foi utilizado o ácido sulfúrico P.A com grau de pureza de 95-98%, também da marca Vetec. Os reagentes utilizados para a formulação dos filmes foram a proteína isolada de soja (SPI) 90% proteína, obtida comercialmente, da marca Solae®, plastificante glicerol P.A (Vetec) e hidróxido de sódio (NaOH) para ajuste de pH e membrana de celulose para tubos de diálise 76MM, da marca Sigma Aldrich.

4.2 MÉTODOS

Após recepcionada, a amostra seca foi limpa manualmente, com o auxílio de peneiras, triturada em moinho de facas e armazenada em dessecadores. No fluxograma apresentado na Figura 4 é possível observar todas as etapas à que a vagem de soja foi submetida, desde a sua recepção até seu uso nos testes de extração dos CNC.

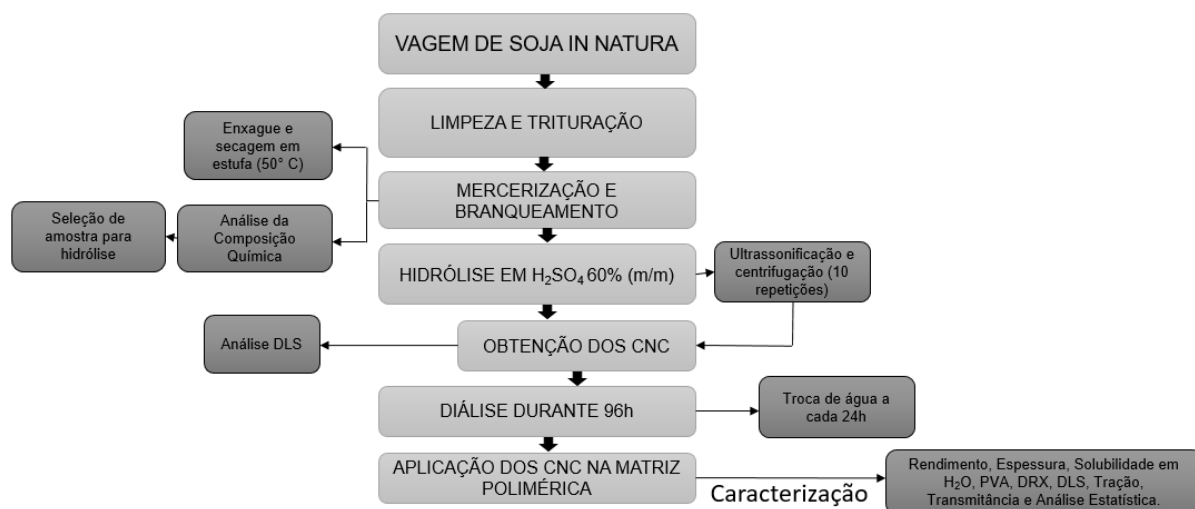


Figura 4 Fluxograma das etapas do processamento que a vagem de soja foi submetida, até a obtenção dos filmes de proteína isolada de soja.

4.3. MERCERIZAÇÃO DA FIBRA DE VAGEM DE SOJA

Os processos de mercerização e branqueamento foram realizados em quatro frações, e para cada uma foi utilizada diferentes concentrações de NaOH, sendo elas: 2,5%, 5%, 7,5% e 10% (m:v), mantendo todas em temperatura ambiente durante 4 horas, ou seja, a variável analisada nesta primeira etapa do estudo foi a concentração de NaOH.

Nesta primeira etapa, quatro amostras de vagem de soja bruta foram tratadas em solução de hidróxido de sódio em diferentes concentrações para cada uma (2,5%, 5%, 7,5% e 10%) com proporção de 20mL de solução para cada grama de fibra (1:20 g/mL). Em seguida, a fibra resultante foi filtrada em tecido TNT e lavada em água corrente até que o pH do eluído fosse aproximadamente 7 e posteriormente, seco em estufa com circulação de ar à 50°C por 24 horas, conforme apresentado na Figura 5.

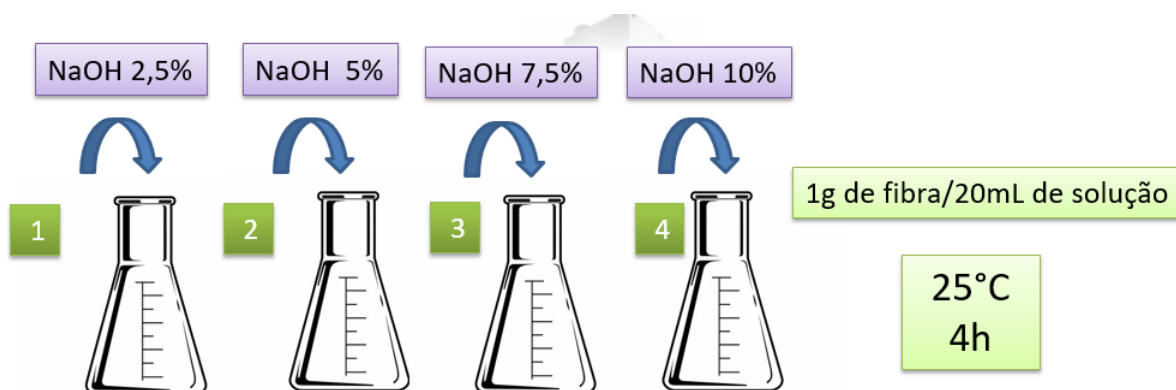


Figura 5 Esquema representativo do processo de mercerização das fibras de vagem de soja *in natura*.

4.4. BRANQUEAMENTO DA FIBRA DE VAGEM DE SOJA

As 4 amostras de fibras mercerizadas foram levadas ao processo de branqueamento, onde 10g de cada amostra foi colocada em béqueres contendo 200mL de uma solução composta de partes iguais (v:v) de peróxido de hidrogênio 30 volumes e solução de hidróxido de sódio 5% (m/v), mantendo-se sob agitação a 200rpm durante 2 horas, analisando as temperaturas de 25°C, 50°C, 75°C e 100°C para delimitar os parâmetros ideais de branqueamento para este tipo de fibra. Esta etapa foi realizada 2 vezes para cada amostra.

Subsequente a isso, as amostras foram lavadas e secas em estufa com circulação de ar à 50 °C durante 24 horas. Através da Figura 6 pode-se analisar o percurso da vagem desde o momento da recepção até o momento em que ela foi triturada e armazenada.



Figura 6 Vagem de soja, onde: a) recepção; b) peneiramento e limpeza; c) trituração; d) vagem triturada e e) armazenadas em dessecador.

Ao final do processo de branqueamento, amostra que obteve a coloração mais próxima ao branco foi selecionada para os testes de extração de CNC. Na Figura 7 observa-se uma síntese desta etapa com ênfase à metodologia escolhida.



Figura 7 Esquema representativo do processo de branqueamento das fibras de vagem de soja mercerizadas.

4.5 EXTRAÇÃO DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE

Para extração dos CNC da fibra purificada, utilizou-se o processo de hidrólise ácida. Essa hidrólise foi realizada com a utilização de 200mL de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 60% (m/m). A solução de ácido sulfúrico 60% em massa foi obtida adicionando-se 449,156mL de H_2SO_4 em 551,0mL de água destilada, em um recipiente, resfriado com o auxílio de um

banho de gelo. Em um béquer contendo 200mL de solução H₂SO₄ 60% (m/m) foram adicionadas 10g da fibra que obteve melhor resultado no processo de branqueamento. A temperatura foi mantida a 40°C sob agitação vigorosa. Foram retiradas alíquotas de aproximadamente 50mL da solução contendo ácido sulfúrico e fibra após intervalos de 30min, 1h, 1h30min e 2h de hidrólise. Em cada alíquota retirada, foram adicionadas o mesmo volume (50mL) de água destilada gelada para cessar a hidrólise. Em seguida, as amostras foram ultrassonificadas durante 10 minutos e o excesso de ácido sulfúrico foi removido por meio de 10 ciclos de centrifugação com 10 minutos cada a 1.500 rpm em centrífuga Simplex, GuiaLat®, como pode ser observado no esquema apresentado na Figura 8.



Figura 8 Esquema simplificado dos procedimentos utilizados para a extração dos CNC.

A cada ciclo de centrifugação, o sobrenadante foi descartado e substituído pelo mesmo volume de água destilada até que fosse possível observar uma suspensão túrbida, indicando a presença dos CNC. Após os processos de ultrassonificação à temperatura ambiente por 10 minutos cada ciclo e centrifugação à 1500 rpm e temperatura ambiente, as suspensões contendo CNC foram dialisadas durante 96 horas realizando-se a troca da água diariamente.

4.6 OBTENÇÃO FILMES

Para a elaboração dos filmes de SPI, delimitou-se a concentração de 6% (m/v) de proteína isolada de soja, com base em pré-testes realizados. Posteriormente, foram incorporados percentuais distintos de suspensão de nanocristais de celulose à formulação. Para o cálculo da concentração dos nanocristais em solução, foi tarada uma placa de petri, e adicionados 50 mL dos CNC em suspensão, levados para secagem em estufa com circulação de ar, a 70 °C por 24

horas, apresentando um rendimento de 0,71mg/mL, dado essencial para o cálculo de percentual de CNC nos compósitos - Tabela 2.

As soluções filmogênicas foram preparadas através da dissolução de 12g de SPI em 200mL de solução aquosa com diferentes concentrações de CNC, sob agitação e temperatura de 80°C durante 1 hora, conforme apresentado na Tabela 1. Foi estabelecido a adição de 40% de plastificante glicerol em relação à massa da macromolécula.

Testes preliminares foram realizados a fim de delimitar qual o pH ótimo para o processo de formação de filmes de SPI plastificados com 40% de glicerol. Para a realização dos testes, gotejou-se solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ na formulação controle, até atingir os valores de pH 8, pH 9, pH 10 e pH 11. Após isto, estes filmes foram secos em estufa com circulação de ar à 40°C e, depois de secos, uma avaliação visual foi realizada para determinar em qual valor de pH os filmes apresentavam-se mais homogêneos. Delimitado o melhor pH, os filmes que foram utilizados neste estudo foram produzidos.

Foram preparados filmes contendo 0% (Controle), 0,3%, 0,5%, 0,7% e 1,0% de nanocristais de celulose, utilizando-se 6% de SPI (m/v) e plastificados com 40% de glicerol em relação à massa de proteína. A tabela 2 mostra a formulação da amostra controle e dos nanocompósitos com diferentes porcentagens de CNC.

Tabela 2. Formulação de filmes de SPI 6% plastificados com 40% de glicerol com diferentes concentrações de CNC em suspensão, considerando-se 200mL de solução.

Amostra	SPI 6% (g)	Percentual de CNC (%) ¹	Volume de CNC em solução (mL) (0,71mg/mL)	Volume de água (mL) (200 mL)	40% de Glicerol (g) ¹
Controle	12,00	0,00	00,00	200,00	4,80
0,3 CNC	12,00	0,30	50,70	149,30	4,80
0,5 CNC	12,00	0,50	84,50	115,50	4,80
0,7 CNC	12,00	0,70	118,30	81,70	4,80
1,0 CNC	12,00	1,00	169,01	30,99	4,80

¹ Valor calculado em função da massa da macromolécula.

Uma vez preparadas, as soluções filmogênicas foram depositadas uniformemente em placas de poliestireno DE 140 mm, para evaporação do solvente. A espessura dos filmes foi controlada pela deposição do mesmo volume (35 mL) de solução por placa. A evaporação do solvente ocorreu em estufa com circulação de ar, com temperatura de 40°C durante um período de 18h (*overnight*). Em seguida os filmes secos foram removidos das placas e armazenados em dessecadores contendo solução supersaturada de Nitrato de Magnésio Mg(NO₃)₆H₂O com

umidade relativa de 58% e temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) até o momento das análises.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DA FIBRA, CNC E FILMES

4.7.1 Teor de Lignina, Celulose e Compostos Inorgânicos – Fibra de Vagem de Soja

O teor de lignina, celulose e compostos inorgânicos das fibras foi quantificado de acordo com a metodologia adaptada de Silva e Queiroz (D. J. Silva & Queiroz, 2006). Inicialmente realizou-se a determinação da umidade das fibras, conforme a Equação 1:

$$TU\% = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

Equação 1: Cálculo do teor de umidade.

Na qual:

TU% = teor de umidade percentual; P_i = peso inicial da amostra; P_f = peso final da amostra;

A determinação da fibra bruta foi realizada conforme a metodologia proposta por Silva e Queiroz (2006), os saquinhos de TNT contendo as amostras secas, com a massa previamente aferida, foram imersos em solução ácida (FDA) (H_2SO_4 1N). O resíduo do FDA, foi tratado com permanganato de potássio (D. J. Silva & Queiroz, 2006) e estimou-se o teor de lignina, após o FDA foi removido e estimou-se o teor de celulose, posteriormente ao tratamento as fibras foram queimadas em mufla à 550 °C, para a obtenção do valor de cinzas.

$$\frac{MCC - MF}{MA} \times 100 = TC\%$$

Equação 2: Teor de celulose.

$$\left(\frac{MCL - MC}{MA} \times 100 \right) - TC\% = TLI\%$$

Equação 3: Teor de lignina insolúvel.

Onde:

MCC = massa do cadinho filtrante com cinzas, após calcinação em mufla.

MCL = massa do cadinho somada à massa de lignina, após a secagem em estufa.

MC = Massa do cadinho limpo e seco.

MA = Massa da amostra.

4.7.2 Rendimento dos CNC e da Fibra

Para determinar o rendimento das fibras após o processo de branqueamento, utilizou-se a massa seca antes e ao final do processo, considerando-se 20 gramas de fibra *in natura* (como valor inicial) e através do cálculo da massa seca, determinou-se o rendimento após o branqueamento.

Para o cálculo de rendimento dos CNC, adicionou-se 50mL de solução contendo CNC e levou-se novamente à estufa, com temperatura de 70 °C por 24H, até que a solução evaporasse e o conteúdo resultante da secagem fossem os CNC secos. Através do cálculo da diferença entre a placa contendo os CNC e da placa tarada, determinou-se a concentração de CNC em mg/mL de solução.

4.7.3 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

A técnica permite a caracterização da estrutura molecular da fibra através da identificação dos seus grupos funcionais, além de caracterizar as possíveis interações intra e intermoleculares existentes através do deslocamento de bandas de absorção características. Essa análise foi realizada no Laboratório de Óptica da UFGD, por meio da utilização de um Espectrofotômetro modelo FT/IR-4100typeA acessório ATR PRO450-S.

4.7.4 Espalhamento de Luz Dinâmico E Potencial Zeta - CNC

O espalhamento de luz dinâmico (DLS) é uma técnica não invasiva e bem estabelecida de medição do tamanho e da distribuição do tamanho de moléculas e partículas, normalmente na região dos submicrométricos. Em geral, o espalhamento de luz dinâmico é aplicado na caracterização de partículas, emulsões e moléculas que foram dispersas ou dissolvidas em um líquido. Para a realização dessa análise, uma amostra de dispersão de CNC em meio aquoso foi colocada em um béquer e ultrassonificada por 30min, para completa separação dos CNC, evitando a formação de aglomerados. Em seguida, a suspensão foi colocada em uma cubeta de vidro e foi realizada a leitura do DLS e do potencial zeta. A análise foi realizada Laboratório LP6 do Instituto de Química da UFMS em Campo Grande-/MS.

4.7.5 Difração de Raios-X – CNC e Filmes

Os ensaios de difração de raios-X foram realizados em um difratômetro, com radiação $K\alpha$ de cobre, voltagem de 40 kV, corrente de 40 mA, varredura 0,05 ($2\theta/5$ s) para valores de 2θ entre 5 e 45°. Posteriormente avaliou-se o grau de cristalinidade do CNC liofilizado e dos filmes.

A análise foi realizada no Laboratório de Química de Superfícies e Moléculas Bioativas da UFMS em Campo Grande-/MS.

4.7.6 Espessura - Filmes

A espessura foi medida usando micrômetro do modelo MDC-25M Mitutoyo, MGF, Japan, e foi realizada em cinco pontos diferentes em cada amostra e calculada a média.

4.7.7 Solubilidade em Água - Filmes

A solubilidade em água dos filmes foi determinada como descrito por Gontard *et al.*, (2007) com algumas adaptações. Primeiramente, os filmes foram cortados em discos com 2cm de diâmetro e em seguida foram pesados e secos a 105°C por 24 h em estufa com circulação de ar, para a determinação da massa inicial de sólidos de cada amostra. Após isso, os filmes foram imersos em 50mL de água destilada e mantidas sob agitação a 100 rpm a temperatura ambiente durante 24h. No dia seguinte as amostras foram transferidas para placa de petri e secas novamente a 105 °C por mais 24h. O conteúdo de sólidos foi então determinado. Cada determinação foi realizada em triplicata (GONTARD, DUCHEZ, CUQ, & GUILBERT, 2007).

4.7.8 Permeabilidade ao Vapor D'água - Filmes

A permeabilidade ao vapor d'água foi determinada de acordo com a ASTM E96-80 (1980). As amostras foram fixadas em cápsulas de acrílico contendo em seu interior cloreto de cálcio anidro ($CaCl_2$). O cloreto de cálcio anidro foi previamente seco em estufa a 105°C por 24 h e cerca de 5g foram utilizadas em cada célula. As células foram acondicionadas em uma cuba hermética contendo em seu interior, solução supersaturada de cloreto de sódio (NaCl) com UR de 75%, a qual foi mantida a temperatura ambiente (25°C) e pesadas a cada 60 minutos em

balança analítica, em um espaço de tempo de 10 horas. Desta forma determinou-se o ganho de peso (umidade) de cada célula com o tempo ocasionado pelo gradiente de UR de 2-75%. A Figura 6 ilustra as cápsulas já com os filmes anexados acomodadas nas cubas herméticas. As pesagens foram realizadas em triplicata (ASTM E96, 1980). O valor de PVA foi obtido pela equação X:

$$PVA = \frac{\frac{m}{t} \cdot e}{A \cdot ps(UR1 - UR2 / 100)}$$

Equação 4: Cálculo do teor de umidade.

Onde: O e é a espessura média de cada filme (m);

A é a área de permeação (0,0019 m²);

UR1 é a umidade relativa no interior da cuba (75 %);

UR2 é a umidade relativa no interior das células (2 %);

O ps é a pressão de saturação do vapor a temperatura do ensaio (kPa).

E o termo mt (g água/dia) foi calculado a partir da regressão linear obtida pelo ganho de massa em função do tempo.

A Figura 9 representa o esquema utilizado no preparo das amostras para realização do ensaio de PVA.

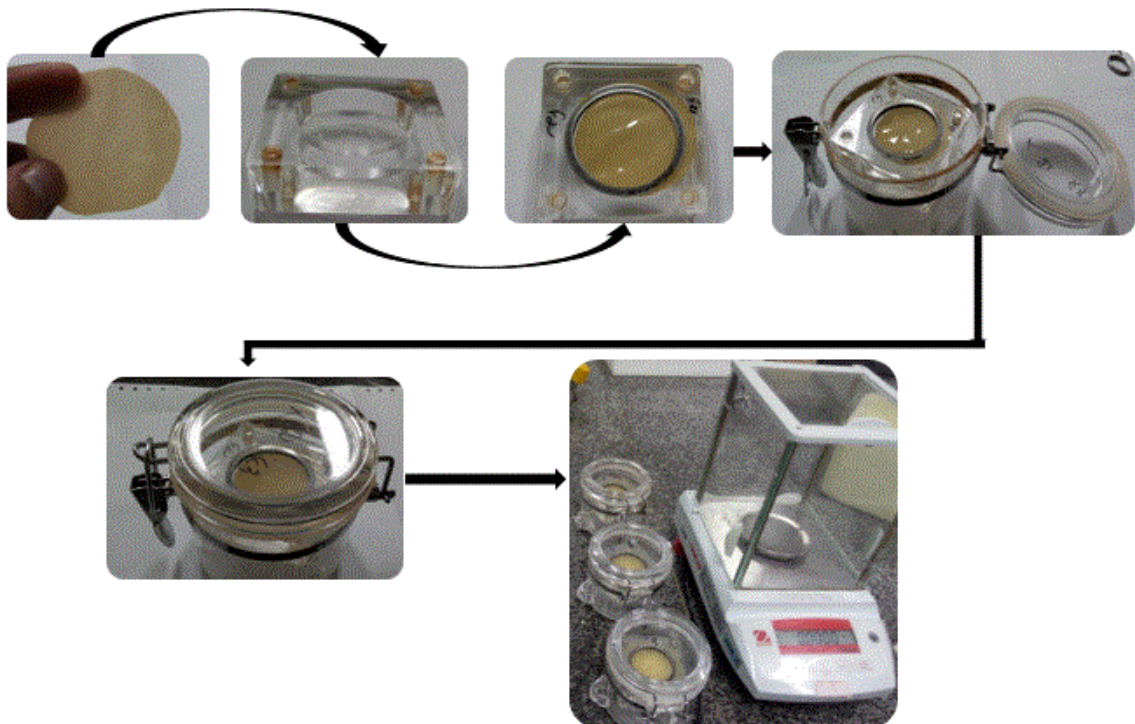


Figura 9 Cubas herméticas e balança analítica utilizadas para a análise de PVA

4.7.9 Ensaio Mecânico de Resistência À Tração

Os testes mecânicos de resistência à tração dos filmes foram realizados conforme a norma ASTM D882, utilizando-se a máquina universal de ensaios da marca Emic (modelo DL2000) e célula de carga TRD-21 com capacidade de carregamento igual a 50kg (490,5 N). Através da Figura 10 é possível analisar o preparo das amostras, o equipamento utilizado para a análise de tração e o software do equipamento (ASTM D882, 2012).

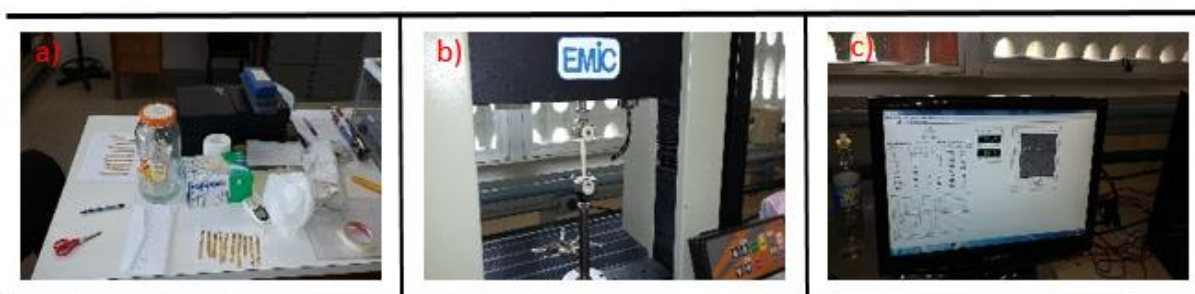


Figura 10. Ensaio de tração, onde: a) mostra o preparo das amostras; b) o equipamento utilizado e; c) o software utilizado para a análise dos dados.

Os corpos de prova foram obtidos a partir dos filmes, apresentando espessura uniforme de 0,08-0,200mm, 130mm (comprimento), 10mm (largura) e condicionados antes da realização dos ensaios a $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, $58\pm 3\%$ durante 48 h. Posteriormente, os corpos de prova foram posicionados na máquina universal de ensaios com espaçamento de 50mm entre as garras mecânicas.

Os testes de resistência à tração foram realizados com velocidade constante de 25mm/min., a $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $58\pm 3\%$ UR. Para cada formulação foram realizadas 10 replicações. Os dados foram coletados da máquina universal de ensaios por meio do *software* Tesc[®] versão 1.13.

4.7.10 Transmitância

A transmitância dos filmes foi determinada utilizando espectrofotômetro (Varian, modelo Cary 50). Os filmes de SPI foram cortados em formato retangular (1 x 3 cm) e colocados dentro de uma cubeta transparente de vidro. Foi feita uma varredura da absorbância de 400 a 800 nm para cada tratamento.

4.7.11 Análise estatística

O programa Assistat® versão 7.7 foi utilizado para calcular as análises de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado para determinar diferenças entre as propriedades químicas das amostras no intervalo de 95% de confiança (Francisco & Carlos, 2016).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teor de Lignina, Celulose e Compostos Inorgânicos – Fibra de Vagem de Soja

O tratamento com NaOH visa a retirada dos componentes amorfos da fibra, mantendo a celulose intacta. Os íons sódio interagem com a lignina e com a hemicelulose, de forma a reduzir a intensidade de suas interações de hidrogênio, o que causa o aumento da solubilidade desses componentes e favorece sua eliminação no meio aquoso, mostrando que em condições de alcalinidade branda, a cinética de hidrólise é bastante lenta (Hon & Shiraishi, 2001; Pandey, Lee, & Ahn, 2010).

A cor pode ser um indicativo da remoção da lignina de fibras naturais. Considera-se que quanto mais próximo do branco, menor o teor de lignina. As etapas de mercerização e branqueamento aplicado às amostras resultou em diferentes colorações, de acordo com a concentração de NaOH e temperatura de análise. Neste estudo, a amostra de fibra que foi submetida ao NaOH 5% no processo de mercerização e posteriormente branqueada a 50°C em solução composta de partes iguais (v:v) de peróxido de hidrogênio 30 volumes e solução de hidróxido de sódio 5% (m/v), apresentou a coloração mais próxima ao branco. Essa característica fez com que essa amostra fosse selecionada para os testes de extração de CNC. Na Figura 11 é possível observar as etapas em que a vagem de soja foi submetida, desde a recepção até o final da etapa de branqueamento.

Mercerização e branqueamento

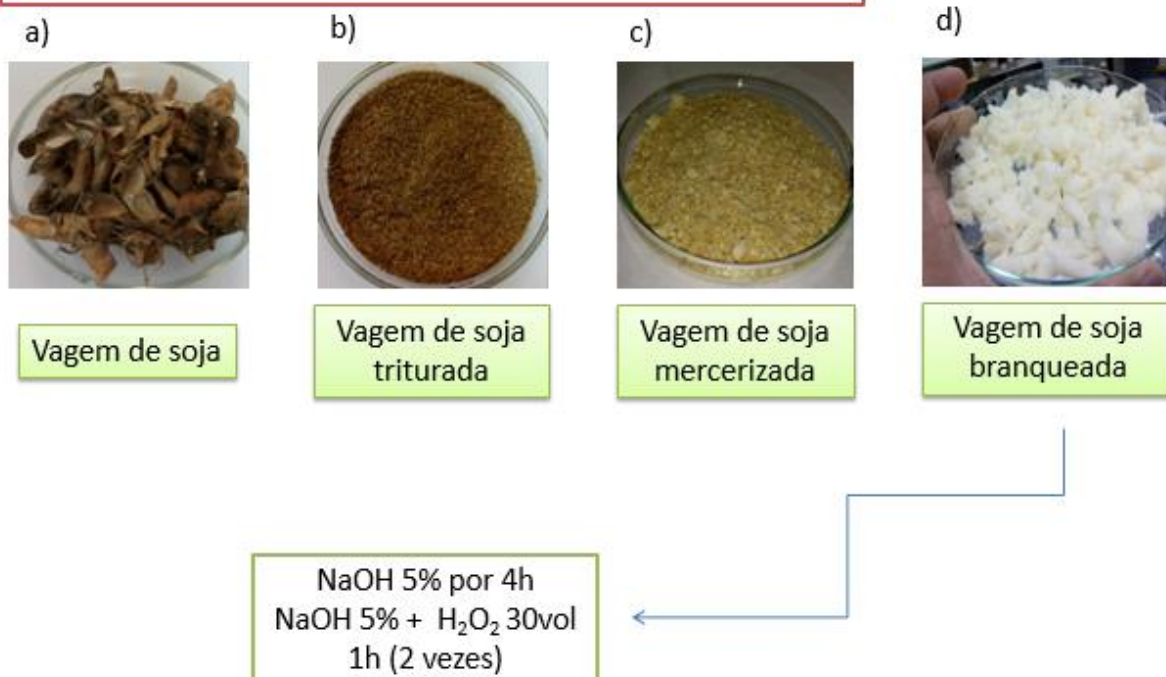


Figura 11 Aspecto visual da fibra de vagem de soja durante os processos de trituração, Mercerização e branqueamento

Na Figura 12 é possível observar o gráfico com a determinação do teor de celulose, lignina e cinzas das fibras antes e depois do processo de branqueamento. Os dados foram corrigidos em relação ao teor de umidade para cada amostra.

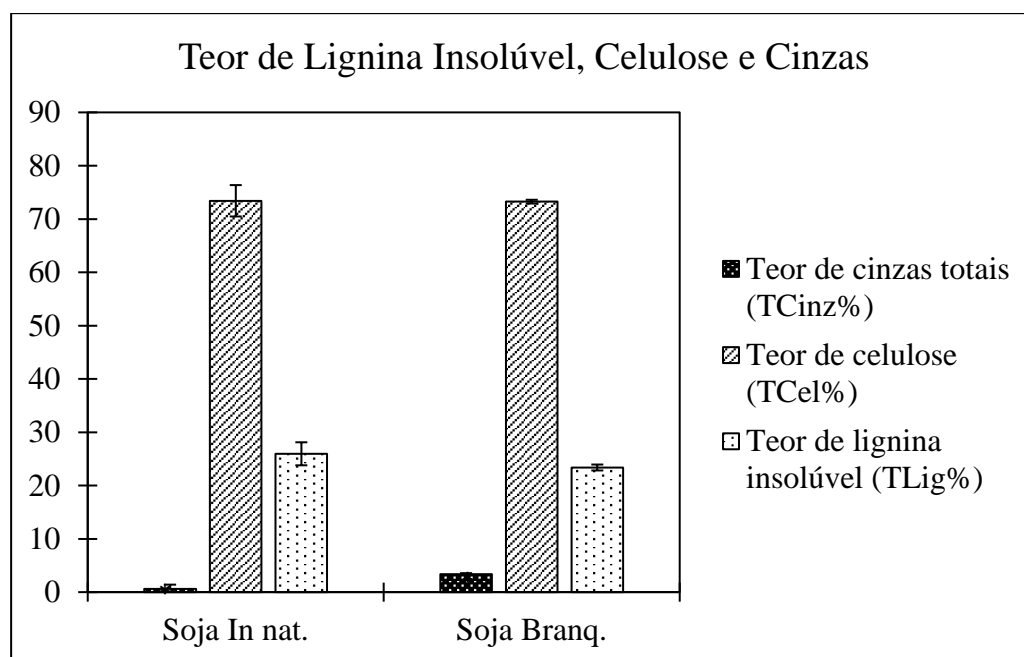


Figura 12 Gráfico com a determinação do teor de celulose, lignina e cinzas das fibras

*As médias diferem estatisticamente, aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

A fibra de vagem de soja apresentou percentuais de 73% de celulose e 25% de lignina para a fibra *in natura* e 73% de celulose e 23% de lignina na fibra branqueada, observa-se pouca alteração destes percentuais, dado esse que não exclui essa fibra do interesse em relação a extração de CNC, levando-se em consideração o alto teor de celulose encontrado em sua fibra antes mesmo do processo de branqueamento. Quanto maior o teor celulósico, acredita-se que maior será o rendimento dos CNC em relação à massa de fibra utilizada no processo de extração. O fato de a eliminação da lignina ser considerado baixo pode resultar na dificuldade em se obter os nanocristais pela hidrólise ácida, causando alterações em seu rendimento.

Os valores apresentados neste estudo encontram-se dentro dos padrões já analisados por Okubo, *et al.*, (2005) que, em estudos feitos com fibra de bambú, obteve valores de 30 a 45% de celulose, 15 a 25% de hemicelulose e 20 a 30% de lignina (Okubo, Fujii, & Yamashita, 2005).

Fonseca *et al.*, (2013) analisaram os teores de celulose, cinzas e lignina de fibras amazônicas, com o propósito de utilizá-las para extração de CNC. Entre as fibras por eles analisadas, os valores encontrados também se assemelham, em partes, com os valores encontrados para a vagem de soja. A fibra de Tucum, por exemplo, apresentou valores de 75,54% de celulose, 1,87% de cinzas e, para a lignina o valor encontrado foi de 3,81%, valor abaixo da média quando comparado com os valores encontrados na literatura. Já para a fibra de Arumã, o valor de celulose foi de 50,66%, dado este abaixo dos valores encontrados para a vagem da soja, que apresentou valor de 73%. A fibra de Arumã apresentou valores de 0,48% para cinzas e 25,44% para lignina, semelhantes aos valores encontrados no presente estudo. Os valores encontrados neste trabalho são favoráveis em relação ao alto teor de celulose presente na vagem de soja, fato este que torna esta fibra uma potencial fonte para a extração de CNC (FONSECA *et al.*, 2013).

As fibras foram analisadas por FTIR, afim de analisar a vibração de rede dos grupos funcionais da celulose e da lignina da fibra *in natura* e da fibra após o processo de branqueamento, como pode-se observar na Figura 13.

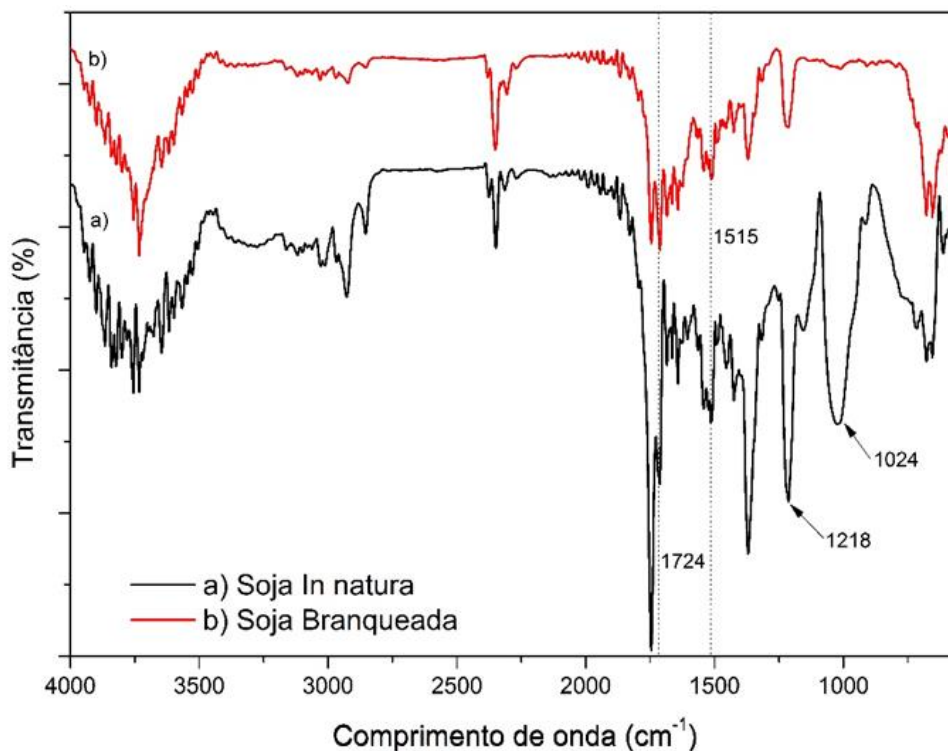


Figura 13 Espectro de FTIR para as amostras de vagem de soja in natura e branqueadas.

Através dos espectros é possível observar a redução das bandas correspondentes a lignina e hemicelulose, indicando que mesmo com a baixa redução dos teores de lignina apontados na Figura 13, os tratamentos alcalinos empregados nas amostras de vagem de soja foram suficientes para a redução das bandas características da lignina nos espectros de FTIR.

Acerca das bandas observáveis nos espectros de FTIR, é possível verificar que próximo de 2910 cm^{-1} os picos referem-se a trechos simétricos e assimétricos das ligações C-H de cadeias alifáticas. A ênfase nas bandas de 1800 e 550 cm^{-1} , se deve as faixas compreendidas pelos grupos funcionais característicos da celulose, hemicelulose e lignina e suas unidades de repetição, como observado na Tabela 3.

Tabela 3 Principais vibrações na região do FTIR observadas para a vagem de soja *in natura* e branqueada

Número de onda (cm ⁻¹)	Vibrações e origem
670	C-OH ligação fora do plano – Celulose;
895	Ligações glicosídicas simétricas – Polissacarídeos;
1162	C-O-C estiramento assimétrico – Celulose e hemicelulose;
1240	C-O grupo aril – Lignina;
1335	C-O anel aromático – Celulose;
1505	C=C estiramento simétrico aromático – Lignina;
1650-1630	OH (água) – Água;

1732	C=O estiramento Xilanas Hemicelulose;
2850	CH ₂ estiramento simétrico – Gorduras;
2885	C-H estiramento simétrico – Polissacarídeos;

A banda em aproximadamente 1720-1730 cm⁻¹ que pode ser associada a ligações C=O, presentes na hemicelulose e lignina, ou as ligações éster dos grupos carboxílicos. Enquanto a banda em 1235 cm⁻¹, que pode ser atribuída à C-O, ligados a grupos aromáticos, conforme os gráficos apresentados, observa-se uma diminuição na intensidade destes sinais, e, portanto, correlaciona-se a redução destes compostos.

As amostras expressam uma banda em torno de 1505-1520 cm⁻¹, relativas a ligações C=C presentes nos anéis aromáticos, e também presentes na lignina (MARIANO, 2013). Esta banda, não desaparece nas amostras, mas perde intensidade, mais um indicativo de que as fibras branqueadas apresentaram uma remoção parcial da lignina ou alguma até mesmo, determinada degradação da celulose durante os processos de branqueamento.

5.2 Rendimento da Fibra e do CNC

O rendimento quantitativo das fibras após os processos de mercerização e branqueamento foi de 82% em massa, valor superior, quando comparado com a literatura em outros tipos de fibras naturais, como por exemplo Flauzino Neto (2012) que, em estudo realizado com casca da soja e folha de abacaxi, obteve valores de 46% e 40% de rendimento. Silvério (2013) também analisou o rendimento de sabugo de milho após os processos de purificação e obteve valores de rendimento de 41% (Flauzino Neto, Silvério, Dantas & Pasquini, 2013).

Acredita-se que os valores encontrados neste estudo são superiores aos encontrados na literatura, esteja relacionado à metodologia utilizada durante o enxague e filtragem da fibra, após os tratamentos alcalinos, feitos com água corrente e filtradas em TNT, possibilitando maior controle de perdas durante o processo.

O rendimento dos CNC após o processo de hidrólise foi de 0,71mg/mL. Este valor está relacionado à suspensão de CNC após secagem para evaporação da solução.

5.3 Análise dos Nanocristais de Celulose - Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta

O espalhamento de luz dinâmico foi empregado para encontrar a distribuição estática das partículas. Os resultados DLS incluem o índice de polidispersão (PDI). Para a amostra de CNC extraído da vagem de soja, o valor obtido foi de 0,645. Esse valor indica o grau de homogeneidade da suspensão dentro da distribuição de tamanho da amostra, quanto mais próximo o valor PDI para 0, mais homogênea é a amostra, enquanto os valores mais próximos de 1 indicam que a amostra possui uma grande distribuição de tamanho (Smyth, García, Rader, Foster, & Bras, 2017).

Os CNC suspensos em água foram ultrassonificados e analisados pelo DLS. A Figura 14 indica que a maioria das partículas da solução encontra-se na faixa nanométrica. Além disso, observaram-se distribuições de tamanho estreito das partículas. O tamanho mínimo de partícula foi de 75,87nm, com desvio padrão de 17% o que representa 98,1%, posteriormente temos apenas 1,9% de partículas com cerca de 383,9nm. Conforme os percentuais observados, constata-se que existe uma distribuição homogênea dos nanocristais na solução. (Figura 14)

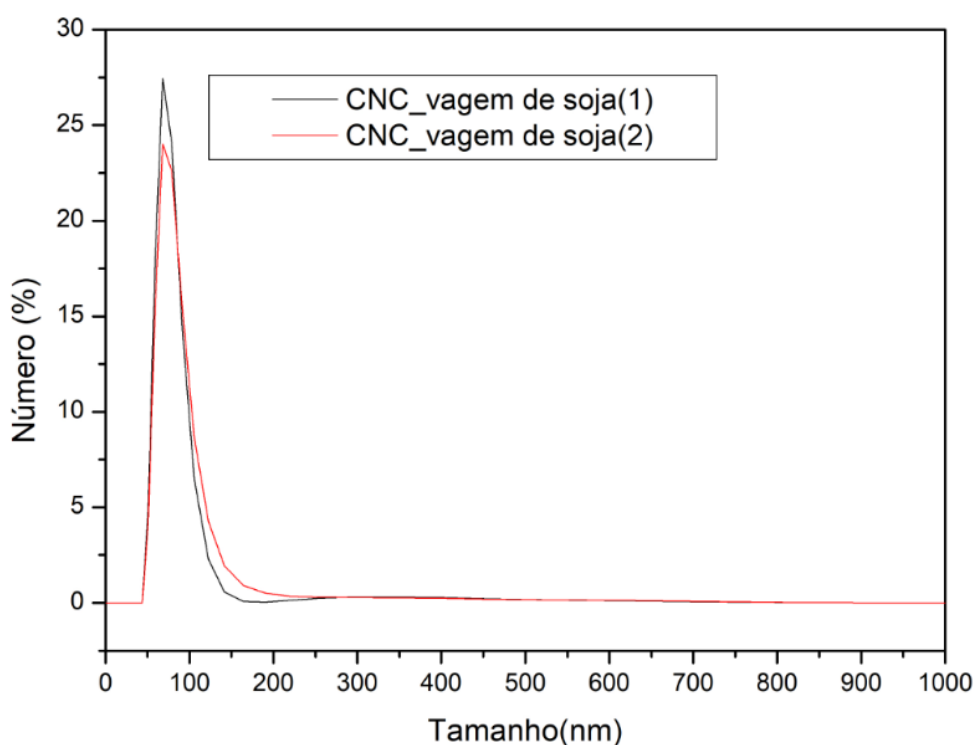


Figura 14 Gráfico do espalhamento de Luz Dinâmico dos CNC

Pode-se considerar que estes resultados não são convencionais, visto que as medidas DLS consideram que as partículas tenham uma forma esférica, e estruturas de CNC são

conhecidos como materiais tipo haste/bigode (Smyth *et al.*, 2017). Então, o DLS é usado para confirmar as partículas isoladas são de fato nanopartículas.

A estabilidade dos nanocristais de celulose em suspensão foi determinada pela medida do potencial zeta (ζ). A presença de carga negativa desenvolvida pelo acoplamento de grupos de sulfato devido à hidrólise do ácido sulfúrico induz a formação de uma camada eletrostática negativa que cobre os nanocristais e promove a sua dispersão na água. Aglomeração de nanocelulose ocorrerá se o valor do potencial de zeta for menor que -15 mV (Khouri, 2010). Dentro desta faixa, as partículas não têm carga suficiente para se repelir, aglomerando-se. A suspensão estável deve ter um valor de potencial zeta inferior a -30 mV e superior a 30 mV (Mohaiyiddin *et al.*, 2016).

Os CNC isolados mostraram um valor de potencial zeta negativo médio de -26,95, de acordo com valor calculado pela média de duas amostras, mostrando-se estáveis em solução. O potencial zeta negativo abaixo de -30 mV, demonstra sua capacidade de permanecer estável em solução (Faradilla *et al.*, 2016). O desempenho dos nanocristais de celulose como agentes de reforço também pode ser associado à carga superficial (potencial zeta), assim as partículas de tamanho nanométrico devem ter alto potencial zeta, de modo que a suspensão coloidal pode resistir à agregação, levando ao aumento do grau de dispersão (Naduparambath *et al.*, 2018).

5.4 Filmes de Proteína Isolada de Soja

Através das condições propostas, foi possível o preparo dos filmes de SPI com adição dos CNC, que se apresentaram homogêneos, límpidos, e sem deformações quando analisados visualmente. A secagem dos filmes foi determinada após pré-testes em estufa com circulação de ar e secagem na bancada. A figura 15 evidencia as diferenças observadas no método de secagem. A secagem em bancada foi ineficiente, deixando a amostra com muitos defeitos aparentes.

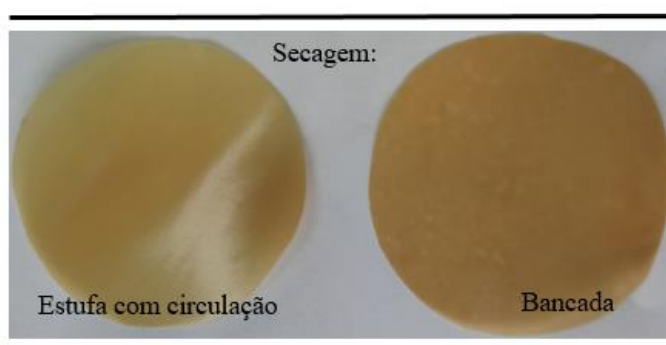


Figura 15 Aspecto visual dos filmes de SPI após a secagem.

Segundo estudo realizado por Rhim *et al.*, (2002), condições alcalinas favorecem a formação de filmes de SPI por ajudar na dispersão da proteína na solução filmogênica (Rhim, Gennadios, Weller, & Hanna, 2002). Com base nessas informações e após os testes preliminares apresentados na metodologia, os filmes que foram preparados com pH 10 obtiveram menores inconformidades e maior homogeneidade. Pode-se observar na Figura 16, um filme visualmente homogêneo, sem bolhas, sem presença de deformidades, com coloração brilhante e sem defeitos aparentes.

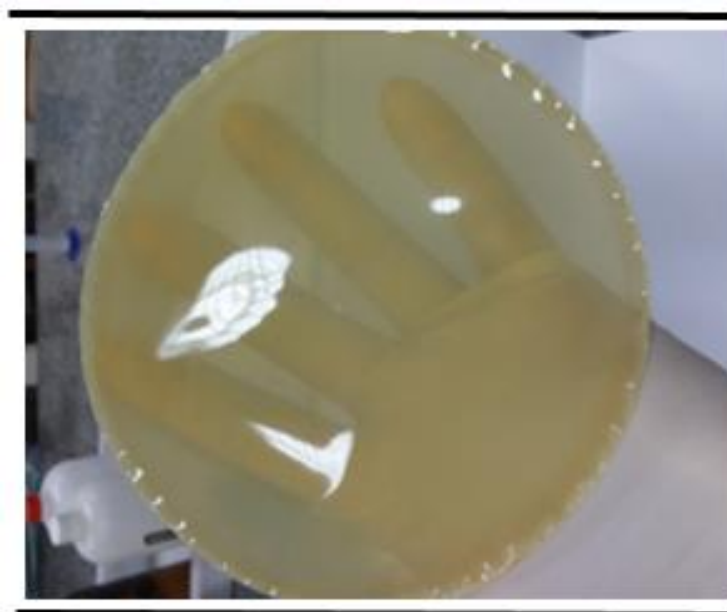


Figura 16 Aspecto visual dos filmes de SPI momentos antes das análises

5.5 Difração de Raios-X – CNC e Filmes

A cristalinidade da celulose e da nanocelulose é um fator importante para determinar suas propriedades de barreira, térmicas e mecânicas (Tang, Yang, Zhang, & Zhang, 2014). A presença de celulose de tipo II pode ser observada por picos característicos a $2\theta = 12,0$ (110), $20,0$ (210) e $22,0$ (200) (Borysiak & Garbarczyk, 2003; Soyekwo et al., 2016) e celulose I, pela presença de picos a $2\theta = 14,5$ (101), $17,5$ (110), 22 (200) e $34,6$ (004) (Peng et al., 2013; Shahabi-Ghahafarrokhi, Khodaiyan, Mousavi, & Yousefi, 2015). Os difratograma podem ser observados na Figura 17.

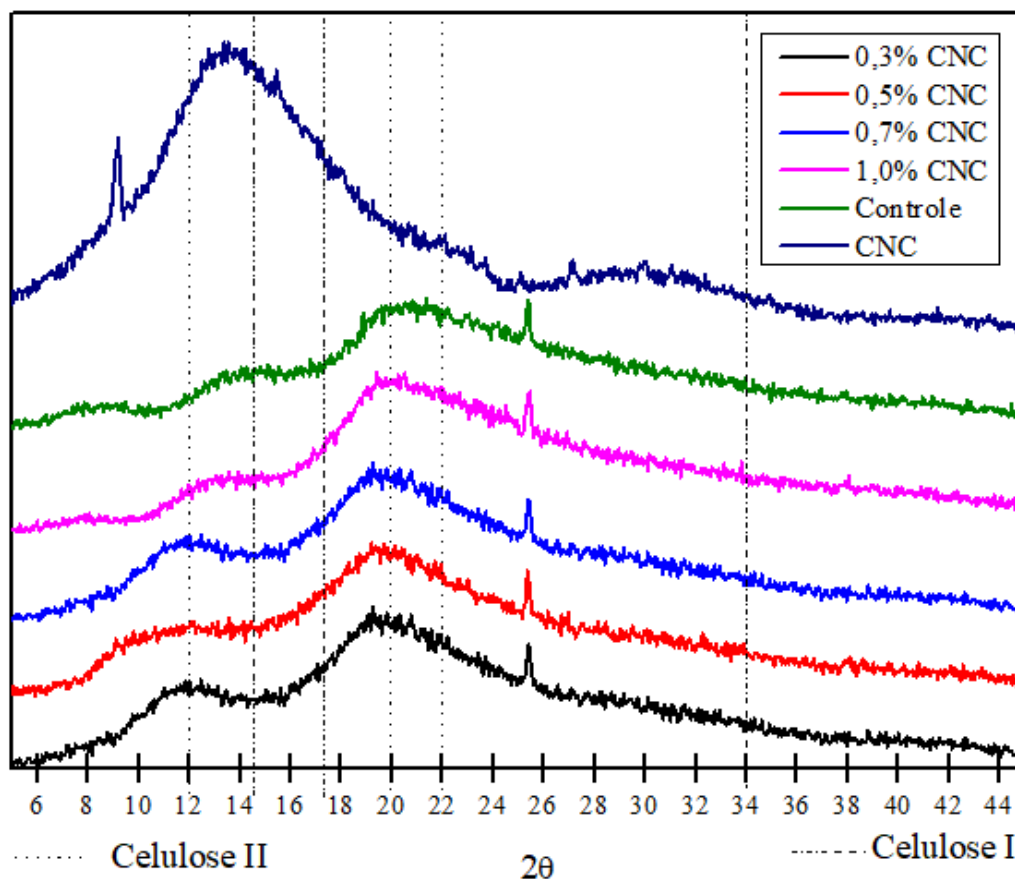


Figura 17. Difração de raios-x dos nanocompósitos e dos CNC liofilizados.

Embora a celulose exista como vários polimorfismos como I-IV, a celulose I é a celulose cristalina que é produzida a partir da fonte natural. É metaestável e pode ser termodinamicamente convertido em celulose II ou III (O'sullivan, 1997). A estrutura mais estável de celulose é a celulose II, que pode ser obtida por solubilização e recristalização. Ao aumentar a concentração alcalina na mercerização, as ligações intermoleculares são progressivamente enfraquecidas pelo inchaço e penetração de hidratos de sódio dentro da matriz de fibras de celulose. Isso acarreta no realinhamento e à recristalização completa de fibras de celulose para quebrar as ligações de cadeia intermoleculares já existentes para produzir novas estruturas de rede cristalina, devido ao rearranjo resultante do inchaço e decristalização de ligações intra e intermoleculares das estruturas de celulose (Soyekwo et al., 2016).

A celulose do tipo II está associada à re-precipitação da celulose I após hidrólise com solução de ácido sulfúrico a 64%, que pode ser um solvente para a celulose II e é mais suscetível à hidrólise do que a celulose nativa. A principal distinção entre essas duas formas de celulose reside na disposição de seus átomos, a celulose II possui uma configuração estrutural

antiparalénea, enquanto que as correntes em celulose correm em uma direção paralela (Naduparambath et al., 2018).

O grau de cristalinidade foi dado pelo software do próprio equipamento, e através dos valores pôde-se concluir que o valor da cristalinidade aumentou conforme aumentava-se o teor de CNC adicionado à formulação.

O índice de cristalinidade dos filmes de proteína isolada de soja, para o controle foi 24,9%, após as formulações com a inserção dos CNC, os índices se elevaram, atingindo o máximo de 67,7% para a amostra contendo 1% de CNC. Observa-se que a aplicação de nanocristais na matriz influencia a cristalinidade do filme. A cristalinidade do CNC liofilizado foi de 62,2%, considera-se a interação dos nanocristais com a matriz um fator determinante da cristalinidade dos filmes, indicando que a adição de nanocristais está estimulando a interação de cristais na fase de proteína.

Pinheiro (2016) em seu estudo com formulação de nanocompósitos de PBAT e reforço com nanocristais de celulose, concluiu que adição de cargas, nas condições utilizadas, proporcionou redução da cristalinidade da matriz polimérica (Pinheiro, 2016) . Caso oposto aos biofilmes produzidos neste experimento.

5.6 Permeabilidade ao Vapor D'água, Solubilidade em Água e Espessura – Filmes

Os valores de PVA, solubilidade em água e espessura dos filmes elaborados neste estudo estão apresentados na Tabela 3. A PVA é de fundamental relevância para aplicação dos filmes elaborados como potenciais embalagens para alimentos, considerando-se que por meio dela, é possível realizar a escolha de qual tipo de alimento pode ser acondicionado nestas. Um material muito permeável ao vapor de água poderá ser indicado para embalagens de vegetais frescos, enquanto que um filme pouco permeável poderá ser indicado para produtos desidratados (Souza, Sobral, Menegalli, & Menegalli, 2012).

Os resultados para PVA para este estudo variaram de 12,44 para 7,6 g mm/m² dkPa, apresentando uma redução de 38,90%. A amostra controle foi a que apresentou maior valor de permeação, obtendo valores de 12,44 mm/m² d kPa, já a amostra que apresentou menor permeabilidade foi a amostra que continha 1,0% de CNC em sua formulação. Conforme aumentou-se a concentração de CNC na matriz polimérica, reduziu-se a permeabilidade dos filmes, como pode-se observar na Tabela 5.

Tabela 4. Solubilidade em H₂O, PVA e espessura dos filmes e nanocompósitos de SPI plastificados com 40% de glicerol

Amostra	Permeabilidade ao vapor d'água (g mm/m² dkPa)	Espessura (mm)
Controle	12,44 ^a	0,155
CNC 0,3%	10,62 ^{ab}	0,148
CNC 0,5%	09,87 ^{ab}	0,133
CNC 0,7%	07,49 ^b	0,142
CNC 1,0%	07,60 ^b	0,172

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Esses dados realçam a afirmativa de que os CNC são eficientes na diminuição da permeabilidade em filmes, nesse caso, filmes de SPI, por formarem uma barreira física que dificulta a passagem da umidade através da matriz, diminuindo o contato da água com o alimento. A PVA de um filme depende dos valores do coeficiente de difusão da água através do material e do coeficiente de solubilidade da água no filme. O coeficiente de difusão está relacionado com a mobilidade molecular através da matriz polimérica e depende do tamanho e da estrutura da molécula, enquanto que o coeficiente de solubilidade diz respeito ao comportamento da molécula permeante com relação à superfície da matriz polimérica (OLIVEIRA, SILVA, & SOARES, 2016).

Fatores como a concentração de glicerol e o pH influenciam na PVA dos filmes biodegradáveis. Filmes advindos de fontes renováveis possuem alta permeabilidade. Segundo Cuq *et al.* (1997), com a adição de glicerol, a rede polimérica torna-se menos densa e, conseqüentemente, mais permeável (Bernard Cuq, Nathalie Gontard, Jean-Louis Cuq, & Guilbert†, 1997).

Para elaboração dos filmes de SPI plastificados com 40% de glicerol, o pH que demonstrou maior homogeneidade à solução filmogênica foi o de pH 10. Apesar de os valores de PVA terem se apresentado relativamente altos, dado esse explicado pela alta concentração de glicerol, esses valores poderiam ser muito maiores, de acordo com BeMiller & Whistler (1996), que estudaram o efeito do pH na PVA de filmes biodegradáveis e concluíram que em pH ácido pode ocorrer hidrólise das ligações glicosídicas/peptídicas resultando em fragmentos menores, o que poderia criar espaços vazios na rede do filme, causando o aumento na PVA (Bemiller, 2009; Dongowski, 1997). Estudo também realizado por Soares (2012), que

comprovou em seu estudo que a variação de pH reduz significativamente a permeabilidade ao vapor de água de filmes (SOARES, 2012).

Logo, com a adição de baixas concentrações de nanocristais de celulose à matriz polimérica, os valores de PVA foram reduzidos, tornando o uso das nanocargas em concentrações mínimas viáveis na diminuição da PVA. Silva (2016), em estudo em que adicionou CNC em filmes de pectina concluiu que nanocristais de celulose em alta concentração (10%) não funcionaram como uma barreira para impedir a passagem de gases e atribuiu isto ao processo de homogeneização, que talvez não tenha sido eficiente em relação ao tempo de ultrassonificação, fazendo com que não houvesse boa dispersão dos nanocristais na matriz polimérica (D. L. Silva, 2016).

A solubilidade em água não foi afetada pela adição dos CNC na matriz polimérica. Os valores não foram alterados para nenhuma amostra, todas apresentaram valores de 28%, valores que corroboram com os resultados encontrados por Ferreira (2014) em estudos feitos com filmes a partir de proteína de pescado e argilas incorporados com óleos essenciais, onde a solubilidade obtida variou de 22,32% a 33,54% (Ferreira, 2014).

A solubilidade do filme é consequência da perda da integridade estrutural dos filmes, bem como da hidrofobicidade do plastificante, e do grau de desnaturação da proteína. A solubilidade dos filmes produzidos neste trabalho, de modo geral, apresentou valores baixos (entre 26 e 28%), comparados a outros filmes, como filmes produzidos por Costa *et al.*, (2017), que avaliaram o efeito da concentração de agente reticulante em filmes à base de proteína de torta de mamona em sua solubilidade em H₂O, obtendo valores que variaram entre 40 e 80%, resultados estes muito superiores aos valores encontrados no presente estudo, indicando que a SPI possui menor solubilidade mesmo sem a adição de CNC, fato este que nos permite sugerir que a matriz protéica do filme não foi totalmente desestabilizada, ou seja, as interações moleculares intra e intercadeias permaneceram praticamente intactas, e, que, somente monômeros, pequenos peptídeos, substâncias não proteicas e pequena quantidade de plastificante foram solubilizadas (Costa, Aparecida-Makishi, Bittante, & Sobral, 2017).

Do ponto de vista prático, a baixa solubilidade dos filmes, a base de proteínas de SPI permite visualizar um grande potencial de aplicação em alimentos com alto teor de umidade, inclusive, como embalagem ativa (Moraes *et al.*, 2011).

Proteínas com alta massa molecular são geralmente insolúveis ou pouco solúveis em água. Essas moléculas são interessantes, uma vez que podem formar filmes resistentes à água.

Além disso, a solubilidade das proteínas depende muito do número e do arranjo de cargas na molécula, que dependerá da composição de aminoácidos (Sgarbieri, 1996).

Uma ampla faixa de valores de espessura para filmes biodegradáveis tem sido reportada na literatura e, de acordo com García *et al.* (2009), a espessura do filme é dependente da sua composição e dos parâmetros de processamento do filme (García, Pinotti, Martino, & Zaritzky, 2009). A concentração de SPI na formulação dos filmes foi de 6% (m/v), relativamente alto, porém, dentro dos padrões encontrados na literatura para filmes proteicos. A espessura dos filmes contendo 6% de SPI variou entre 150 à 171mm. A alta concentração de proteínas induz ao aumento de sólidos na matriz polimérica formada após a secagem da solução filmogênica e, portanto, aumenta a espessura dos filmes biodegradáveis.

5.7 Ensaio Mecânico de Resistência À Tração

O ensaio mecânico de resistência à tração foi utilizado para analisar as modificações nos filmes de proteína isolada de soja com nanocristais de celulose obtidos da vagem de soja, por meio das medidas das propriedades tensão máxima, tensão na ruptura, deformação específica e módulo de elasticidade (módulo de Young). As principais propriedades mecânicas que um filme pode apresentar são a resistência a tração, ou seja, a tensão máxima desenvolvida pelo filme durante um teste. Alta resistência à tensão é necessária para manter a integridade dos filmes, incluindo suas propriedades de barreira (Fakhouri, 2002).

As interações carga/matriz e carga/carga são fundamentais para alcançar a melhoria das propriedades mecânicas. Faz-se necessário um balanceamento entre a distribuição das nanopartículas na matriz, a fim de evitar a formação de aglomerados e suficiente para manter a rede de percolação necessária para a distribuição das tensões no material (Leite, 2015).

A melhoria nas propriedades mecânicas de filmes biodegradáveis pode ser alcançada pela incorporação de nanopartículas em uma matriz polimérica (Guo, Pereira, Choi, Wang, & Hahn, 2006; Shi, Shi, Barnes, Horstemeyer, & Wang, 2011). Assim, foi incorporado diferentes concentrações de CNC extraídos da vagem de soja nos filmes de SPI, para análise de suas propriedades mecânicas (tensão máxima MPa, tensão na ruptura MPa, deformação específica % e módulo de elasticidade MPa).

O valor médio, o desvio-padrão e a comparação múltipla entre as médias das propriedades mecânicas estão apresentados na Tabela 6.

Os resultados da adição dos nanocristais no filme proteína isolada de soja mostraram que as tensões máximas e na ruptura do biopolímero foram reduzidas apenas para a formulação 0,3%CNC e 1,0%CNC de nanocristais com diferenças significativas. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, a adição de 0,5% e 0,7% de CNC não alterou significativamente as tensões máxima e na ruptura dos filmes.

Tabela 5. Propriedades mecânicas dos filmes de proteína isolada de soja com nanocristais de vagem de soja.

Soja_Nanocristais	Tensão máxima (MPa)	Tensão na ruptura (MPa)	Deformação específica (%)	Módulo de elasticidade (MPa)
Controle	14,66 ^a ± 0,76	12,40 ^a ± 0,89	87,72 ^a ± 16,69	557 ^a ± 42
0,3%CNC	8,96 ^b ± 0,69	8,20 ^b ± 0,45	185,16 ^c ± 15,87 ^c	294 ^c ± 23
0,5%CNC	13,52 ^a ± 0,63	11,80 ^a ± 0,45	148,02 ^b ± 6,49	484 ^b ± 26
0,7%CNC	14,33 ^a ± 1,15	12,33 ^a ± 0,58	161,63 ^{b,c} ± 5,74	602 ^a ± 71
1,0%CNC	11,37 ^c ± 0,54	10,25 ^c ± 0,50	97,70 ^a ± 8,15	417 ^b ± 25

†Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ($p < 0,05$).

Na análise dos resultados obtidos, a adição dos nanocristais não contribuiu significativamente para aumentar a rigidez (módulo de elasticidade) na matriz dos filmes de proteína de soja. O módulo de elasticidade não foi reduzido apenas na formulação 0,7%CNC.

Como pode ser observado na Tabela 6, os valores da deformação específica dos filmes com SPI foram elevados com a adição dos nanocristais até 0,7%; apresentando diferenças significativas (Tabela 4). A maior diferença observada na deformação dos filmes foi o aumento de aproximadamente 210% com a formulação 0,3%CNC. Os valores para o módulo de elasticidade (módulo de Young) das amostras variaram entre 294MPa para a amostra 0,3%CNC para 602MPa para a amostra contendo 0,7% de CNC, mostrando diferença significativa em relação às demais amostras contendo CNC. Porém, quando comparado à amostra Controle, pode-se perceber que não houve diferença significativa entre essas duas amostras.

O fato de a amostra Controle não se diferenciar estatisticamente da amostra contendo 0,7% de CNC pode estar relacionada a alguma falha na dispersão dos CNC pela matriz polimérica, causando alteração na estrutura intermolecular dos filmes com CNC, fazendo-se necessária um estudo que vise controlar a dispersão pela matriz polimérica, de forma uniforme, sem comprometer as propriedades de barreira por eles alcançadas. Uma alternativa à melhoria dessas propriedades pode estar relacionada à modificação da superfície dos nanocristais de celulose. Quando a superfície dos CNC é modificada quimicamente, o módulo de elasticidade

tende a aumentar, como resultado da melhor interação da carga com a matriz devido à compatibilização entre elas.

5.8 Transmitância

Os valores de transmitância trazem informações sobre as propriedades de barreira à luz dos filmes de SPI. Através desta propriedade é possível analisar a quantidade de luz que atravessa o filme em um determinado comprimento de onda e entra em contato com o alimento embalado, e, devido a isso, é um parâmetro importante para avaliar a aplicabilidade dos filmes como embalagem para alimentos. Através desta análise, pode-se avaliar a oxidação lipídica de alimentos, além da degradação de antocianinas e flavonoides, por exemplo, assim como a perda de vitaminas através da incidência de luz. (Leceta *et al.* 2013; Ramos *et al.* 2013).

A transmissão refere-se ao processo em que o fluxo de energia incidente ultrapassa a superfície, normalmente do lado oposto ao lado incidente. Este é o processo que interessa estudar nos filmes obtidos. Quanto maior a transmissão, maior é a transparência da amostra ao comprimento de onda testado.

A incorporação dos CNC nas matrizes não alterou sua coloração, permanecendo com um tom amarelado-transparente em todas as formulações. Porém, apesar de não afetar na cor, pôde-se perceber uma pequena alteração em seus valores de transmitância em função da incorporação dos CNC. Essa pequena alteração. A Figura 18 mostra os valores para transmitância numa faixa de 250 a 800 nm. A fotodegradação se dá em alimentos nos comprimentos de onda de 400 a 550 cm^{-1} (Ramos, 2013). Através do gráfico percebe-se o decréscimo na transmitância (%) dos filmes, iniciando em aproximadamente 30% para a amostra 0,7%CNC e chegando a zero para todas as mostras em aproximadamente 350nm.

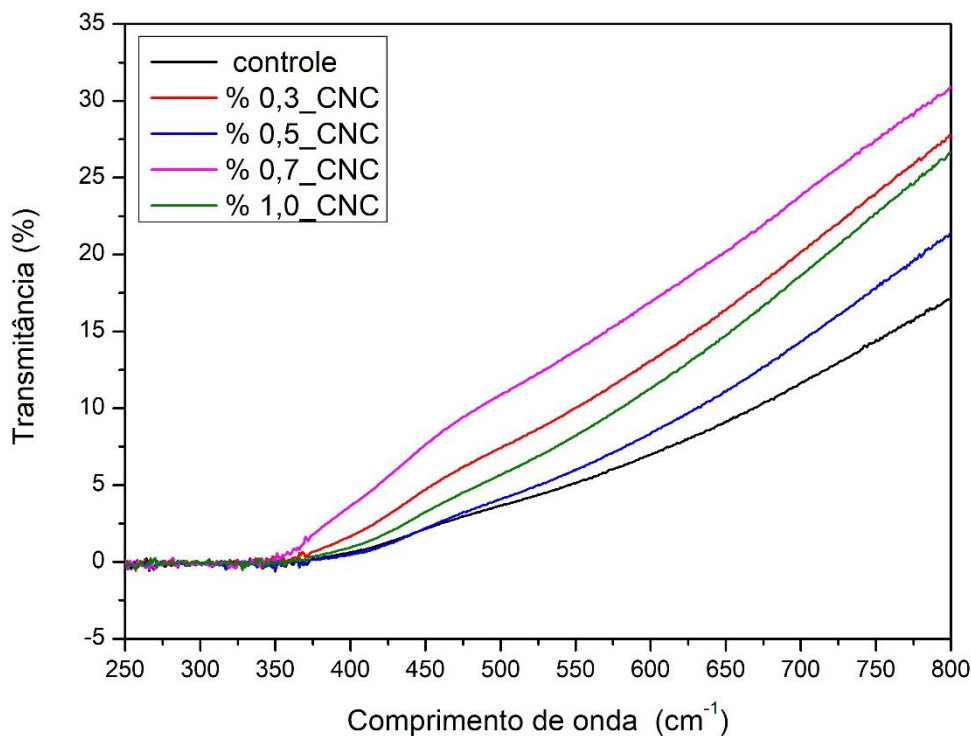


Figura 18 Transmitância das amostras de filmes de SPI contendo CNC em sua estrutura.

Através dos valores obtidos pode-se perceber que a incorporação dos CNC causou alteração da transmitância dos filmes e nos compósitos obtidos. Porém, não houve um padrão no decréscimo ou acréscimo da transmitância em função da concentração de CNC. Na tabela a seguir, pode-se observar que o maior valor para transmitância foi o da amostra 0,7% CNC, obtendo valores de 30,89%, enquanto o menor valor foi o da amostra controle, obtendo valor de 17,15%. Essa distribuição dos valores pode estar relacionada à falhas na dispersão dos CNC na matriz polimérica.

Tabela 6 Valores de transmitância (%) dos filmes de SPI contendo diferentes concentrações de CNC

Amostra	Transmitância %
Controle	17,15
0,3%CNC	27,61
0,5%CNC	21,36
0,7%CNC	30,89
1,0%CNC	26,65

A incorporação dos CNC nas matrizes de SPI mostrou-se ineficiente quando se trata da redução da transmitância desses nanocompósitos, de acordo com os valores observados na tabela 7. Os CNC devem estar dispersos de forma uniforme pela matriz para garantir que o filme tenha as mesmas propriedades, fato este que garante homogeneidade e boa distribuição das cargas na macromolécula, potencializando suas propriedades. Os filmes SPI se mostraram eficientes como barreira à luz, podendo retardar a deterioração de nutrientes essenciais para garantir a qualidade do alimento e, apesar de a incorporação dos CNC não ter se mostrado eficiente para as amostras em que foram incorporados os CNC, o resultado obtido não descarta a possibilidade de utilização dos filmes de SPI como embalagem para alimentos, pois devido à sua coloração, a transmitância máxima foi aproximadamente 30%.

6. CONCLUSÃO

Considera-se que as etapas de mercerização e branqueamento são muito importantes para o processo de extração de nanocristais de celulose, pois estes processos visam eliminar alguns constituintes indesejáveis na fibra no momento da hidrólise.

Foi possível obter CNC utilizando-se hidrólise ácida. Os CNC extraídos, foram caracterizados por DLS, no qual confirmou-se a obtenção de partículas nanométrica, em que a grande maioria apresentou tamanho de aproximadamente 75 nm, indicando que o processo de extração foi eficiente e garantiu homogeneidade das amostras. Conforme o potencial zeta medido, observa-se que as soluções apresentaram cargas superficiais estáveis inferiores a -30mW.

Os CNC extraídos apresentaram, na sua maioria, tamanho de aproximadamente 75 nm, e as soluções contendo CNC apresentaram cargas superficiais estáveis, inferiores a -30mW.

Foi possível obter filmes a base de proteína isolada de soja e CNC. A secagem em estufa apresentou filmes mais homogêneos do que os secos a temperatura ambiente.

Os filmes apresentaram aspectos como homogeneidade, ausência de bolhas e sem defeitos aparentes. A adição dos CNC influenciou no aumento da cristalinidade, resultado importante pois estes atuam na formação de uma barreira que pode ter auxiliado na diminuição da permeabilidade ao vapor d'água.

A PVA para a amostra de SPI+1%CNC obteve uma redução de 38% em relação a amostra controle, resultado satisfatório, pois a função da embalagem é garantir a proteção e integridade do alimento embalado, controlando a entrada e saída de gases e vapores.

Em relação as propriedades mecânicas dos filmes, a adição de CNC teve efeito em duas concentrações, indicando a necessidade de otimização na síntese dos filmes, para promover melhor dispersão das partículas na matriz polimérica, ou até mesmo a modificação química dos CNC a fim de melhorar suas propriedades mecânicas.

Os filmes SPI se mostraram eficientes como barreira à luz, podendo retardar a deterioração de nutrientes essenciais para garantir a qualidade do alimento e, apesar de a incorporação dos CNC não ter se mostrado eficiente para as amostras em que foram incorporados os CNC, o resultado obtido não descarta a possibilidade de utilização dos filmes de SPI como embalagem para alimentos, pois devido à sua coloração, a transmitância máxima foi aproximadamente 30%.

7. REFERÊNCIAS

- ASTM D882. (2012). ASTM D882 - 12 Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting.
- ASTM E96. (1980). Water Vapor Transmission ASTM E96.
- Bemiller, J. N. (2009). One Hundred Years of Commercial Food Carbohydrates in the United States. *J. Agric. Food Chem*, 57, 8125–8129. <https://doi.org/10.1021/jf8039236>
- Bernard Cuq, *,†, Nathalie Gontard, ‡, Jean-Louis Cuq, § and, & Guilbert†, S. (1997). Selected Functional Properties of Fish Myofibrillar Protein-Based Films As Affected by Hydrophilic Plasticizers. <https://doi.org/10.1021/JF960352I>
- Borysiak, S., & Garbarczyk, J. (2003). Applying the WAXS method to estimate the supermolecular structure of cellulose fibres after mercerisation. *FIBRES & TEXTILES in Eastern Europe*, 11(544).
- Cho, S. Y., Park, J.-W., Batt, H. P., & Thomas, R. L. (2007). Edible films made from membrane processed soy protein concentrates. *LWT - Food Science and Technology*, 40(3), 418–423. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2006.02.003>
- Costa, P. A. ; Aparecida-Makishi, G. L. ; Bittante, A. M. Q. B. ; & Sobral, P. J. A. (2017). AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO RETICULANTE EM FILMES BIODEGRADÁVEIS À BASE DE PROTEÍNAS DE TORTA DE MAMONA. In *Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP*.
- Cuq, B., Gontard, N., & Guilbert, S. (1998). Proteins as Agricultural Polymers for Packaging Production. *Cereal Chemistry Journal*, 75(1), 1–9. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1998.75.1.1>
- Cuq, B.; Gontard, N.; Guilbert, S. Edible films and coatings as active layers. In *Active Food Packaging*, M. Rooney (Ed.), 1995.
- Denavi, G., Tapia-Blácido, D. R., Añón, M. C., Sobral, P. J. A., Mauri, A. N., & Menegalli, F. C. (2009). Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. *Journal of Food Engineering*, 90(3), 341–349. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2008.07.001>
- Dongowski, G. (1997). R. L. Whistler and J. N. BeMiller: Carbohydrate Chemistry for Food Scientists. 241 pages, numerous figures and tables. Eagan Press, St. Paul, MN, USA, 1997. Price: 114.00 US\$. *Food / Nahrung*, 41(5), 318–318. <https://doi.org/10.1002/food.19970410523>

- Dufresne, A., & Belgacem, M. N. (2010). Cellulose-reinforced composites: From micro-to nanoscale. *Polímeros Ciência E Tecnologia*, 20(1), 1–10.
<https://doi.org/10.4322/polimeros.2010.01.001>
- Elazzouzi-Hafraoui, S., Nishiyama, Y., Putaux, J.-L., Heux, L., Dubreuil, F., & Rochas, C. (2008). The Shape and Size Distribution of Crystalline Nanoparticles Prepared by Acid Hydrolysis of Native Cellulose. *Biomacromolecules*, 9(1), 57–65.
<https://doi.org/10.1021/bm700769p>
- EMBRAPA. (2018). Dados econômicos - Portal Embrapa.
- Fakhouri, F. M. (2002). *Coberturas comestíveis aplicadas na preservação de goiabas in natura (Psidium guajava L.)*. [s.n.].
- Faradilla, R. H. F., Lee, G., Rawal, A., Hutomo, T., Stenzel, M. H., & Arcot, J. (2016). Nanocellulose characteristics from the inner and outer layer of banana pseudo-stem prepared by TEMPO-mediated oxidation. *Cellulose*, 23(5), 3023–3037.
<https://doi.org/10.1007/s10570-016-1025-8>
- Ferreira, F. de A. (2014). *Filmes nanocompósitos antimicrobianos obtidos a partir de proteínas de pescado e nanoargila incorporados com óleos essenciais*. FURG.
- Flauzino Neto, W. P., Silvério, H. A., Dantas, N. O., & Pasquini, D. (2013). Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue – Soy hulls. *Industrial Crops and Products*, 42, 480–488.
<https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2012.06.041>
- FONSECA, A. de S. ., RAABE, J. ., DIAS, L. M. S. ., BALIZA, A. E. R. ., TONOLI, G. H. D. ., VASCONCELOS, R. ., & MARCONCINI, J. M. (2013). Avaliação preliminar do potencial de fibras amazônicas para extração de nanocristais de celulose. - Portal Embrapa. In Embrapa Instrumentação (Ed.), *Anais do VI Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio*.
- Francisco, de A. S. e S., & Carlos, A. V. de A. (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *African Journal of Agricultural Research*, 11(39), 3733–3740. <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11522>
- García, M. A., Pinotti, A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2009). Characterization of Starch and Composite Edible Films and Coatings. In *Edible Films and Coatings for Food Applications* (pp. 169–209). New York, NY: Springer New York.
https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_6
- GONTARD, N., DUCHEZ, C., CUQ, J.-L., & GUILBERT, S. (2007). Edible composite films

- of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science & Technology*, 29(1), 39–50.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb02045.x>
- Guo, Z., Pereira, T., Choi, O., Wang, Y., & Hahn, H. T. (2006). Surface functionalized alumina nanoparticle filled polymeric nanocomposites with enhanced mechanical properties. *Journal of Materials Chemistry*, 16(27), 2800.
<https://doi.org/10.1039/b603020c>
- Hon, D. N.-S., & Shiraishi, N. (2001). *Wood and cellulosic chemistry*. Marcel Dekker.
- Hopkins, E. J., Chang, C., Lam, R. S. H., & Nickerson, M. T. (2015). Effects of flaxseed oil concentration on the performance of a soy protein isolate-based emulsion-type film. *Food Research International*, 67, 418–425.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.11.040>
- Hubbe, M. A., Rojas, O. J., Lucia, L. A., & Sain, M. (2008). CELLULOSIC NANOCOMPOSITES: A REVIEW. *BioResources*, 3(3), 929–980.
<https://doi.org/10.15376/biores.3.3.929-980>
- Jiménez, E. N. Propriedades mecânicas e de barreira, solubilidade e microestrutura de filmes de farinha de amaranto modificada com epícloridrina ou misturada com poli (vinil álcool). 2007. 157f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- Kalia, S., Dufresne, A., Cherian, B. M., Kaith, B. S., Avérous, L., Njuguna, J., & Nassiopoulos, E. (2011). Cellulose-Based Bio- and Nanocomposites: A Review. *International Journal of Polymer Science*, 2011, 1–35.
<https://doi.org/10.1155/2011/837875>
- Khouri, S. (2010). Experimental Characterization and Theoretical Calculations of Responsive Polymeric Systems.
- Koschevic, M. T., dos Santos, M., de Faria, R. C., Fakhouri, F. M., & Martelli, S. M. (2018). Cellulose Nanocrystals Functionalization by Grafting. In *Biopolymer Grafting: Synthesis and Properties* (pp. 409–439). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48104-5.00009-3>
- Leite, L. S. F. (2015). *Preparação e caracterização de compósitos de acetato de celulose e nanocristais de celulose*. Universidade Estadual de Campinas.
- Maciel, A. P., Longo, E., & Leite, E. R. (2003). DIÓXIDO DE ESTANHO NANOESTRUTURADO: SÍNTESE E CRESCIMENTO DE NANOCRISTAIS E

- NANOFITAS. *Quim. Nova*, 26(6), 855–862.
- Mohaiyiddin, M. S., Lin, O. H., Owi, W. T., Chan, C. H., Chia, C. H., Zakaria, S., ... Akil, H. M. (2016). Characterization of nanocellulose recovery from *Elaeis guineensis* frond for sustainable development. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 18(8), 2503–2512. <https://doi.org/10.1007/s10098-016-1191-2>
- Moraes, A. R. F. e, Vidigal, M. C. T. R., Soares, N. de F. F., Moraes, L. P. de, Melo, N. R. de, & Gonçalves, M. P. J. (2011). Desenvolvimento e avaliação de filme antimicrobiano aromatizado para aplicação em massa de pastel. *Ciência Rural*, 41(3), 537–543. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011000300029>
- Naduparambath, S., T.V., J., V., S., M.P., S., Balan, A. K., & E., P. (2018). Isolation and characterisation of cellulose nanocrystals from sago seed shells. *Carbohydrate Polymers*, 180, 13–20. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.09.088>
- O’SULLIVAN, A. C. (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4(3), 173–207. <https://doi.org/10.1023/A:1018431705579>
- Okubo, K., Fujii, T., & Yamashita, N. (2005). Improvement of Interfacial Adhesion in Bamboo Polymer Composite Enhanced with Micro-Fibrillated Cellulose *.
- OLIVEIRA, T. M. de;, SILVA, E. E. A. do N., & SOARES, D. S. B. (2016). PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA EM FILMES BIODEGRADÁVEIS PRODUZIDOS A PARTIR DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE. In *V Congresso Estadual de Iniciação Científica e Tecnológica do IF Goiano*.
- Pandey, J. K., Lee, C. S., & Ahn, S.-H. (2010). Preparation and properties of bio-nanoreinforced composites from biodegradable polymer matrix and cellulose whiskers. *Journal of Applied Polymer Science*, 115(4), 2493–2501. <https://doi.org/10.1002/app.31205>
- PARK, H. J.; CHINNAN, M. Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. *Journal of Food Engineering*. Oxford, v. 25, n. 4, p. 497-507, 1995.
- Peng, Y., Gardner, D. J., Han, Y., Kiziltas, A., Cai, Z., & Tshabalala, M. A. (2013). Influence of drying method on the material properties of nanocellulose I: thermostability and crystallinity. *Cellulose*, 2013; 14 P. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0019-z>
- Pinheiro, I. F. (2016). *Preparação e caracterização de biocompósitos híbridos baseados em nanocristais de celulose de fibras de munguba*. [s.n.].
- Queiroz, A. U. B., & Collares-Queiroz, F. P. (2009). Innovation and Industrial Trends in

- Bioplastics. *Polymer Reviews*, 49(2), 65–78.
<https://doi.org/10.1080/15583720902834759>
- Rhim, J. W., Gennadios, A., Weller, C. L., & Hanna, M. A. (2002). Sodium dodecyl sulfate treatment improves properties of cast films from soy protein isolate. *Industrial Crops and Products*, 15(3), 199–205. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(01\)00114-5](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(01)00114-5)
- Sakanaka, L. S. (2007). *Confecção de filmes biodegradáveis por extrusão de blendas de amido termoplástico e polibutileno succinato co-adipato (PBSA)*. Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- Sanjay, M. R., Madhu, P., Jawaid, M., Sentharamaikkannan, P., Senthil, S., & Pradeep, S. (2018). Characterization and properties of natural fiber polymer composites: A comprehensive review. *Journal of Cleaner Production*, 172, 566–581.
<https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2017.10.101>
- Sgarbieri, V. C. (1996). *Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações*. Acervo Centro de Vigilância Sanitária .
- Shahabi-Ghahafarrokh, I., Khodaiyan, F., Mousavi, M., & Yousefi, H. (2015). Preparation and characterization of nanocellulose from beer industrial residues using acid hydrolysis/ultrasound. *Fibers and Polymers*, 16(3), 529–536.
<https://doi.org/10.1007/s12221-015-0529-4>
- Shi, J., Shi, S. Q., Barnes, H. M., Horstemeyer, M. F., & Wang, G. (2011). Kenaf Bast Fibers—Part II: Inorganic Nanoparticle Impregnation for Polymer Composites. *International Journal of Polymer Science*, 2011, 1–7.
<https://doi.org/10.1155/2011/736474>
- Silva, D. J., & Queiroz, A. C. de. (2006). *Análise de alimentos : métodos químicos e biológicos*. UFV.
- Silva, D. L. (2016, November). *Influência da adição de nanocristais e nanofibrilas de celulose extraídas de bagaço de cana-de-açúcar nas propriedades de embalagens biodegradáveis ativas à base de pectina*. Universidade Federal de Viçosa.
- Silvério, H. A. (2013, February). *Extração e caracterização de nanocristais de celulose a partir de sabugo de milho, e sua aplicação como agente de reforço em nanocompósitos poliméricos utilizando poli (álcool vinílico) como matriz*. Universidade Federal de Uberlândia.
- Smyth, M., García, A., Rader, C., Foster, E. J., & Bras, J. (2017). Extraction and process analysis of high aspect ratio cellulose nanocrystals from corn (*Zea mays*) agricultural

- residue. *Industrial Crops and Products*, 108, 257–266.
<https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2017.06.006>
- SOARES, D. S. B. (2012, February). *Influência do pH e da irradiação em filmes biodegradáveis de proteínas do soro de leite*. Universidade Federal de Goiás.
- Souza, S. M. A. de, Sobral, P. J. do A., Menegalli, F. C., & Menegalli, F. C. (2012). Propriedades físicas de filmes comestíveis a base de proteínas miofibrilares de carne bovina. *Semina: Ciências Agrárias*, 33(1), 283–296. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n1p283>
- Soyekwo, F., Zhang, Q. G., Lin, X. C., Wu, X. M., Zhu, A. M., & Liu, Q. L. (2016). Facile preparation and separation performances of cellulose nanofibrous membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(24), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/app.43544>
- Swain, S. N., Biswal, S. M., Nanda, P. K., & Nayak, P. L. (2004). Biodegradable Soy-Based Plastics: Opportunities and Challenges. *Journal of Polymers and the Environment*, 12(1), 35–42. <https://doi.org/10.1023/B:JOOE.00000003126.14448.04>
- Tang, Y., Yang, S., Zhang, N., & Zhang, J. (2014). Preparation and characterization of nanocrystalline cellulose via low-intensity ultrasonic-assisted sulfuric acid hydrolysis. *Cellulose*, 21(1), 335–346. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0158-2>
- Yang, H., Lin, Y., Wang, F., & Luo, H. (2008). Chemical Synthesis of K_{0.5}Na_{0.5}NbO₃ Ceramics and Their Electrical Properties. *Materials and Manufacturing Processes*, 23(5), 489–493. <https://doi.org/10.1080/10426910802104070>
- WANG, L. Z. et al. Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 42, n. 9, p. 1128-1138, 2007.
- WANG, Y. et al. Transglutaminase-induced crosslinking of gelatin– calcium carbonate composite films. *Food Chemistry*, v. 166, n. 0, p. 414-422, 2015.