

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“MICROESTRUTURAS DE ZEÍNA PRODUZIDAS PELA
TÉCNICA DE FIAÇÃO POR SOPRO EM SOLUÇÃO
VISANDO À INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO LENTA DE
VITAMINA C”**

Vanessa Priscila Scagion*

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de DOUTORA EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA.

Orientador: Daniel Souza Correa

*** Bolsista CAPES**

São Carlos - SP

2019

FOLHA DE APROVAÇÃO



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Vanessa Priscila Scagion, realizada em 31/05/2019:

Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa
EMBRAPA

Prof. Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
EMBRAPA

Prof. Dr. Caio Marcio Paranhos da Silva
UFSCar

Profa. Dra. Débora Terezia Balogh
IFSC/USP

Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira
UFLA

**Dedico esta tese aos meus pais, minha família e amigos,
por todo apoio, compreensão, ensinamentos e amor.**

“Sei que está difícil, mas era o que você queria. Lutou por isso, mas se quiser voltar pra casa, será bem vinda. Mas se desistir nesse primeiro obstáculo que encontrou você não enfrentará mais nenhum, pois sempre terá medo e ficará onde está.”

(Luiz Carlos Scagion - pai)

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado tudo que é necessário para seguir em frente, por ter colocado no meu caminho anjos de todas as formas que me apoiaram e me fizeram perceber que vale a pena sonhar, sorrir e até mesmo chorar, para que assim abraços carinhosos pudessem ser sentidos mais intensamente.

À meus pais, Neusa e Luiz, por terem me ensinado acreditar em Deus e em mim mesma, pela honestidade e sinceridade em suas palavras e atos, mesmo que estes causassem-me dor, inicialmente. Pelos seus abraços e beijos quando essa trajetória parecia pesada demais. Por terem estado ao meu lado em tudo, mesmo que minhas decisões me fizessem estar cada vez mais ausente fisicamente. Por cada noite mal dormida me esperando chegar a casa, mesmo estando em outra cidade. Pelas visitas inesperadas que me deram a força que eu precisava. Por cada gota de suor que desprenderam pra me ajudar a continuar um sonho meu, que aos poucos se tornou nosso. Estou aprendendo a andar sozinha, mas tenho medo de seguir, mesmo sabendo que tenho o seu amor e colo pra voltar e suas palavras pra me fortalecerem. Enfim, obrigada pela vida que me conceberam e pelos eternos e sábios ensinamentos.

À minha família (Viviane, Vandernilson e Ivan) por me acompanharem nessa longa jornada. Por compreenderem meu sonho, mesmo não fazendo sentido pra eles, em alguns momentos. Por estarem presentes nos momentos que mais precisei e por não negar esforços pra me levantar quando cai. Por me ajudarem cada um do seu jeito, com broncas, abraços, olhares carinhosos, conversas e risadas. Obrigada por não me culparem por não estar ai quando vocês precisaram. Vocês me fizeram perceber que a vida é rápida demais e que podemos deixá-la a qualquer momento, e por isso devia valorizá-la ainda mais, assim como cada pessoa que amo. Só posso agradecer por vocês

serem minha família, não poderia ter melhores pessoas ao meu lado fazendo esse papel.

Às minhas sobrinhas, Brena, Beatriz e Júlia, por me darem a honra de ser tia de vocês. Por entenderem minha ausência e por me darem a alegria de dormir jogadas no colchão na sala assistindo filmes até de madrugada. Por terem me mostrado que apesar de eu não estar sempre aí, ainda sou uma tia querida. Por cada beijo, abraço, sorriso, cocegas, fotos e mensagens no celular. Mensagens que variaram de desde *emojis*, pois a escrita ainda era algo novo, até o pedido de senha da NetFlix e ajuda em física e química . Não importa quanto tempo passe, vocês sempre serão as pituquinhas da tia. Sempre estarei aqui por vocês.

Aos peludinhos, de latidos e miados, que garantiram alegria e conforto com seus lambibeijos e ronronos.

Ao meu orientador, Daniel Souza Correa, por toda força e apoio despendido na minha formação. Alguns anos se passaram (7/8 anos), não sei mais ao certo, mas sei que durante esses anos aprendi inúmeras lições com você. Não foi somente uma orientação profissional, aprendi muito como pessoa. E criei laços de amizade muito forte que me fizeram te respeitar ainda mais. Palavras me fogem ao tentar te agradecer pelo apoio, paciência e preocupação em horas dolorosas e confusas que passei. Por estar ali como amigo e orientador, quando tive minhas crises depressivas, de síndrome de pânico, ansiedade e estresse. Por abrir a porta da sala e me ouvir reclamar e chorar em pânico. Por puxar minha orelha quando eu teimava estar certa (e de fato não estava), essas sempre me fizeram crescer. Por acreditar em mim e nos meus sonhos e me ajudar a seguir em frente, por tornar meus sonhos seus também. Por aparecer no laboratório inesperadamente e por ficar feliz com cada etapa nova do trabalho que dava certo. Por me ensinar a fazer as figuras e gráficos perfeitos. Por me mostrar o que é certo e como agir daqui pra frente, nessa etapa como pesquisadora. Por me fazer realizar coisas que eu mesma não acreditava que

daria conta. Por acreditar em mim quando eu mesma não era capaz de tal ato. Por me deixar ser livre pra fazer projetos e ao mesmo tempo cortar minhas asas quando já estava sobrecarregada e ainda queria fazer mais. Simplesmente, obrigada por fazer parte da minha vida profissional e pessoal. Obrigada por ser meu mestre, papel que desempenhou com desenvoltura. Se eu saio daqui hoje como uma boa profissional, saiba que isso só foi possível com sua ajuda e que em mim levo singelas e valiosas características suas.

A todos os meus amigos pelo companheirismo, ajudas infinitas em todos os sentidos. *I love you three times*

À Pós-Graduação (PPGQ) do Departamento de Química e todos seus funcionários, em especial as meninas da secretária por toda a ajuda dispensada.

À Embrapa, em especial à Embrapa Instrumentação, juntamente com todo seu corpo técnico e científico, por me disponibilizar toda a infraestrutura e conhecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>SB-Spinning</i>	<i>Solution Blow Spinning</i>
FSS.....	Fiação por sopro em solução
AA.....	Ácido ascórbico
CD.....	Dicroísmo Circular
RMN ¹ H.....	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
DRX.....	Difração de raio X
FTIR.....	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
TG.....	Análise termogravimétrica
MEV.....	Microscopia Eletrônica de Varredura
HSP	Parâmetros de solubilidade de Hansen
<i>bagVita</i>	<i>bags</i> ” de zeína com vitamina C incorporada
USDA.....	\United States Departament of Agriculture

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1- Condições de preparo das soluções à base de zeína.	14
TABELA 2.2 - Condições empregadas no processo de fiação por sopro em solução e diâmetro médio para estruturas de zeína obtidas.	25
TABELA 2.3- Ocorrência de estruturas secundárias para <i>bags</i> e fibras de zeínas, obtidas pela técnica de fiação por sopro em solução.	27
TABELA 2.4- Grupos químicos observados por RMN ^1H ⁹⁵	30
TABELA 3.1- Ocorrência de estruturas secundárias para “bags” de zeína com e sem incorporação de vitamina C, ambas obtidas por fiação por sopro em solução.....	52
TABELA 3.2- Grupos químicos observados por RMN ^1H . Os números que indicam os grupos químicos nas estruturas são apresentados na representação gráfica destas na FIGURA 3.4 ⁶⁴	54
TABELA 3.3- Eventos térmicos, das <i>bags</i> com e sem vitamina C incorporada, obtidos por meio dos gráficos de TG e DTG.	57

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1- Representação esquemática do aparato experimental do processo de fiação por sopro em solução e suas variações de bocal. 5
- FIGURA 2.1- Estruturas possíveis da zeína. (a) Tubos formados por estruturas terciárias α -hélice e (b) Estrutura de folha formada pelo pareamento de α -hélices. Figura adaptada de ⁷⁶ 10
- FIGURA 2.14 - Índice de pseudoplasticidade em função da concentração de zeína, para os solventes ácido acético e solução etanólica 80%. 34
- FIGURA 2.14 - Viscosidade dinâmica ($n = 3$) em função da concentração de zeína. (a) com ácido acético e (b) solução etanólica 80%. Os valores apresentados na parte superior esquerda do gráfico referem-se à inclinação das retas. 36
- FIGURA 2.15 - Ensaio de reologia oscilatória. Módulo de armazenamento G' (componente elástica) médio ($n = 2$) em função da frequência de oscilação das soluções de zeína (a) para solução etanólica e (d) para ácido acético; Módulo de perda G'' (componente viscosa) médio ($n = 2$) em função da frequência de oscilação das soluções de zeína (b) para solução etanólica e (e) para ácido acético; $\tan\delta$ ($\tan\delta = G''/G'$) médio ($n = 2$) em função da frequência de oscilação das soluções de zeína (c) para solução etanólica e (f) para ácido acético. 41
- FIGURA 2.16 - Gráfico de $\tan\delta$ em função das diferentes concentrações de soluções poliméricas, para ácido acético e solução etanólica 80%. 43
- FIGURA 3.1- Funções metabólicas de peixes - visão da influência de algumas vitaminas. Imagem retirada da ref. ⁶³ 48

FIGURA 3.2 – Microscopia eletrônica de varredura de estruturas de zeínas produzidas por fiação por sopro em obtidas por meio de soluções de zeínas com solução etanoica 80%. Sistema de bico sólido e temperatura de 27°C (a) Zeína 24% (m/v) e (b) Zeína 24% (m/v) com 15% (m/m) de vitamina C.....	51
FIGURA 3.3 - Espectros CD das <i>bags</i> de zeína com e sem incorporação de vitamina C, ambas obtidas por fiação por sopro em solução.....	53
FIGURA 3.4- Espectro de RMN 1H para <i>bags</i> com vitamina C incorporada, obtidas por SB-Spinning e, espectro em destaque para a região de 5 – 3 ppm. .	54
FIGURA 3.5 - Espectros de absorção na região do infravermelho para as <i>bags</i> sem e com incorporação de vitamina C, assim como a vitamina C pura.	56
FIGURA 3.6 – Curvas de TG, evidenciando comportamento térmico da vitamina C, da <i>bags</i> de zeína e das <i>bags</i> de zeína com vitamina C incorporada.	58
FIGURA 3.7 - Curva padrão de vitamina C, em tampão fosfato pH 7 para diferentes concentrações. O detalhe da figura mostra o ajuste linear da curva padrão.	59
FIGURA 3.8- Estudo da liberação de vitamina C em solução tamponada pH7, durante 24 horas e realizado em triplicata. (a) Repetição 1; (b) Repetição 2, (c) Repetição 3 e (d) Percentual cumulativo relacionado a liberação de vitamina C em função do tempo.	62

RESUMO

Microestruturas de zeína produzidas pela técnica de fiação por sopro em solução visando à incorporação e liberação lenta de vitamina C.

O desenvolvimento de micro/nanoestruturas funcionais para uso na área agrícola é relevante e tem potencial para reduzir o consumo de insumos com melhor eficiência do produto final. Nesse contexto, a obtenção de estruturas poliméricas pela técnica de fiação por sopro em solução (FFS) vem destacando-se por permitir a produção de estruturas fibrosas em tamanho micro/nanométrico com elevada taxa de produção e aplicações *in-situ*. Atualmente, a técnica de FSS tem sido majoritariamente empregada na produção de fibras, que são utilizadas puras ou como matriz de transporte de aditivos químicos para fornecer às fibras mais de uma funcionalidade aumentando as aplicações tecnológicas. O trabalho desenvolvido nesta tese se propõe a avaliar o emprego da técnica de FSS na produção de micro/nanoestruturas de zeínas, na forma de fibras e partículas, visando emprego destas como matrizes para incorporação de vitamina C para liberação controlada, as quais encontram aplicação na alimentação de peixes. Duas estruturas foram obtidas, fibras e *bags* (partículas), sendo assim avaliou-se o comportamento reológico das soluções poliméricas, visando entender como tais estruturas foram formadas. As *bags* foram escolhidas para serem usadas como modelo de incorporação de vitamina C, apresentando eficiência de incorporação de aproximadamente 73,3%, além de ter uma rápida liberação (5 minutos). Adicionalmente, as estruturas produzidas possuem um perfil de liberação reprodutível, mostrando-se com potencial para fabricação de sistemas para incorporação e liberação de vitamina C, preservando suas características físico-químicas.

ABSTRACT

Zein microstructures obtained by solution blow spinning aiming at the incorporation and slow release of vitamin C

The development of functional micro/nanostructures for use in the agricultural area is relevant and has the potential to reduce the consumption of inputs with improved efficiency of the final product. In this context, the production of polymeric structures by solution blow spinning (SB-Spinning) has been proposed as a valuable technique for allowing the production of fibrous structures in micro/nanometric scale with high production rate and in-situ applications. Currently, SB-Spinning has been mostly used in the production of fibers, which are used purely or as a matrix for carrying chemical additives to provide the fiber more functionalities for varied applications. This work aims to evaluate the use of SB-Spinning technique in the production of micro/nanostructures of zeins as fibers and particles, aiming to use them as matrices for incorporation of vitamin C for slow release applications, which find application in fish dietary. Two structures were obtained as fibers and "bags" (particles), being thus evaluated the rheological behavior of the polymer solutions, in order to understand how such structures were formed. The "bags" were chosen to be used as a model of incorporation of vitamin C presenting an incorporation efficiency of about 73,3%, besides having a fast release (5 minutes). In addition, the produced structures presented a reproducible release profile, showing potential for the production of systems for the incorporation and release of vitamin C, preserving their physical and chemical characteristics.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO AO TRABALHO 1

1. 1 - INTRODUÇÃO	1
1. 2 - ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO	3
1. 3 - OBJETIVO GERAL	3
1. 4 - MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS	4
1. 4. 1 – Materiais	4
1. 4. 2 – Fiação por Sopro em Solução (FSS/SBS/SB- <i>Spinning</i>)	4
1. 4. 3 - Técnicas físico-químicas de caracterização	5

CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO DE MICRO/ NANOESTRUTURAS DE ZEÍNAS POR MEIO DA TÉCNICA FIAÇÃO POR SOPRO EM SOLUÇÃO (FSS) 9

2.1 - CONTEXTUALIZAÇÃO COM JUSTIFICATIVA TEÓRICA	9
2.2 - OBJETIVO	12
2. 3 - MATERIAIS E MÉTODOS	12
2. 3. 1- Preparo da solução alcoólica e das soluções poliméricas	12
2. 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
2. 4. 1 – Avaliação das estruturas de zeínas produzidas por Fiação por sopro em solução	13
2. 4. 1 - Estruturas selecionadas	24
2. 4. 2 - Caracterização e determinação das estruturas secundárias das estruturas de zeína selecionadas...	26
2. 4. 3 - Caracterização reológica das soluções contendo zeínas	33
2. 5 - CONCLUSÃO PARCIAL – CAPÍTULO 2	44

CAPÍTULO 3 – MICRO/NANOESTRUTURAS DE ZEÍNAS COM VITAMINA C INCORPORADA 46

3.1 - CONTEXTUALIZAÇÃO E MOTIVAÇÃO	46
3.2 – OBJETIVO	49
3.3 - MÉTODOS	49
3.3.1 - Fiação por sopro em solução	49
3.3.2 - Caracterizações físico-químicas	50
3.3.3 – Cinética de liberação	50
3.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.4.1. Caraterizações físico-químicas	51
3.4.2 - Estudo de liberação de vitamina C a partir das bags	58
3.5. CONCLUSÃO PARCIAL – CAPÍTULO 3	63

CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	65
--	-----------

APÊNDICE A - LISTAS DE PUBLICAÇÕES DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO (2015-2019)	81
--	-----------

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO AO TRABALHO

1.1 - INTRODUÇÃO

O crescimento populacional mundial é um fenômeno que traz grandes preocupações quando se trata da questão de segurança alimentar e do fornecimento de alimentos seguros à população. Segundo Kim e colaboradores¹, estima-se que até 2030 a população mundial seja de 8,5 bilhões de pessoas, o que demandará um aumento em torno de 50% da produção de alimentos para suprir as necessidades dessa população. Desta forma, o setor do agronegócio, já de grande importância para o Brasil, terá um papel ainda mais relevante no aumento da produção e melhora da qualidade de alimentos². O setor do agronegócio vem atuando para corresponder a essas demandas através do desenvolvimento de novas tecnologias e melhora daquelas já existentes de modo a aumentar a eficiência de produção agropecuária^{3,4}.

Dentre as novas tecnologias, destaca-se a área de nanotecnologia, a qual se baseia no desenvolvimento e emprego de materiais na escala nanométrica, os quais possuem características melhoradas em relação ao mesmo material na escala macro- e micrométrica⁵. O uso dessas tecnologias no agronegócio é extremamente relevante levando em consideração a importância econômica que tal área apresenta mundialmente e em especial para o Brasil. Destaca-se que a implementação desta tecnologia–no campo pode ajudar no aumento da produção de alimentos em áreas reduzidas, prevenção de doenças em animais e diminuição da utilização de insumos agrícolas e, conseqüentemente diminuição de resíduos químicos no meio ambiente^{1,6}.

A área de obtenção e emprego de micro- e nanomateriais que agem como carregadores de insumos agropecuários, visando à posterior liberação destes em meios diversos, como solo e água^{7,8}, vem crescendo como alternativa

para melhoria do plantio e prevenção de resíduos ⁹. As matrizes de carregamento e/ou encapsulantes devem ser capazes de liberar o material ativo no meio de forma gradual ¹⁰⁻¹⁶, a fim de se ter uma liberação lenta ou controlada. Outra característica importante refere-se às propriedades de degradabilidade da matriz, a qual, por exemplo, deve possuir tempo de degradação total maior do que o do insumo, para que ocorra inicialmente a liberação gradual deste e somente quando esta finalizar, a matriz se degrade totalmente ^{10,17}.

Macromoléculas naturais com propriedades biodegradáveis estão sendo empregada no desenvolvimento de micro- e nano-carreadores de insumos agrícolas ^{14,18-23}. Estas macromoléculas são obtidas de fontes renováveis e naturais abundantes no meio ambiente. Diversos materiais de fonte renovável estão sendo bastante empregados nessa área ^{9,24}. Dentre eles, a macromolécula natural de interesse é a zeína, a qual corresponde a 80% das prolaminas encontradas no milho, e é um subproduto da produção do amido ^{25,26}, apresentando características de barreira a oxigênio e gás carbônico, biocompatibilidade e biodegradabilidade ²⁷. Este material tem sido aplicado nas áreas de desenvolvimento de embalagens ²⁸, matrizes de transporte em escala micro/nanométrica ²⁹⁻³¹, engenharia de tecidos ^{27,32} e liberação controlada ²⁹. Na literatura há trabalhos que reportam a incorporação de antígenos ^{31,33}, antibióticos ³⁰, enzimas ³⁴ e parasiticidas ²⁹ em matrizes de zeínas. As matrizes de incorporação variam sua forma estrutural, sendo as mais comuns estruturas de partículas (capsulas e esferas) ³⁵⁻³⁷ e na forma de fibras ^{38,39}.

Nesse contexto, metodologias que possam ser empregadas para o processamento de zeínas, visando à obtenção de micro- e nanoestruturas são de grande valor tecnológico. Uma das principais técnicas atuais para obtenção de nanoestruturas são a eletrofiação ⁴⁰⁻⁴⁴ e fiação por sopro em solução (FSS) ⁴⁵⁻⁴⁸ para obtenção de fibras ^{49,50}, e o *spray drier* ⁵¹⁻⁵⁵ e *eletrospray* ⁵⁶⁻⁶¹ para a

obtenção de partículas, cujas técnicas foram ainda muito pouco exploradas empregando zeína como material base. Assim, neste trabalho foi utilizada a técnica de fiação por sopro em solução para a obtenção de partículas e fibras de zeína visando à utilização desta como matriz de incorporação de vitamina C, a fim de usá-lo como modelo de liberação. Um dos interesses na vitamina C é o seu emprego na suplementação de ração de peixes visto que esta é essencial em algumas fases metabólicas relacionadas ao desenvolvimento do animal ^{28,29}.

1. 2 - ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

Esta tese está dividida da seguinte forma:

- O Capítulo 1 apresenta a motivação e o objetivo principal do trabalho, os materiais empregados, métodos de obtenção e caracterização das estruturas de zeína, os quais foram utilizados em todas as etapas de execução deste projeto de doutorado;

- O Capítulo 2 apresenta em detalhes o desenvolvimento de micro/nanoestruturas de zeínas pela técnica de fiação por sopro em solução;

- O Capítulo 3 apresenta os resultados referentes a produção e caracterização de micro/nanoestruturas de zeínas incorporadas com vitamina C com potencial aplicação na piscicultura;

- O capítulo 4 apresenta as conclusões e perspectivas futuras.

No final da tese será apresentado a seção de referências bibliográficas e um Apêndice referente às publicações realizadas no período de desenvolvimento do doutorado.

1. 3 - OBJETIVO

O projeto desenvolvido teve como objetivo a produção de micro/nanoestruturas de zeínas pela técnica de fiação por sopro em solução

(FSS) como uma rota alternativa de incorporação e/ou encapsulamento de vitamina C (modelo) para liberação lenta de insumos agrícolas.

1.4 - MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

1.4.1 – Materiais

A Zeína utilizada foi obtida da SigmaAldrich (Código Z3625). Como solventes, foram utilizados acético glacial PA ACS (Dinâmica) e álcool etílico absoluto PA ACS (Reatec). A vitamina C (ácido ascórbico) utilizada foi comprada em farmácia de manipulação da região.

1.4.2 – Fiação por Sopros em Solução (FSS/SBS/SB-*Spinning*)

A técnica de fiação por sopros em solução – FSS (*Solution Blow Spinning* – *SB-Spinning*), desenvolvida por Medeiros e colaboradores ⁴⁵, é empregada na produção de micro/nanofibras poliméricas e compósitas, apresentando como maiores vantagens a alta produtividade, simplicidade de manuseio e a não utilização de tensão elétrica (caso da eletrofiação) sendo ideal para aplicações *in situ*. Por meio de elevadas forças de arraste e sustentação aerodinâmica que se formam na superfície da solução polimérica, tem-se a formação de uma manta de não tecido, a qual é coletada pelo coletor. O arranjo experimental da fiação por sopros em solução, ilustrado na FIGURA 1. 1, consistiu de uma fonte de ar comprimido isento de óleo (Schulz, modelo 10VL/200-2HP de um estágio) contendo um manômetro (Matheson, modelo 22024-1) para regulação da pressão (p) e uma bomba ejetora de rosca (New Era Pump Systems) para controle da taxa de ejeção (β) da solução polimérica. Foi usada uma seringa hipodérmica conectada a um capilar resistente a solventes orgânicos (Fluran HCA F-5500-A, Ismatec) sendo tudo acoplado a um bico composto por agulha concêntrica centralizada. A coleta das amostras foi feita

em um sistema de controle rotacional (ω), posicionado a uma distância de trabalho (d).

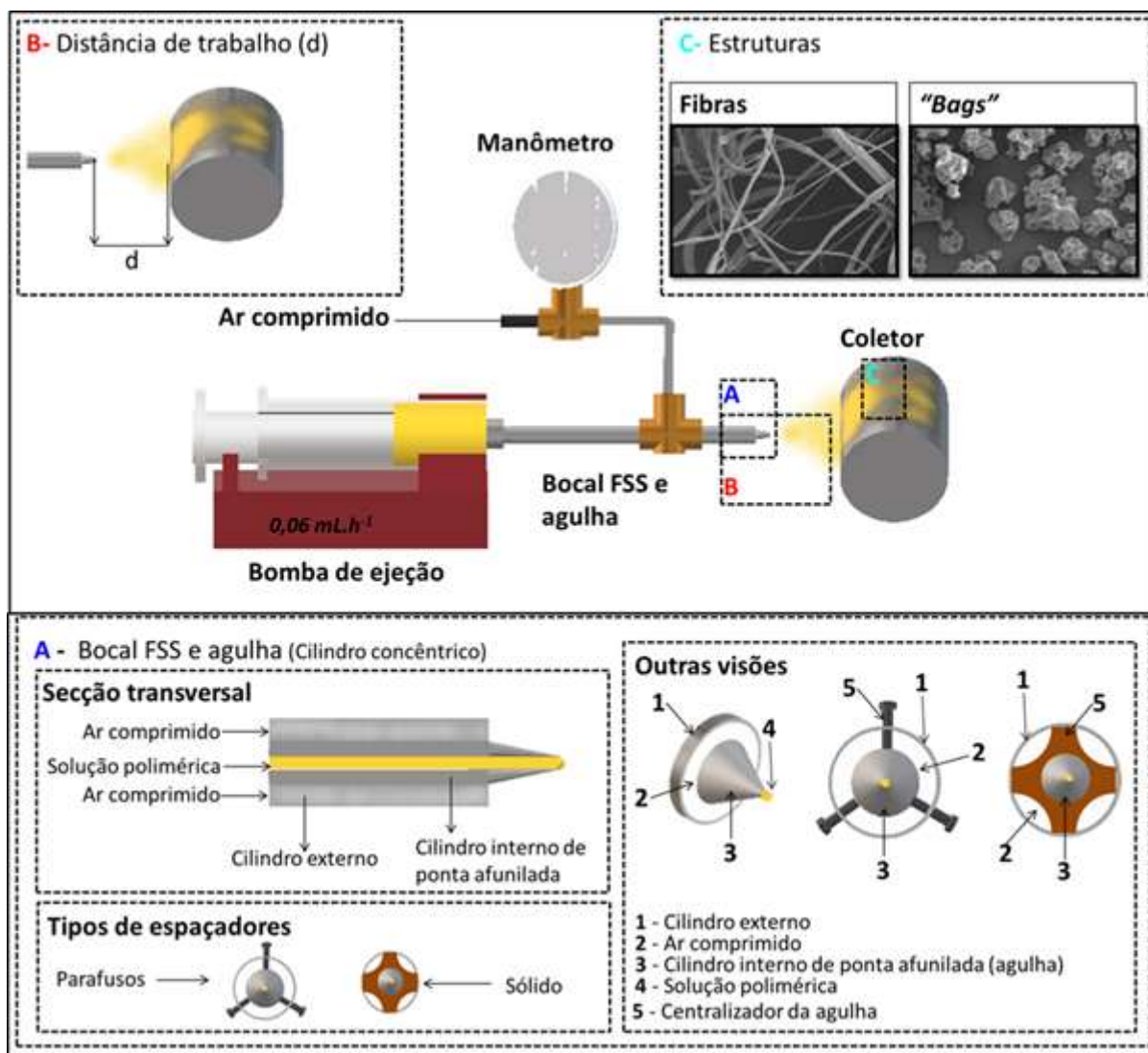


FIGURA 1.1- Representação esquemática do aparato experimental do processo de fiação por sopro em solução e suas variações de bocal.

1. 4. 3 - Técnicas físico-químicas de caracterização

1. 4. 3. 1- Dicroísmo Circular - DC

Os espectros de CD foram gravados usando um espectropolarímetro JASCO J-720, com resolução de 1nm, acumulação de 1-10 traços e com varredura de 50 nm.min⁻¹, empregando-se uma cubeta de quartzo. O cálculo da

porcentagem das estruturas secundárias foi realizado baseado na metodologia descrita por Bicudo ⁶⁴.

1. 4. 3. 2- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foi empregada para a caracterização estrutural das amostras. Aproximadamente 10 mg de amostra foram solubilizados em 1 mL de solução de dimetilsulfóxido-d₆ (DMSO-d₆). Após solubilização, a solução obtida foi transferida para tubo de quartzo ($\phi = 5$ mm). Os espectros de RMN ¹H foram adquiridos em um espectrômetro modelo 400/54 *Premium Shielded* (Marca *Agilent Technologies*) operando a 400 MHz a 25 °C. A janela espectral utilizada foi 6,4 kHz (14 a 2 ppm), tempo médio de relaxação de 30 s e tempo médio de aquisição de 5 s.

1. 4. 3. 3- Reometria

As medições reológicas das soluções de zeínas foram realizadas em um reômetro Anton-PaarPhysica MCR 301, com geometria de cilindros concêntricos (23,8mm e 27,6mm) e altura de 40 mm entre eles. As medidas realizadas a 25°C e isentas de nitrogênio.

Para avaliação da viscosidade das soluções em relação à taxa de cisalhamento, utilizou-se o modelo de reometria rotacional, sendo utilizada para coletada de dados uma faixa de taxa de cisalhamento 1 a 1000 s⁻¹. Também foram usadas essas condições para avaliação do índice de pseudoplasticidade do material. Já as avaliações do módulo elástico e módulo viscoso das soluções foram realizadas por meio da reometria oscilatória, sendo avaliado o comportamento da solução na faixa de frequência angular de 0,1 a 200 rad.s⁻¹.

As análises oscilatórias foram realizadas antes das análises rotacionais, pois não degradam a amostras. Todas as análises foram feitas em

triplicata com tempo de estabilização de 3 minutos antes de cada medida, sendo coletados 30 pontos para cada análise.

1. 4. 3. 4 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As estruturas de zeínas obtidas antes e após a incorporação da vitamina C foram analisadas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo JEOL 6510. As amostras foram recobertas com ouro (espessura de 20nm) utilizando uma metalizadora Leica EM SCD050. Micrografias foram registradas em diferentes magnificações e na voltagem de 10kV.

Os diâmetros das estruturas foram avaliados por um software analisador de imagens (*Image J, National Institutes of Health, USA*), sendo que para cada amostra, o diâmetro médio e sua distribuição foram determinados a partir da análise de 100 estruturas aleatórias de cada micrografia. Para as estruturas de *bags* padronizou-se como diâmetro a medida entre as bordas externas.

1. 4. 3. 5 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho foram coletados através do espectrômetro FTIR Vertex 70 (Bruker), com módulo de ATR operando em modo de refletância. Utilizou-se a região espectral de 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução espectral de 2 cm^{-1} . Os espectros foram tratados de acordo com Forato e colaboradores⁶⁵, onde a verificação das estruturas secundárias de proteínas (α -hélice, folhas β , voltas β e irregulares) foi analisada por meio da banda referente à amida I (1700-1600 cm^{-1}).

1. 4. 3. 6 – Análises termogravimétricas (TG)

As análises termogravimétricas das amostras foram realizadas em um equipamento Q500 TA *Instruments* em atmosfera de nitrogênio a um fluxo de 20 mL.min⁻¹. Estas foram aquecidas de 25 a 800°C, com taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹.

1. 4. 3. 7 - Difração de raio X (DRX)

Padrões de difração de raio X das estruturas de zeínas com e sem vitamina C foram obtidos utilizando um Difratorômetro Shimadzu XRD-6000 empregando radiação Cu K α ($\lambda= 0,154$ nm). Os espectros foram coletados com velocidade de 1°.min⁻¹, com varredura de 5° a 35° (2 θ). As amostras fabricadas pela técnica de FSS foram removidas das folhas de alumínio e acomodadas sobre um porta amostra de alumínio, para então serem submetidas às análises de DRX.

CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO DE MICRO/ NANOESTRUTURAS DE ZEÍNAS POR MEIO DA TÉCNICA FIAÇÃO POR SOPRO EM SOLUÇÃO (FSS)

2.1 - CONTEXTUALIZAÇÃO COM JUSTIFICATIVA TEÓRICA

Como mencionado no Capítulo 1, as zeínas são macromoléculas potenciais para a produção de matrizes carregadoras de materiais ativos ^{37,66-73}, devido às suas propriedades de barreira a oxigênio e gás carbônico, biocompatibilidade e biodegradabilidade ^{26,34,74,75}. A estrutura primária da zeína é composta por resíduos de aminoácidos apolares (leucina, prolina, alanina, glicina, valina e outros), as quais a tornam altamente hidrofóbicas, sendo, portanto, insolúveis em água, mas solúveis em soluções alcoólicas ^{29,76-79}, conforme ilustrado na FIGURA 2.1.

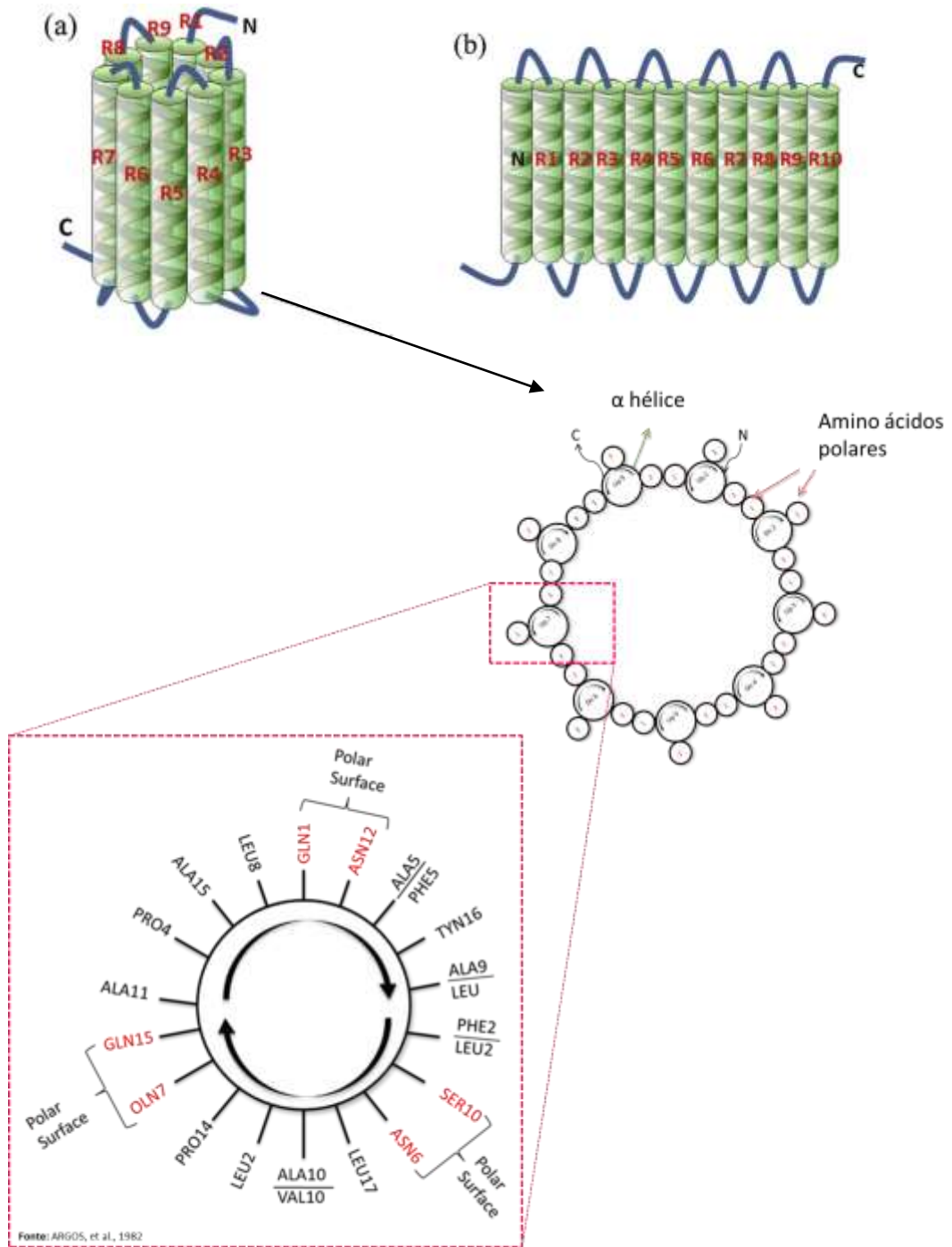


FIGURA 2.1- Estruturas possíveis da zeína. (a)Tubos formados por estruturas terciárias α -hélice e (b) Estrutura de folha formada pelo pareamento de α -hélices. Figura adaptada de ⁷⁶.

A produção de estruturas de zeínas como matriz de incorporação e encapsulamento de materiais já vem sendo empregada em diversas áreas, por exemplo, a produção de capsulas e partículas de zeína pode ser realizada por técnicas como separação de fases^{37,80}, *eletrospray*^{35,81} entre outras^{36,81}

Já a obtenção de matriz como mantas de nanofibras pode ser realizada pela técnica de eletrofiação^{38,39,83-85}. Apesar de algumas destas técnicas terem a possibilidade de aplicação em escala industrial, usualmente elas necessitam de mais de uma etapa de processamento e aparato experimental sofisticado, o que dificulta a aplicação *in situ* do material. Mesmo as técnicas de eletrofiação e *eletrospray*, que garantem um material final (matriz e aditivo) processado em uma única etapa, não podem ser aplicadas *in situ* por demandarem o uso de uma fonte de alta tensão para obtenção das estruturas. Desta maneira, torna-se interessante a busca de rotas alternativas para obtenção de diferentes tipos de estruturas empregando técnicas simples e que tornem possível aplicação *in situ*. Neste sentido, a técnica de fiação por sopro em solução, desenvolvida por Medeiros e colaboradores da Embrapa Instrumentação e USDA (United State Departament Agriculture)⁴⁵, é uma alternativa interessante para produção de micro- e nanoestruturas para aplicações *in situ*. Esta técnica produz fibras com características morfológicas similares àquelas produzidas por eletrofiação, mas com maior produtividade e sem necessidade de se utilizar forças elétricas, mas sim forças aerodinâmicas geradas por meio de um gás pressurizado, possibilitando a sua aplicação *in situ*^{46,86}. Esta técnica tem permitido a obtenção de fibras para aplicações em engenharia de tecido^{47,87}, adsorção de poluentes⁸⁸, liberação lenta de princípios ativos^{89,90} entre outras aplicações. Neste contexto, a obtenção de fibras de zeína por fiação por sopro em solução foi reportada pela primeira vez em 2016, quando Liu e colaboradores⁹¹ conseguiram produzir fibras de zeína com ácido

acético como solvente. Apesar da técnica ter sido usada para obtenção de fibras, resolveu-se verificar a sua potencialidade para obtenção de partículas de zeína. Sendo assim, neste capítulo reportaremos o desenvolvimento diferentes estruturas (fibras e partículas) de zeína pela técnica de fiação por sopro em solução, como rota alternativa para produção de matrizes para incorporação e encapsulação de materiais de interesse para liberação lenta.

2.2 - OBJETIVO

Objetivou-se a produção de estruturas (fibras e partículas) de zeínas por meio da técnica de fiação por sopro em solução, variando-se parâmetros experimentais a fim de melhorar as condições para obtenção das micro/nanoestruturas.

2.3 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1- Preparo da solução alcoólica e das soluções poliméricas

- Soluções poliméricas: zeínas com ácido acético glacial

Para preparo das soluções, adicionou-se zeínas (sem nenhum processo de purificação adicional), em ácido acético glacial e manteve-se a solução sob agitação magnética à temperatura controlada (27°C e 80°C), por aproximadamente 2 horas. Tal adição foi realizada lentamente com o intuito de evitar aglomeração das zeínas durante o processo de solubilização. O recipiente de solubilização foi vedado para evitar a evaporação do solvente durante o processo.

- Soluções poliméricas: zeínas em solução etanólica 80%

Para preparo das soluções de zeínas em solução alcoólica, o processo utilizado foi similar ao empregado para sua solubilização em ácido acético. Inicialmente foi preparada a solução alcoólica 80%, utilizando água

destilada e etanol PA, e posteriormente as zeínas foram sendo adicionadas gradualmente, para evitar a aglomeração das mesmas. Foi utilizado um agitador magnético com controle de temperatura. Manteve-se o recipiente utilizado vedado para evitar a evaporação do solvente durante a solubilização.

2.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 – Avaliação das estruturas de zeínas produzidas por Fiação por sopro em solução

Considerando que as zeínas são solúveis em soluções alcoólicas e soluções ácidas⁹⁰, optou-se trabalhar com o ácido acético e com uma solução etanólica 80% como solventes, na produção das estruturas de zeínas por fiação por sopro em solução.

O processo de produção de fibras por fiação por sopro em solução está associado às variáveis relacionadas ao próprio processo, às características da solução e ambientais, como já mencionado no Capítulo 1. Sendo assim, baseado na literatura, fixaram-se os parâmetros de: distância de trabalho (d), taxa de ejeção da solução polimérica (β), pressão do ar comprimido (p) e rotação do coletor (ω)^{45,46}. A partir disso, foram verificadas as relações entre a concentração polimérica (c) e a formação de diferentes estruturas, quando utilizado ácido acético glacial e solução etanólica (80%), como solventes, além da influência da temperatura durante o processo de solubilização do polímero.

2.4.1.1 - Efeito da concentração polimérica (c) e temperatura durante o processo de solubilização.

As amostras 01 a 12 (TABELA 2.1) foram obtidas variando-se a concentração polimérica (c) e a temperatura durante o processo de solubilização.

Manteve-se constante a distância de trabalho ($d = 60$ cm), a taxa de ejeção ($\beta = 0,02\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$), pressão do gás ($p = 50$ psi) e rotação do coletor ($\omega=200\text{rpm}$).

TABELA 2.1- Condições de preparo das soluções à base de zeína.

Amostras	Concentração (c) (m/v)	Solvente	Temperatura de solubilização (°C)
01	Zeína 24%	Ácido acético	27
02	Zeína 27%	Ácido acético	27
03	Zeína 30%	Ácido acético	27
04	Zeína 24%	Ácido acético	80
05	Zeína 27%	Ácido acético	80
06	Zeína 30%	Ácido acético	80
07	Zeína 24%	Solução etanólica 80%	27
08	Zeína 27%	Solução etanólica 80%	27
09	Zeína 30%	Solução etanólica 80%	27
10	Zeína 24%	Solução etanólica 80%	80
11	Zeína 27%	Solução etanólica 80%	80
12	Zeína 30%	Solução etanólica 80%	80

Nas FIGURAS 2.2 e 2.3 são apresentadas as micrografias eletrônicas de varredura (MEV) das amostras obtidas com as condições indicadas na TABELA 2.1, com ácido acético e com solução etanólica 80% respectivamente. O uso destes solventes possibilitou a obtenção de estruturas de

zeína particulada, com geometria indefinida, as quais serão abordadas como *bags*.

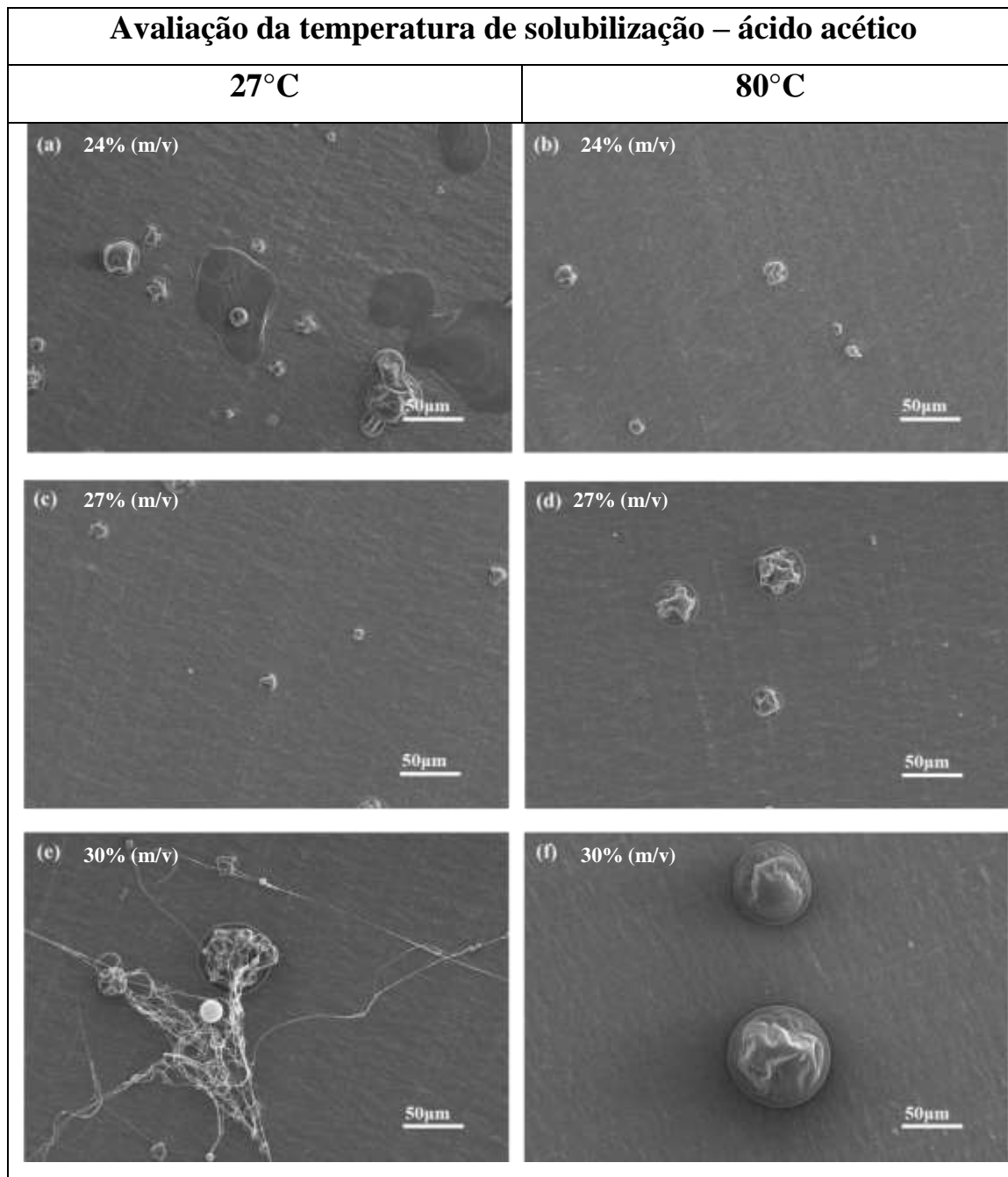


FIGURA 2.2 - Microscopia eletrônica de varredura de estruturas de zeína produzidas por fiação por sopro em solução empregando ácido acético. Sistema de bico sólido e temperatura de 27°C (a) 24% (m/v), (c) 27% (m/v) e (e) 30% (m/v); e Sistema de bico sólido e temperatura de 80°C (b) 24% (m/v), (d) 27% (m/v) e (f) 30% (m/v).

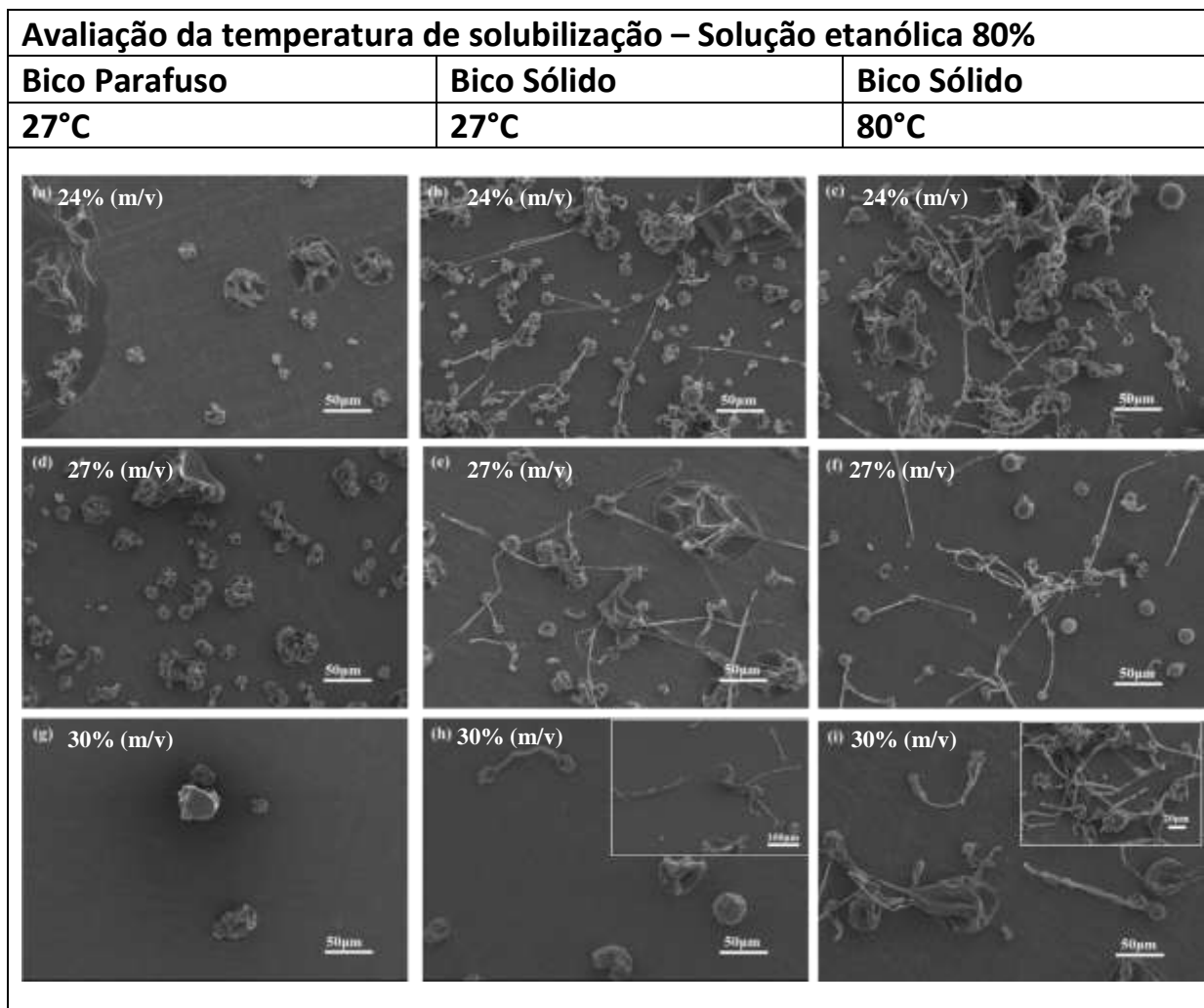


FIGURA 2.3 - Microscopia eletrônica de varredura de estruturas de zeína produzidas por fiação pro sopro em solução empregando solução etanólica 80%. Sistema de bico com parafusos e temperatura de 27°C (a) 24% (m/v), (d) 27% (m/v) e (g) 30% (m/v); Sistema de bico sólido e temperatura de 27°C (b) 24% (m/v), (e) 27% (m/v) e (h) 30% (m/v); Sistema de bico sólido e temperatura de 80°C (c) 24% (m/v), (f) 27% (m/v) e (i) 30% (m/v).

Para a amostra de zeína em ácido acético (FIGURA 2.3), o aumento da temperatura durante o processo de solubilização não se mostrou adequado para a formação de fibras. Tal fato está relacionado à diminuição da viscosidade da solução com aquecimento, gerando um menor emaranhamento das cadeias poliméricas^{45,46,48}. Já para as amostras obtidas com solução etanólica 80% (FIGURA 3.3) foi observado o comportamento oposto, ou seja, o aumento da

temperatura durante o processo de solubilização auxiliou no estiramento das *bag*.

Em suma, os resultados obtidos indicam que o aumento da temperatura durante o processo de solubilização auxilia na formação de fibras somente com a solução etanólica 80%. Sendo assim, manteve-se tal processo na avaliação de outras concentrações visando à obtenção de estruturas fibrosas. Já para a solução em ácido acético, manteve-se a temperatura de 27°C (ambiente) durante o processo de solubilização, pois o aquecimento não resultou na formação de fibras.

2. 4. 1. 2 - Efeito da concentração polimérica (c)

Na FIGURA 2.4 são apresentadas as micrografias das estruturas obtidas com ácido acético e solução etanólica 80%, respectivamente, para diferentes concentrações poliméricas, mantendo-se fixos os parâmetros: $d = 60$ cm, $\beta = 0,02$ mL.min⁻¹ e $p = 50$ psi. As concentrações poliméricas avaliadas foram de 24, 27, 30 (FIGURA 2.3 e 2.4), 40 e 50 % (m/v) (FIGURA 2.5), sendo obtidas na temperatura ambiente (27°C) para ácido acético e, a 80°C para solução etanólica 80%.

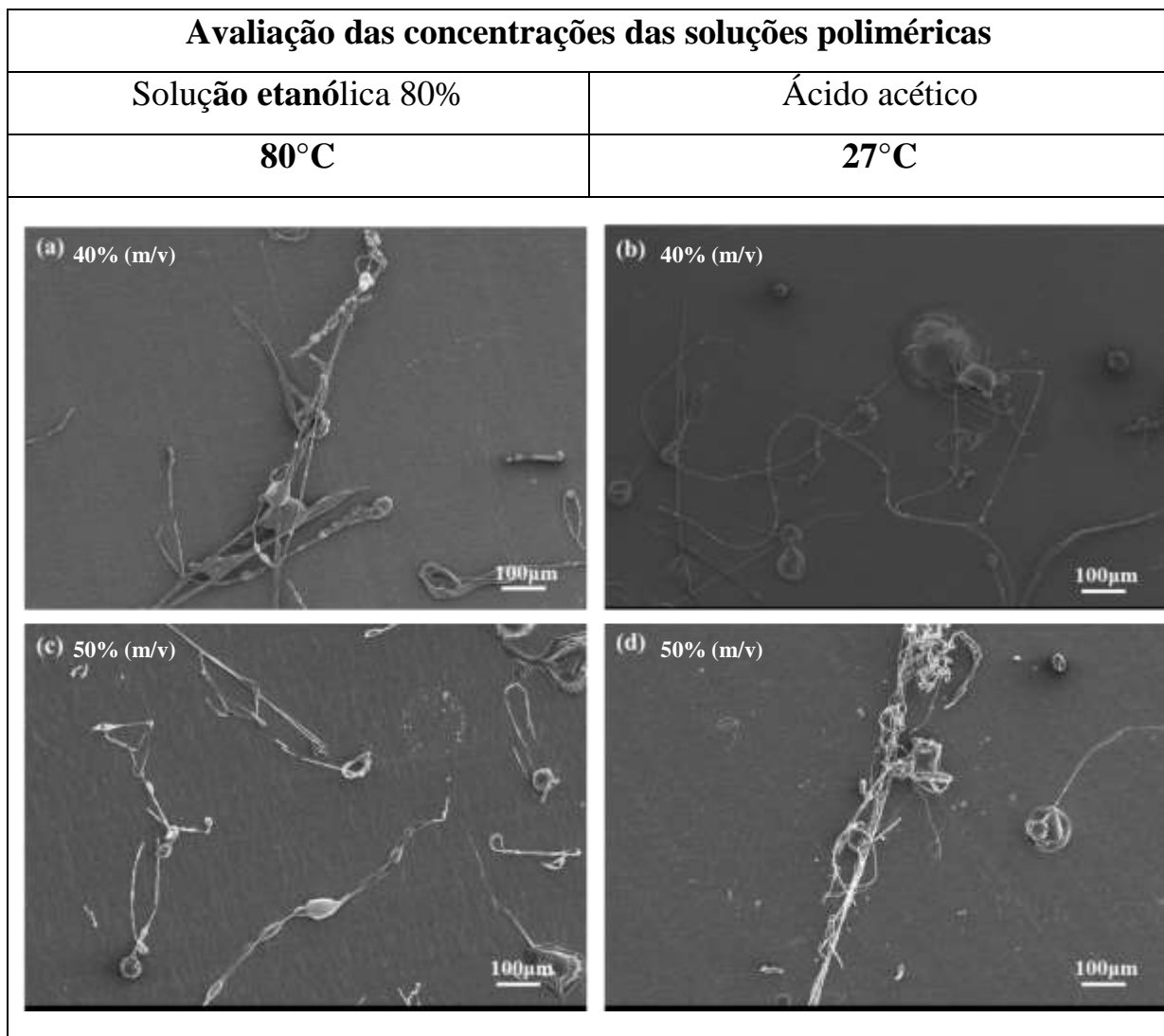


FIGURA 2.4 - Microscopia eletrônica de varredura de estruturas de estruturas de zeína produzidas por fiação pro sopro em solução empregando soluções de zeínas pelo sistema de bico sólido. Solução etanólica 80% e temperatura de 80°C (a) 40% (m/v) e (c) 50% (m/v); Ácido acético e temperatura de 27°C (b) 40% (m/v) e (d) 50% (m/v).

Na FIGURA 2.4 (a) e (c), referente à solução etanólica 80%, observa-se que não existe a formação de fibras, porém há presença de estiramentos das *bags* mostrando uma tendência de formação de fibras que pode ser melhorado por meio de outras mudanças de variáveis experimentais. Além disso, vale ressaltar que foram estudadas concentrações de 60 e 70% (m/v),

porém não foi possível obter fibras devido à alta viscosidade da solução, o que gerou a obstrução da agulha durante o processo de fiação.

Já para as estruturas provenientes de soluções de ácido acético (FIGURA 2.4 (b) e (d)), o aumento da concentração polimérica ocasionou a formação de fibras, apesar de se observar a presença de *beads* (defeitos gerados pela instabilidade do jato polimérico durante o processo de fiação) e mesmo de *bags*. Porém, não se nota aumento da formação de fibras formadas com o aumento de concentração de 30% (FIGURA 2.2 e)). Para concentrações de 60 e 70% (m/v) também não foi possível obter fibras devido à alta viscosidade e consequente obstrução da agulha.

O aumento da concentração polimérica (FIGURAS 2.2, 2.3 e 2.4) gera um maior emaranhamento das cadeias poliméricas das zeínas, resultando no aumento da viscosidade da solução polimérica, o que leva a um aumento da estabilidade e estiramento da gota da solução gerando um aumento na tendência de formação de fibras^{45,48}. Tal efeito foi observado para as soluções obtidas com ácido acético, onde o aumento da concentração tendeu a formação de fibras (FIGURA 2.4 (b) e (d)).

AValiação DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO

CONCLUSÕES:

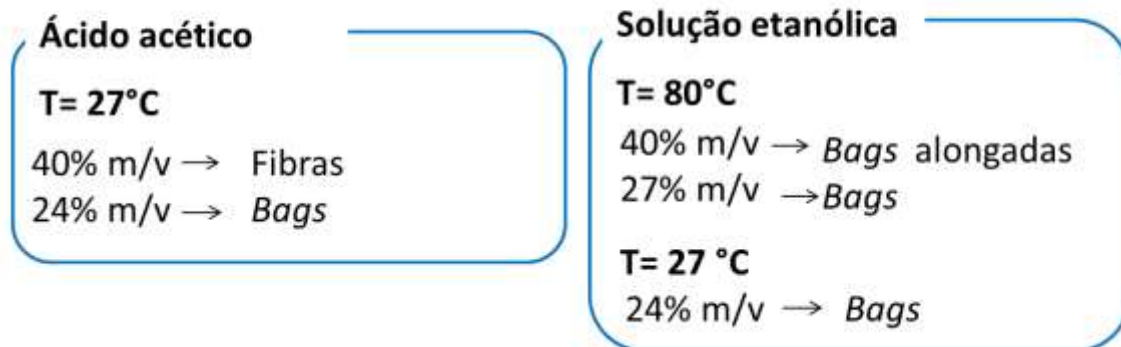


FIGURA 2.5 - Conclusões gerais da avaliação da concentração polimérica para obtenção das estruturas de zeínas.

2. 4. 1. 3 - Efeito da taxa de ejeção da solução polimérica (β)

O efeito da taxa de ejeção da solução polimérica (β) na formação de estruturas fibrosas foi avaliado somente nas concentrações de 24, 30 e 40% (m/v) para ácido acético a 27°C, e 27 e 40% (m/v) para solução etanólica 80% a 80°C. A escolha dessas concentrações está relacionada à formação das *bags* e de fibras, para ambos os solventes e temperaturas de solubilização polimérica.

A taxa de ejeção polimérica foi avaliada em 0,02 mL.min⁻¹ (taxa empregada nos estudos abordados nos tópicos 2.4. 1.2 e 2.4. 1.3) e 0,06 mL.min⁻¹, mantendo-se constantes a pressão ($p = 50$ psi) e a distância de trabalho ($d = 60$ cm).

Na FIGURA 2.6 observa-se que a variação da taxa de ejeção da solução polimérica resulta em um estiramento eficiente das *bags* dando origem a fibras nas concentrações de 30 e 40% (m/v), sendo que as fibras ficam mais definidas e sem defeitos com a concentração de 40% (m/v) (FIGURA 2.6 (f)). Já para as soluções obtidas com solução etanólica (FIGURA 2.8), o aumento na

taxa de ejeção da solução não foi capaz de causar um estiramento efetivo das *bags* para formar fibras. O que se observa é que com a taxa menor, na concentração de 27% de zeína, já é possível observar o alongamento das *bags*, o que não ocorre para uma maior taxa de ejeção para a mesma concentração.

Taxas de ejeção maiores proporcionam a formação de jatos de solução polimérica mais estável, o que favorece o estiramento e a formação de fibras. Para taxas de ejeção mais baixas, numa dada pressão, a gota polimérica é menor e mais facilmente “arremessada” ao coletor, levando a um menor tempo para estabilização do jato polimérico, assim como levando à maior formação de fibras com defeitos e *bags*.

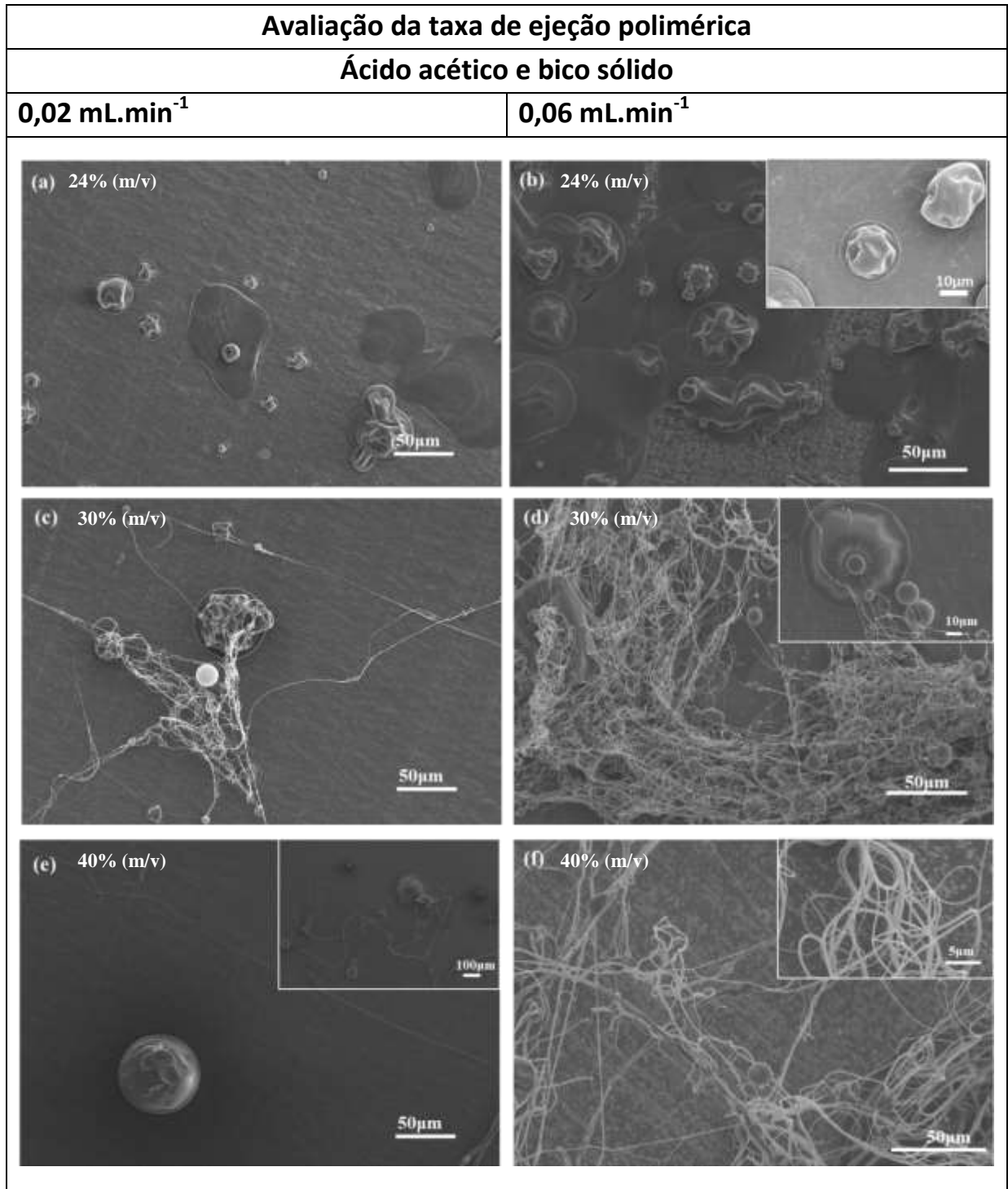


FIGURA 2.6 - Microscopia eletrônica de varredura de estruturas de zeínas produzidas por fiação por sopro em solução utilizando sistema de bico sólido, com ácido acético e temperatura de 27°C. Taxa de ejeção da solução polimérica de 0,02 mL.min⁻¹ . (a) 24% (m/v), (c) 30% (m/v) e (e) 40% (m/v); Taxa de ejeção da solução polimérica de 0,06 mL.mi⁻¹ (b) 24% (m/v), (d) 30% (m/v) e (f) 40% (m/v).

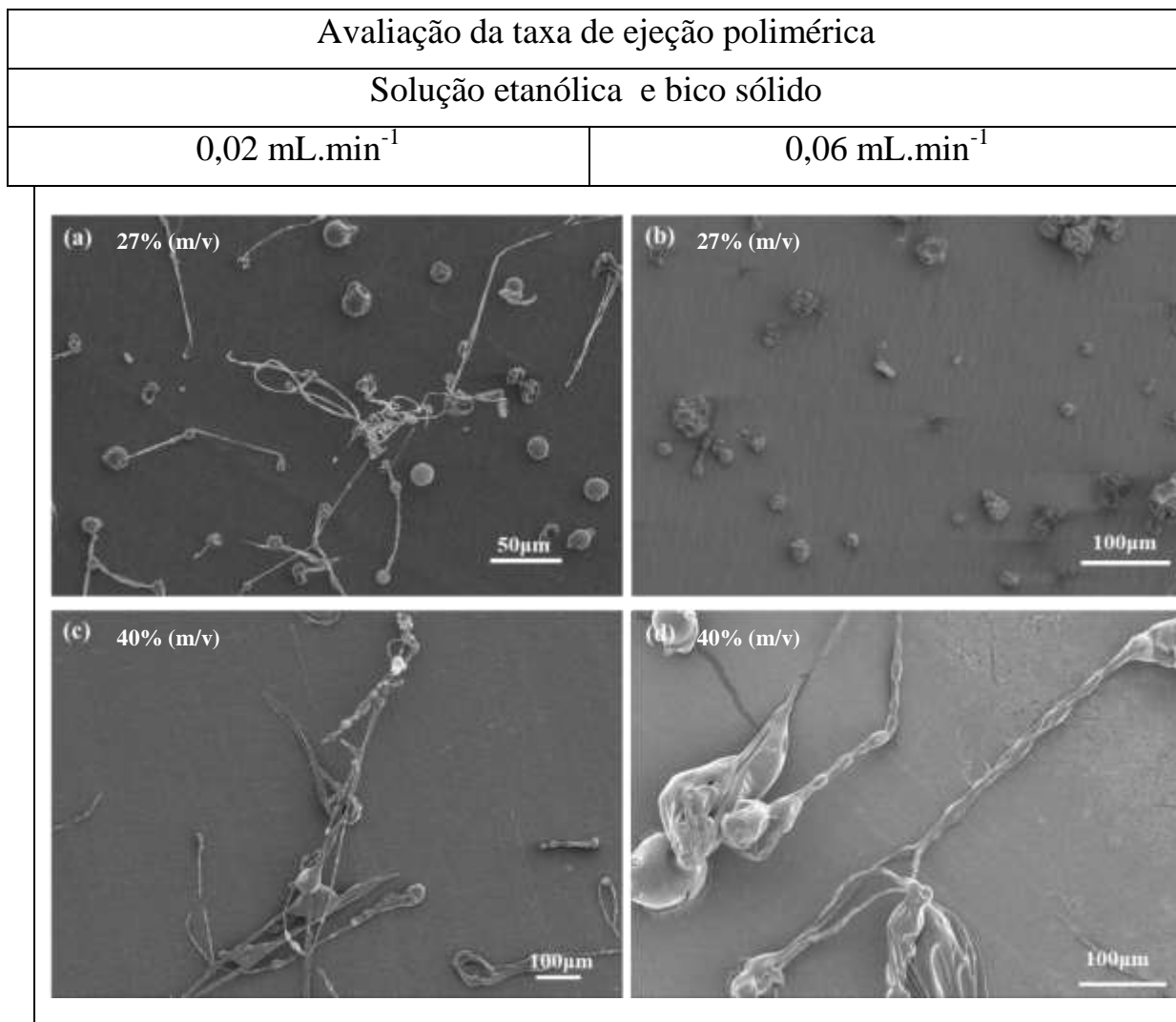


FIGURA 2.7 - Microscopia eletrônica de varredura de estruturas de zeínas produzidas pelo sistema de bico sólido, com solução etanólica 80% e temperatura de 80°C. Taxa de ejeção da solução polimérica de 0,02 mL.min⁻¹. (a) 27% (m/v) e (c) 40% (m/v); Taxa de ejeção de ejeção da solução polimérica de 0,06 mL.min⁻¹ (b) 27% (m/v) e (d) 40% (m/v).

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TAXA DE VAZÃO

CONCLUSÕES:

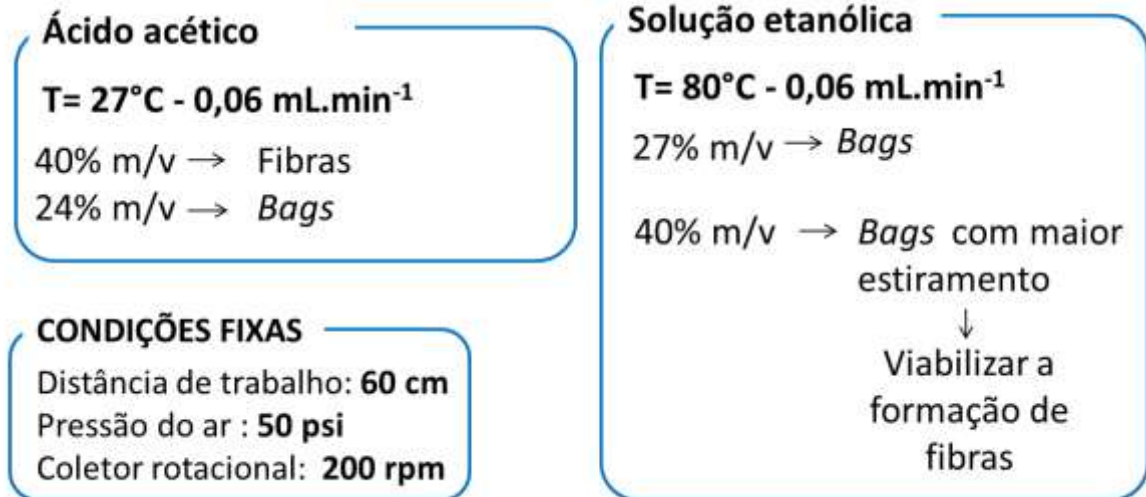


FIGURA 2. 8- Conclusões gerais da avaliação da influencia da taxa de ejeção da solução polimérica para obtenção das estruturas de zeínas.

2. 4. 1 - Estruturas selecionadas

Dados os resultados da avaliação do efeito de algumas variáveis na formação de diferentes estruturas de zeínas foi possível especificar as variáveis para obtenção das estruturas de *bags* e fibras, para ambos os solventes (TABELA 2.2).

A FIGURA 2.9 mostra as estruturas de zeínas selecionadas, ou seja, as melhores estruturas obtidas para as soluções poliméricas, levando-se em consideração os efeitos das variáveis (c), (β) e temperatura de solubilização, para ambos os solventes. Observou-se que a formação de fibras só ocorreu para as soluções obtidas com ácido acético.

Na TABELA 2.2 é mostrado o valor médio dos diâmetros das estruturas validadas. Nota-se que entre as *bags* obtidas com solução etanólica 80% há uma diferença significativa em relação à temperatura empregada durante

o processo de solubilização. As *bags* obtidas com solução a 80°C possuíram um menor diâmetro médio ($20\pm 10 \mu\text{m}$) em comparação com as de 27°C ($40\pm 11 \mu\text{m}$). Tal resultado é justificado pelo fato da maior temperatura diminuir a viscosidade da solução polimérica, cuja gota é mais facilmente arrastada pelo jato de ar, dando origem a estruturas menores. Se não houvesse influência da temperatura, seria esperado que as *bags* obtidas com $c=27\%$ m/v tivessem maior diâmetro médio, devido a maior concentração de polímeros na solução e, conseqüentemente maior emaranhamento. Ao avaliarmos as *bags* obtidas com diferentes solventes na mesma temperatura de solubilização e mesma concentração (24%), observou-se um maior diâmetro médio para a solução etanólica 80%. Porém, ao compararmos as estruturas obtidas com concentrações de 27% (80°C) e 24% (27°C), observa-se que ambas possuem diâmetro médio próximos, de 20 ± 10 e $18\pm 11 \mu\text{m}$, respectivamente, indicando que as viscosidades podem estar próximas.

TABELA 2.2 - Condições empregadas no processo de fiação por sopro em solução e diâmetro médio para estruturas de zeína obtidas.

	Bags	Bags	Bags	Fibras
Concentração (c) (m/v)	Zeína 24%	Zeína 27%	Zeína 24%	Zeína40%
Solvente	Solução etanólica 80%	Solução etanólica 80%	Ácido acético	Ácido acético
Temperatura (solubilização) (T_s)	27°C	80°C	27°C	27°C
Taxa de ejeção (β) (mL.min⁻¹)	0,02	0,06	0,06	0,06
Pressão ar comprimido (p) (PSI)	50	50	50	50
Distância de trabalho (d) (cm)	60	60	60	60
Diâmetro médio (μm)	40±11	20±10	18±11	0,556±0,193

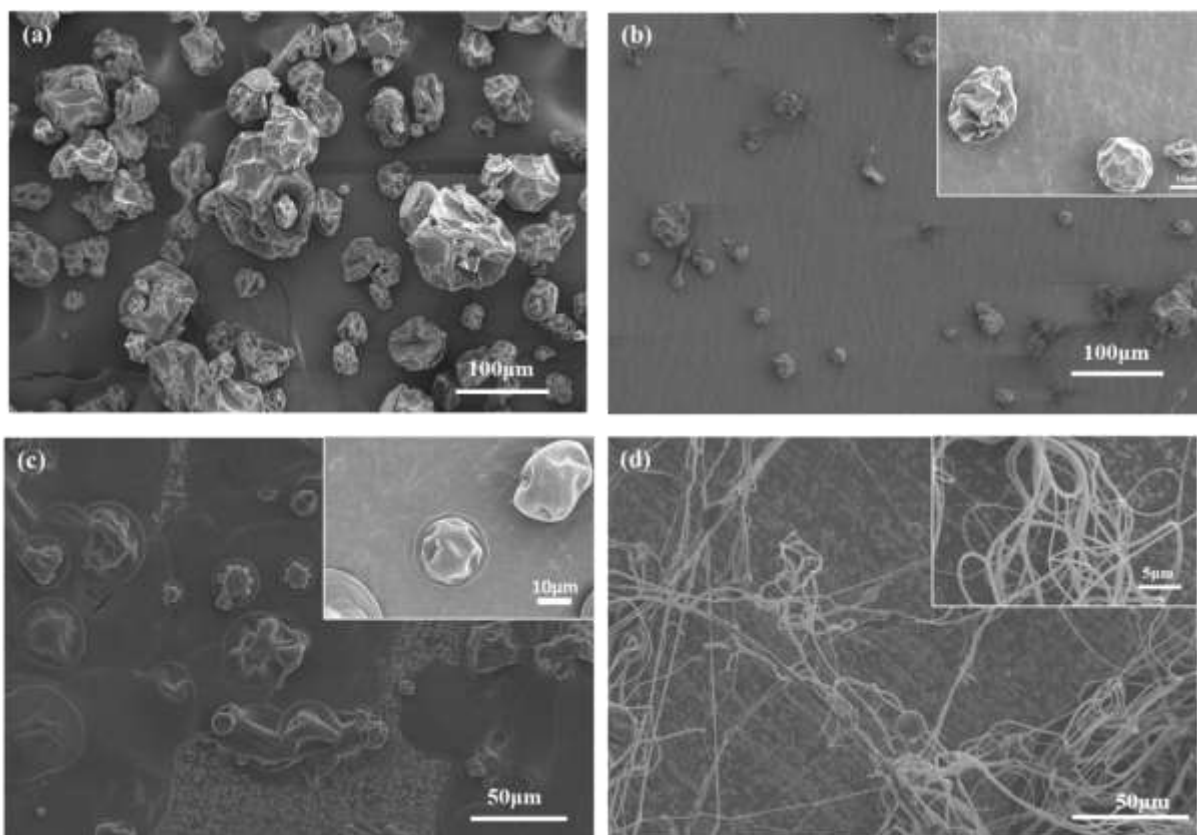


FIGURA 2.9- - Microscopia eletrônica de varredura de estruturas de zeínas produzidas por fiação por sopro em solução obtidas com solução etanólica 80% *Bags* (a) Zeína 24% m/v, $\beta= 0,06\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $d=60\text{ cm}$, $p=50\text{ PSI}$ e $T_s= 27^\circ\text{C}$; (b) Zeína 27% m/v, $\beta= 0,02\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $d=60\text{ cm}$, $p=50\text{ PSI}$ e $T_s= 80^\circ\text{C}$. Microscopia eletrônica de varredura de estruturas de zeínas obtidas com ácido acético - *Bags* (c) Zeína 24% m/v, $\beta= 0,06\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $d=60\text{ cm}$, $p=50\text{ PSI}$ e $T_s= 27^\circ\text{C}$; Fibras (d) Zeína 40% m/v, $\beta= 0,06\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $d=60\text{ cm}$, $p=50\text{ PSI}$ e $T_s= 27^\circ\text{C}$.

2. 4. 2 - Caracterização e determinação das estruturas secundárias das estruturas de zeína selecionadas

A fim de verificar possíveis alterações físico-químicas da zeína de partida decorrentes do processo de fiação por sopro em solução, assim como de diferentes solventes e temperatura durante o processo de solubilização, foram realizadas algumas caracterizações físico-químicas para as estruturas obtidas validadas.

A FIGURA 2.10 apresenta os espectros de dicroísmo circular (DC) obtidos para todas as estruturas validadas de zeína, com ambos os solventes. Todos os espectros são caracterizados por um pico largo negativo por volta de 228 nm, o qual é característico da estrutura secundária α – hélice^{64,95}. Observa-se que não houve degradação da estrutura secundária da zeína (α – hélice) e a mesma manteve-se predominante após o processo de produção das estruturas pela técnica de fiação por sopro em solução, independente do solvente empregado, conforme mostrado na TABELA 2.3.

TABELA 2.3- Ocorrência de estruturas secundárias para *bags* e fibras de zeínas, obtidas pela técnica de fiação por sopro em solução.

	Zeína de partida	<i>Bags</i> (EtOH:H₂O) 80°C	<i>Bags</i> (EtOH:H₂O) 27°C	<i>Bags</i> (ácido) 27°C	Fibras (ácido) 27°C
α – hélice	98,4%	99,1%	95,9%	99,0%	99,5%
β - folhas			4,1%		

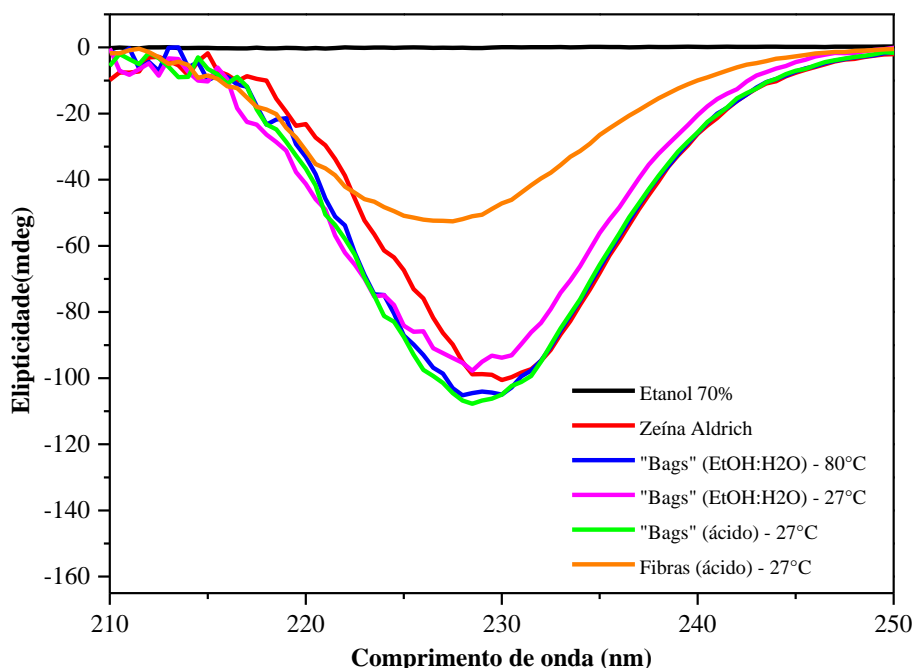


FIGURA 2.10- Espectros CD de diferentes estruturas de zeínas obtidas pela técnica de fiação por sopro em solução.

Por meio da técnica de espectroscopia de RMN de ^1H , mostrado na FIGURA 2.11, observa-se sinais em aproximadamente 8 ppm, 2,8 ppm, de 2 a 1ppm, os quais são referentes aos grupos químicos presentes na zeína⁹⁵ (TABELA 2.4). Também são observados os sinais referentes aos solventes (DMSO e HDO) além do aparecimento do sinal característico do ácido acético nas amostras de *bags* e fibras obtidas por meio desse solvente. Porém nota-se que a utilização de solventes diferentes (assim como o processo de fiação propriamente) não interferiu na estrutura da zeína, ou seja, não houve processo de degradação perceptível pelas técnicas de RMN ^1H e DC.

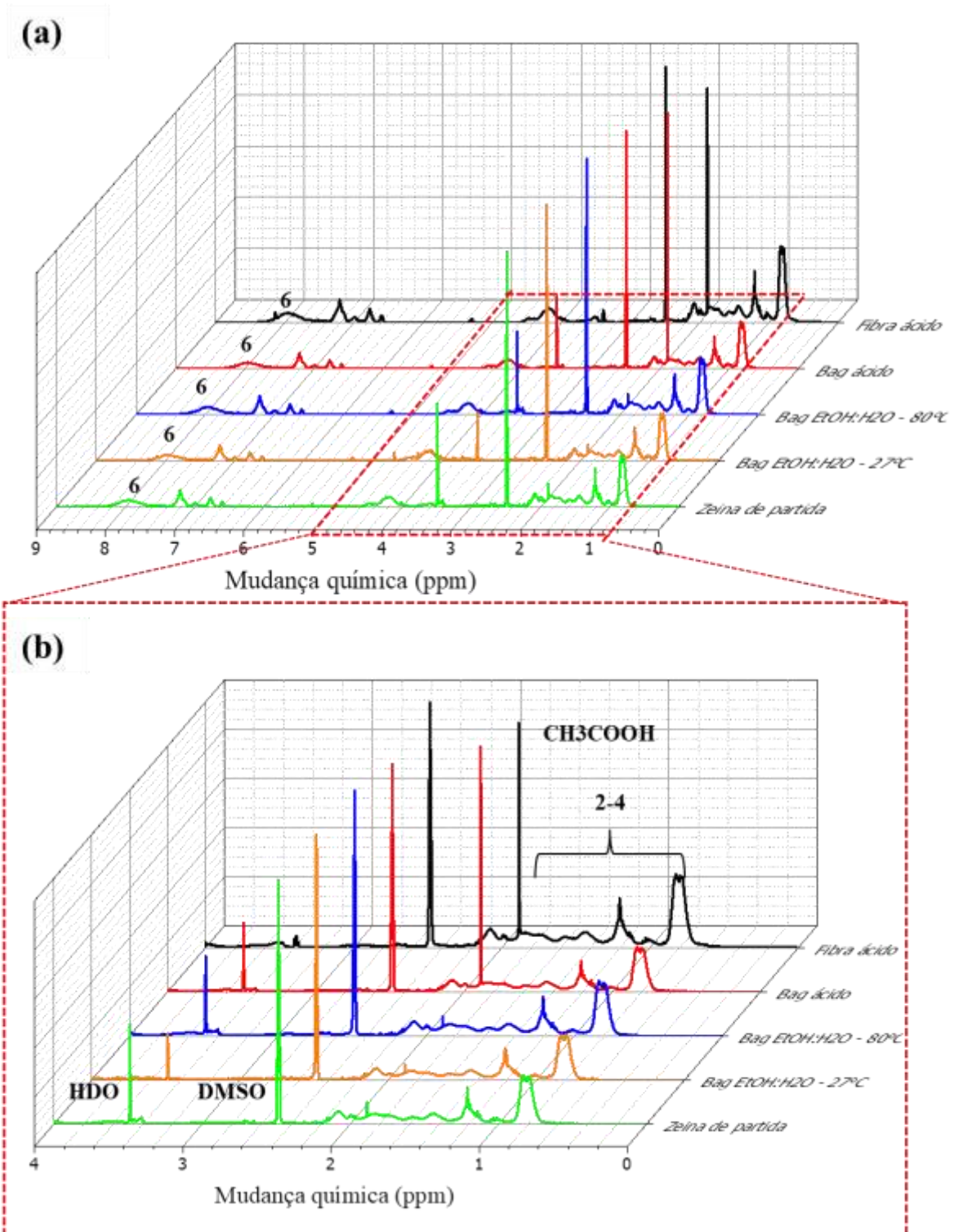
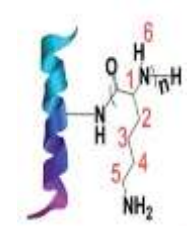


FIGURA 2.11 - Espectros de RMN ^1H para estruturas de zeínas obtidas por SB-Spinning. (a) espectro completo e (b) espectro em destaque para a região de 4 – 0 ppm.

TABELA 2.4- Grupos químicos observados por RMN ^1H ⁹⁵.

	Indicação na figura	Deslocamento químico (ppm)	Grupos químicos
	2-4	1,2	CH_2
	5	2,9	CH_2 (da amina secundária)
	6	8,0	NH_2

A FIGURA 2.12 apresenta o gráfico dos espectros de FTIR das diferentes estruturas de zeína obtidas. Nele encontram-se as bandas características ^{65,95} da zeína referente às amidas A (3287 cm^{-1}), I (1641 cm^{-1}), II (1525 cm^{-1}) e III (1232 cm^{-1}), porém não se observa nenhuma diferença significativa entre os espectros. Como trabalho futuro, sugere-se realizar o estudo detalhado da amida I.t. A banda da amida I está relacionada, principalmente, ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ presente na ligação peptídica, sendo este sensível às mudanças nas conformações das estruturas secundárias. A banda referente à amida II está relacionada ao estiramento e dobramento da ligação CN e NH , respectivamente. Por fim, a banda larga relacionada à amida A está atrelada principalmente ao estiramento do grupo NH ^{65,96}.

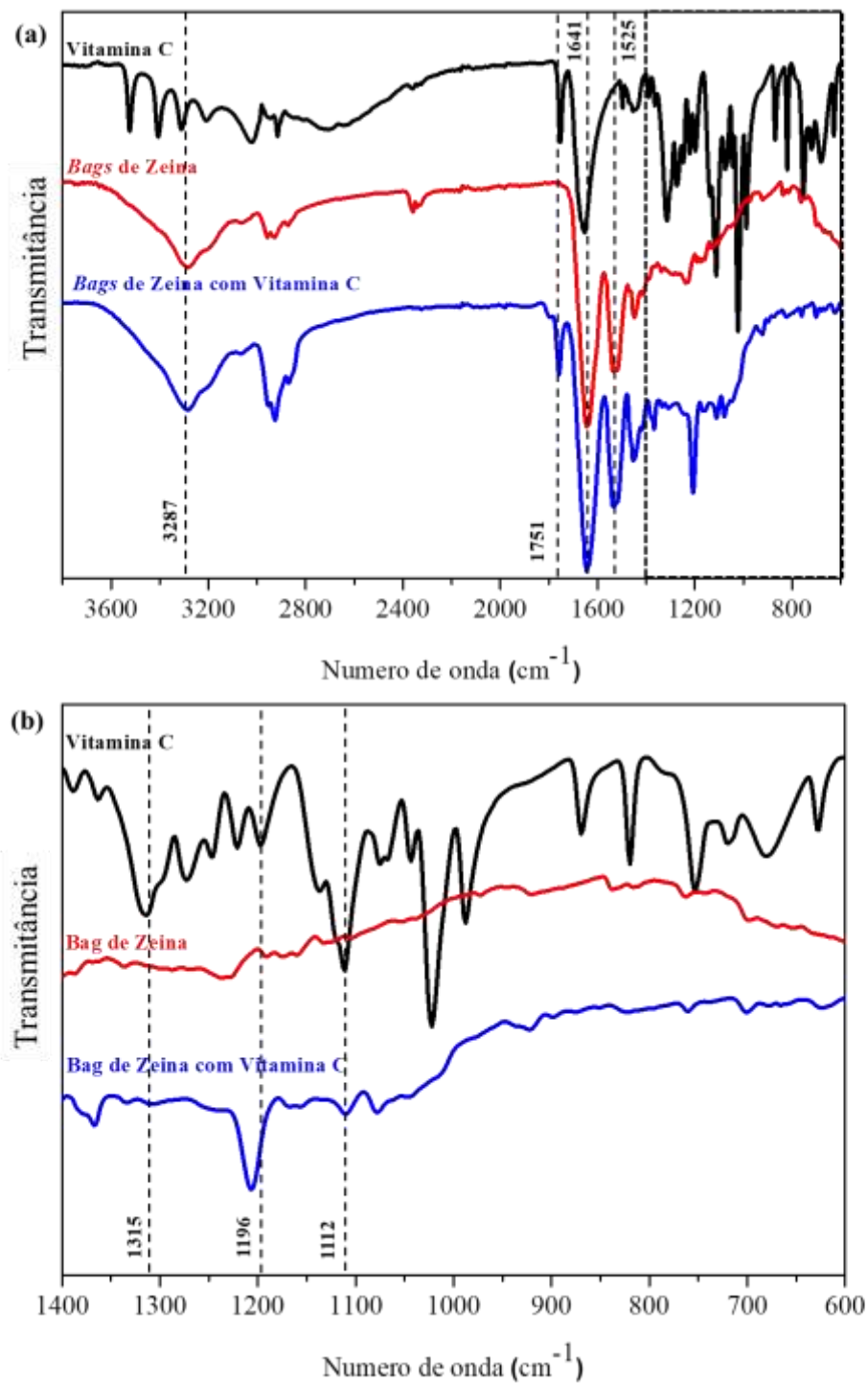


FIGURA 2.12- Espectros de FTIR para as estruturas de zeína obtidas por fiação por sopro em solução, por meio de diferentes solventes e temperatura de solubilização.

Na FIGURA 2.13 é apresentado o difratograma de raio X das amostras que foram selecionadas após o estudo de algumas variáveis do processo e da solução, onde observa-se dois picos de difração, em $9,1^\circ$ e $20,2^\circ$. Nota-se que a cristalinidade das amostras não se alterou com a mudança de solvente, mas observa-se que as fibras possuem uma maior cristalinidade, oriunda do processo de estiramento durante o processo de fiação, diferentemente do que ocorre com as *bags*.

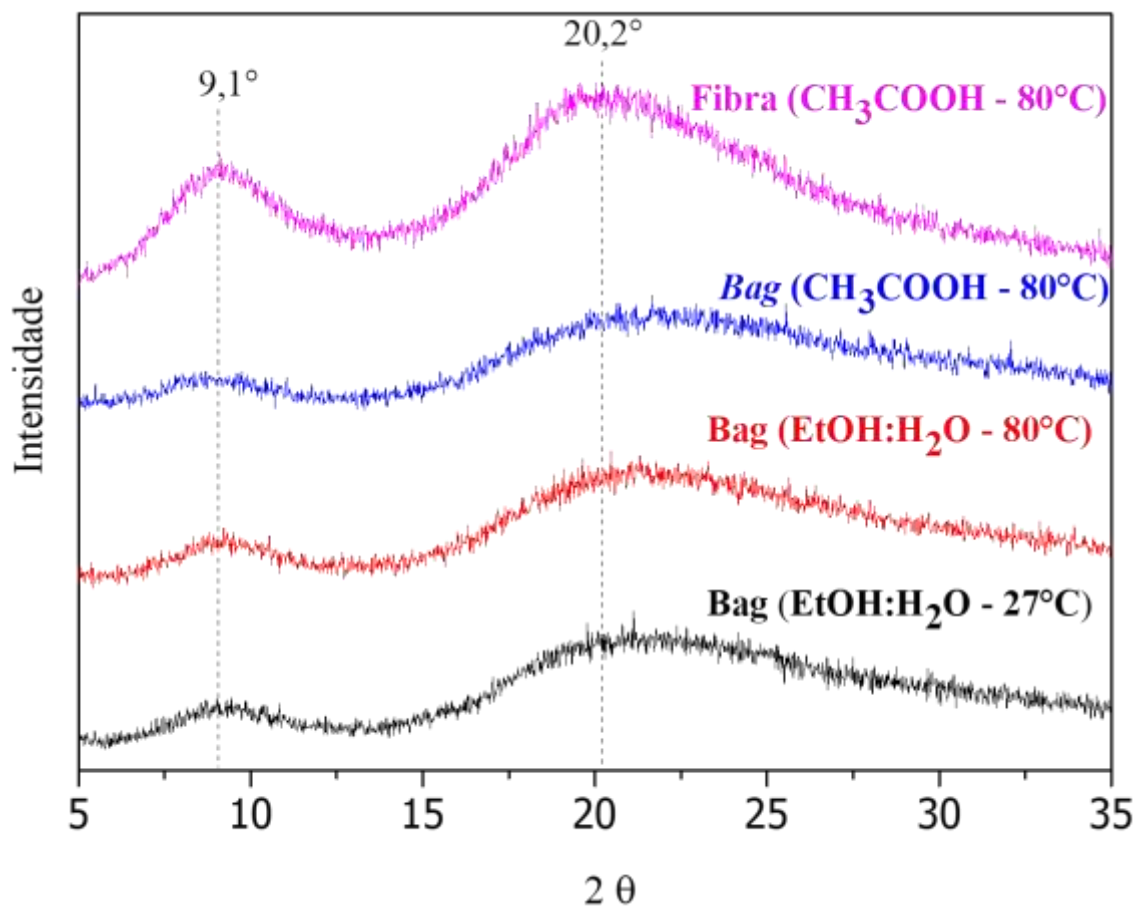


FIGURA 2.13 - Espectro de difração de raio X para as amostras de diferentes estruturas de zeína obtidas pela técnica de fiação por sopro em solução.

2. 4. 3 - Caracterização reológica das soluções contendo zeínas

O estudo reológico das soluções empregadas para obtenção das estruturas de zeínas foi realizado com diversas concentrações (1; 4; 7; 10; 13; 16; 18; 21; 24; 27; 30; 40 e 50% m/v), para ambos os solventes (ácido acético e solução etanólica 80%). Duas avaliações reológicas foram estudadas: sistema rotacional e sistema oscilatório. Tais estudos são importantes por contribuírem no entendimento da formação das *bags* e fibras, pois por meio destas análises é possível verificar o comportamento da viscosidade em relação à concentração da solução, a qual influencia na obtenção de diferentes estruturas pela técnica fiação por sopro em solução.⁴⁸

Para o estudo reológico em modo rotacional, as viscosidades foram avaliadas a uma taxa de cisalhamento fixa de $1s^{-1}$ a 25 °C. Na FIGURA 2.14 é apresentado o gráfico do comportamento do fluido, por meio do índice de pseudoplasticidade, em relação ao aumento da concentração da solução polimérica, para as soluções à base de ácido acético e solução etanólica 80%. Os fluidos poliméricos podem possuir algumas características de acordo com a faixa estabelecida do índice de pseudoplasticidade; sendo assim quando este for igual à 1 ($n=1$) temos um comportamento de fluido newtoniano, e para valores menores que 1 ($n < 1$) e maiores que 1 ($n > 1$) temos comportamento de pseudoplástico e dilatante, respectivamente^{94,97}. Dessa forma, a análise da FIGURA 2.13 demonstra que para ambos solventes, as soluções possuem comportamento de fluidos newtonianos, se distanciando levemente desta característica em concentrações mais altas (acima de 50%).

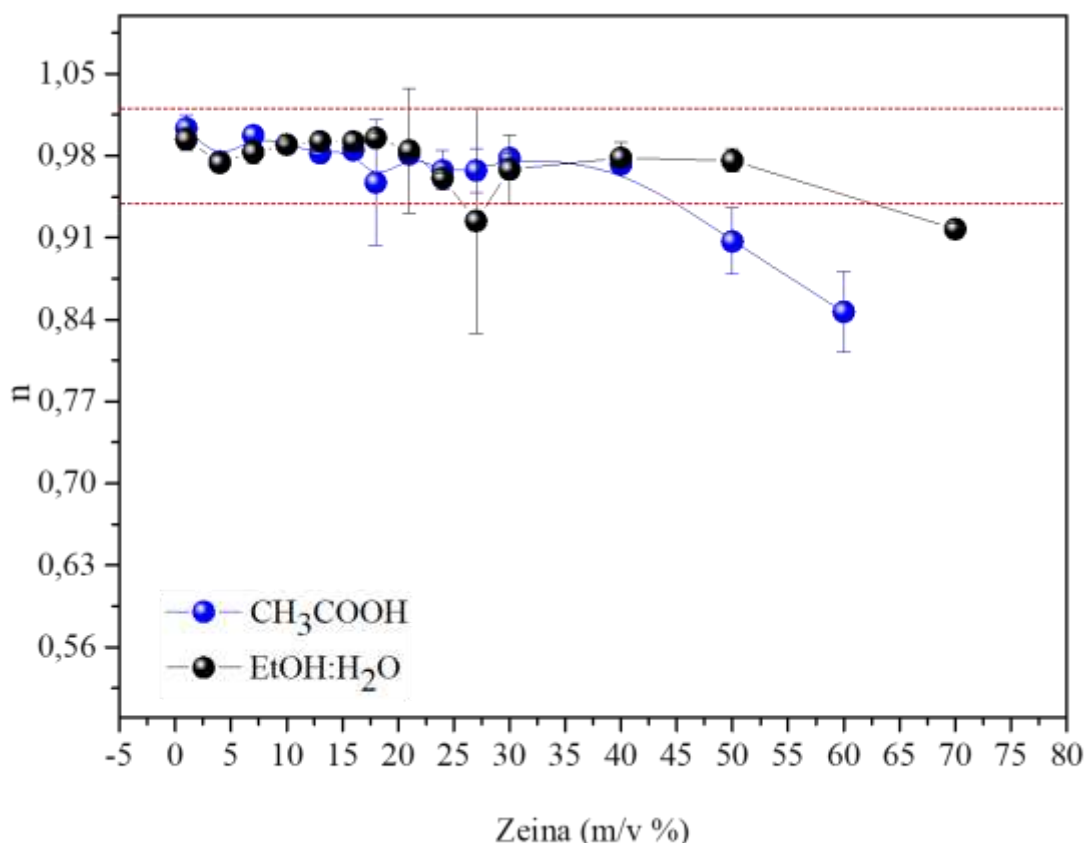


FIGURA 2.24 - Índice de pseudoplasticidade em função da concentração de zeína, para os solventes ácido acético e solução etanólica 80%.

Outro ponto relevante é a análise dos regimes de diluição das soluções poliméricas. Quando se tem um fluido com comportamento newtoniano, ao aumentar a concentração da solução polimérica, a viscosidade dinâmica tende a aumentar linearmente. Na FIGURA 2.15 é mostrado o gráfico com os diferentes regimes de diluição das soluções poliméricas, os quais foram determinados pela diferença de inclinação da curva de tendência (coeficiente angular da equação da reta).

Na FIGURA 2.15-a é apresentado os regimes de diluição para as soluções preparadas com ácido acético, na qual temos a presença de três regimes de diluição: diluído (0,00141), semidiluído (0,05763) e concentrado (0,18455). Para as soluções obtidas com solução etanólica 80% (FIGURA 2.13-b) também

foram observados três regimes de diluição: diluído (0,00104), semidiluído (0,01011) e concentrado (0,02125). A transição do regime diluído para o semidiluído ocorreu em torno de 27 % e 20% m/v de zeína para ácido acético e solução etanólica, respectivamente. Essa transição pode ser caracterizada pelo início do emaranhamento das cadeias poliméricas, podendo caracterizar a concentração crítica para início do processo de fiação. A transição do regime semidiluído para o concentrado ocorreu em 50% m/v de zeína para ácido acético e, para a solução etanoica por volta de 40% m/v. Este ponto indica o início de um elevado grau de emaranhamento das cadeias poliméricas, no qual pequenos aumentos na concentração de zeína aumentam significativamente a viscosidade das soluções, evidenciados pela inclinação mais acentuada da reta. Porém, ao compararmos os gráficos de regimes de diluição para as soluções de ambos os solventes, nota-se que o aumento da concentração da solução gera um aumento da viscosidade mais pronunciado quando esta é obtida com ácido acético.

Para as soluções obtidas com a solução etanoica é observado que a concentração afeta a viscosidade da solução de modo acentuado. No regime semidiluído as soluções obtidas com ácido acético possuem maior viscosidade do que as mesmas concentrações com solução etanoica. Tal fato é resultado da interação de ambos os solventes com a zeína durante o processo de dissolução. A literatura relata ⁷⁹ que o ácido acético solubiliza melhor a zeína, pois é capaz de protonar alguns grupos dos aminoácidos das zeínas mais rapidamente do que a solução etanoica. O grupo hidroxila (-OH) da carboxila do ácido acético é facilmente desprotonável em relação ao grupo hidroxila característico do álcool, resultando em uma melhor solubilidade da zeína em ácido (FIGURA 2.15) ⁷⁹.

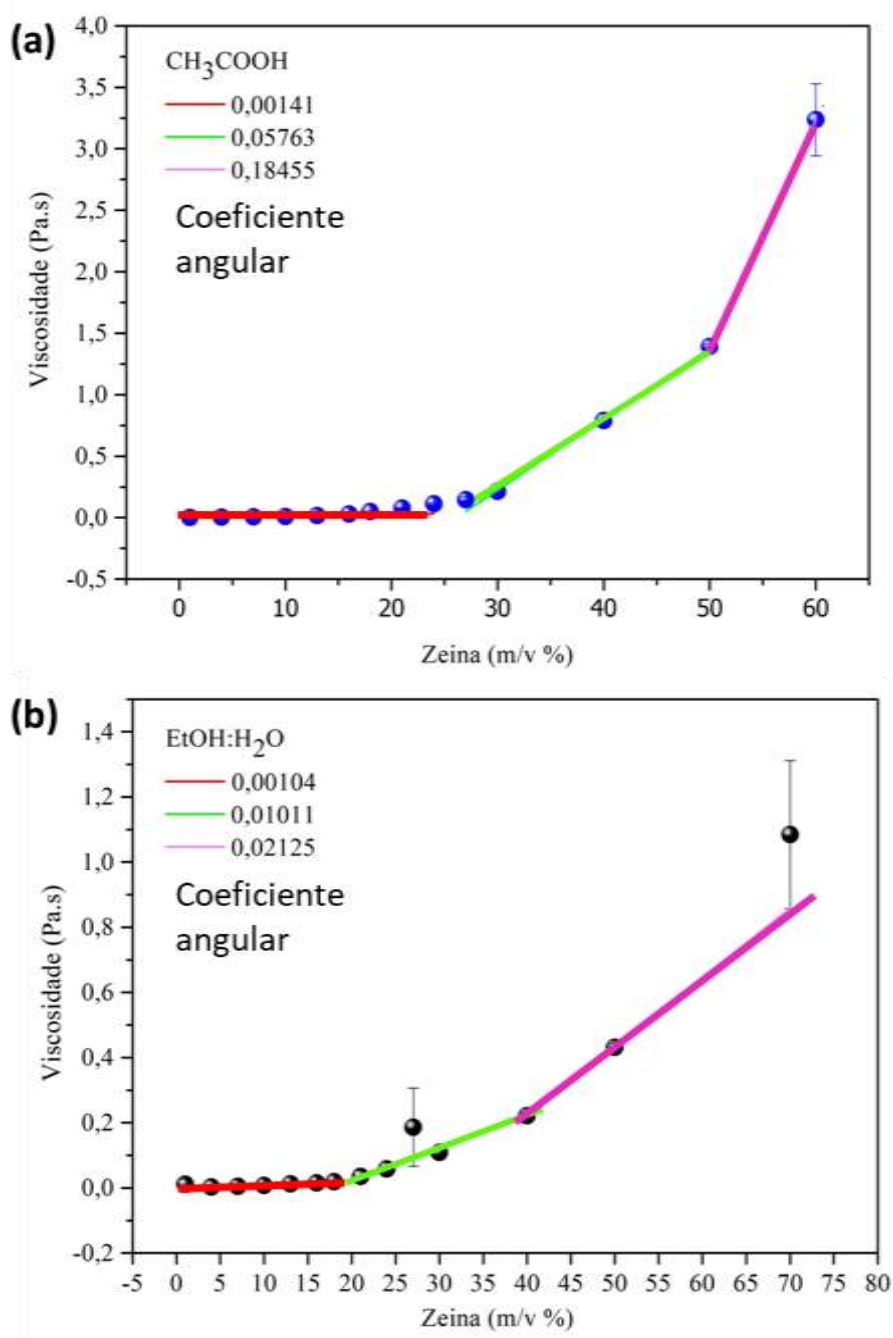
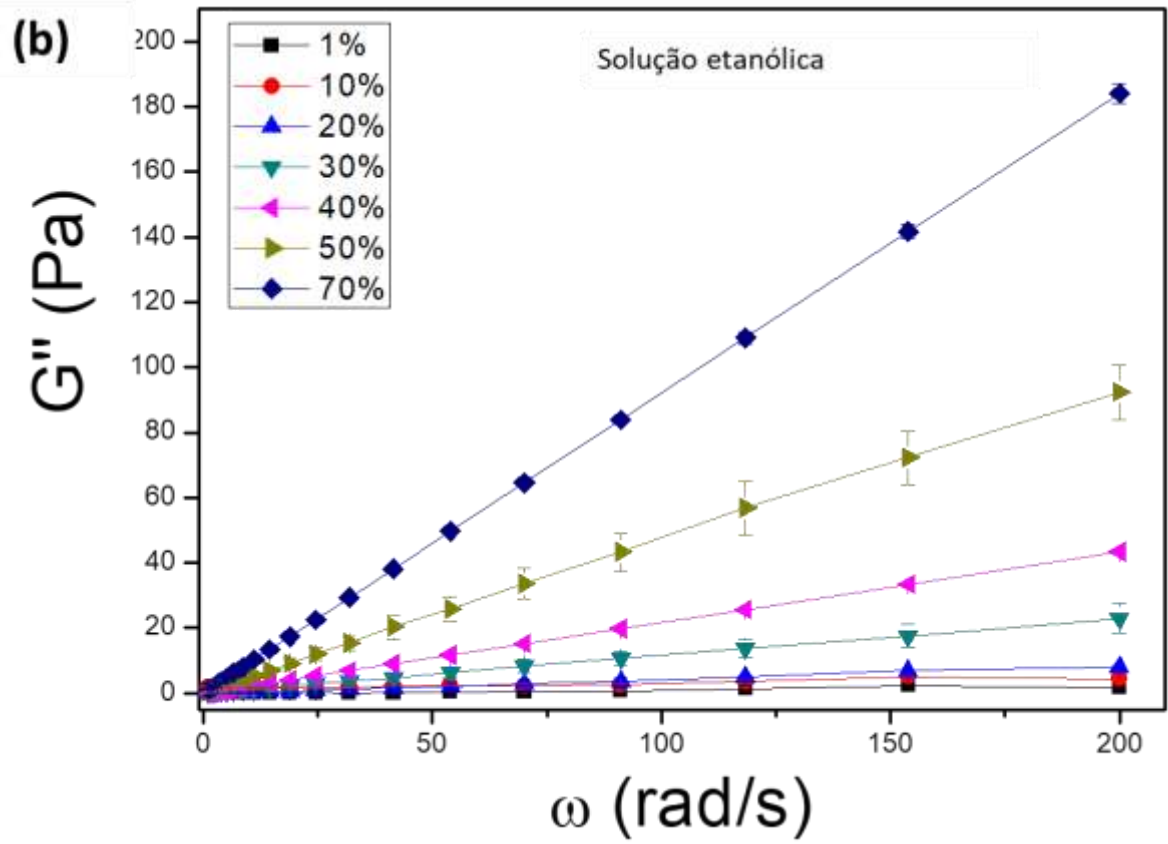
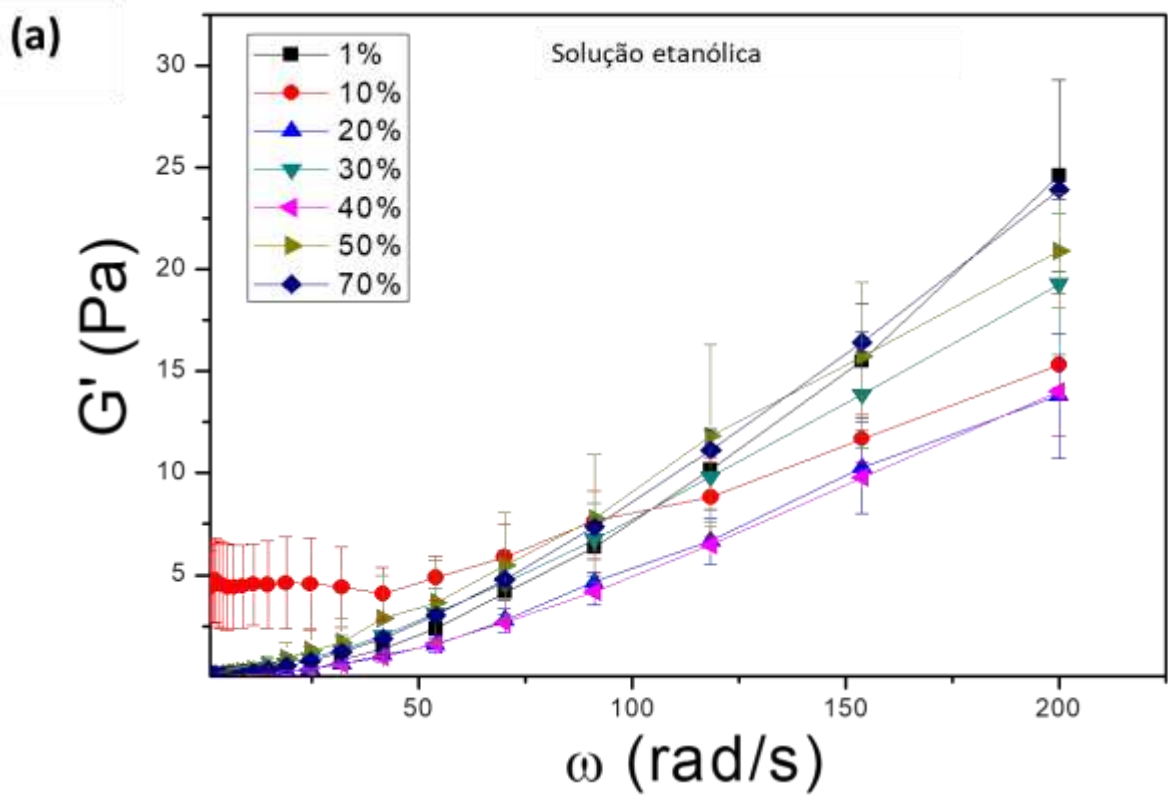
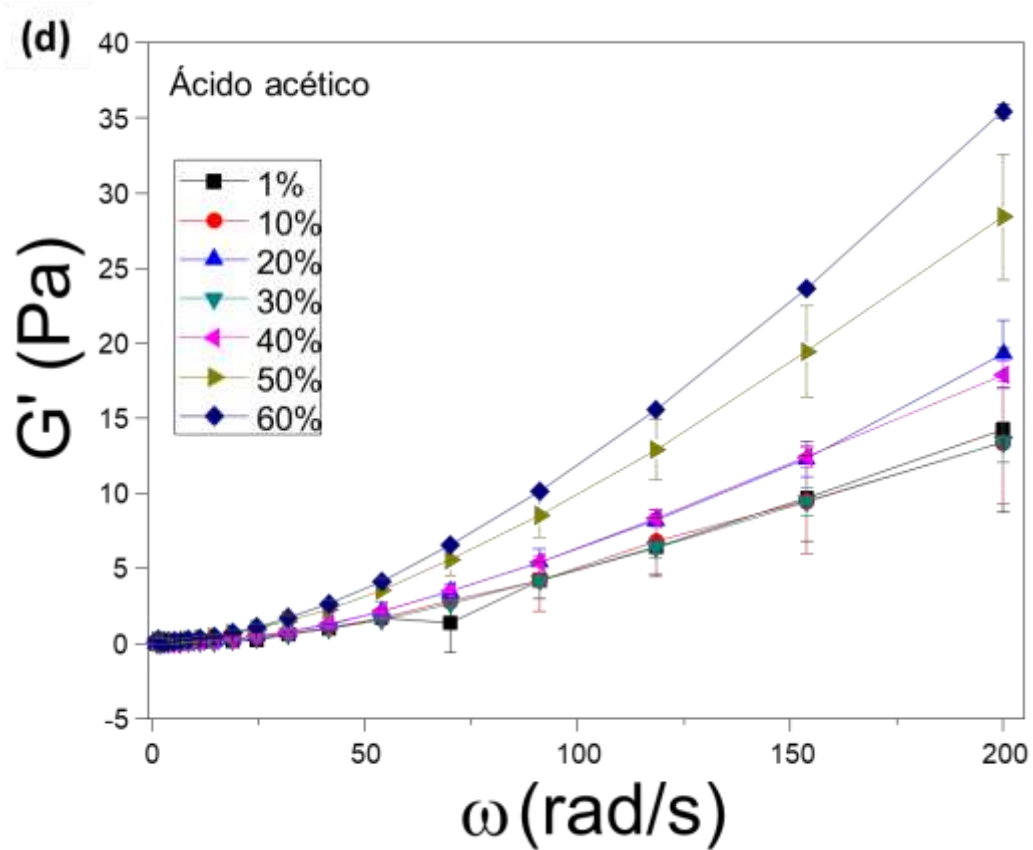
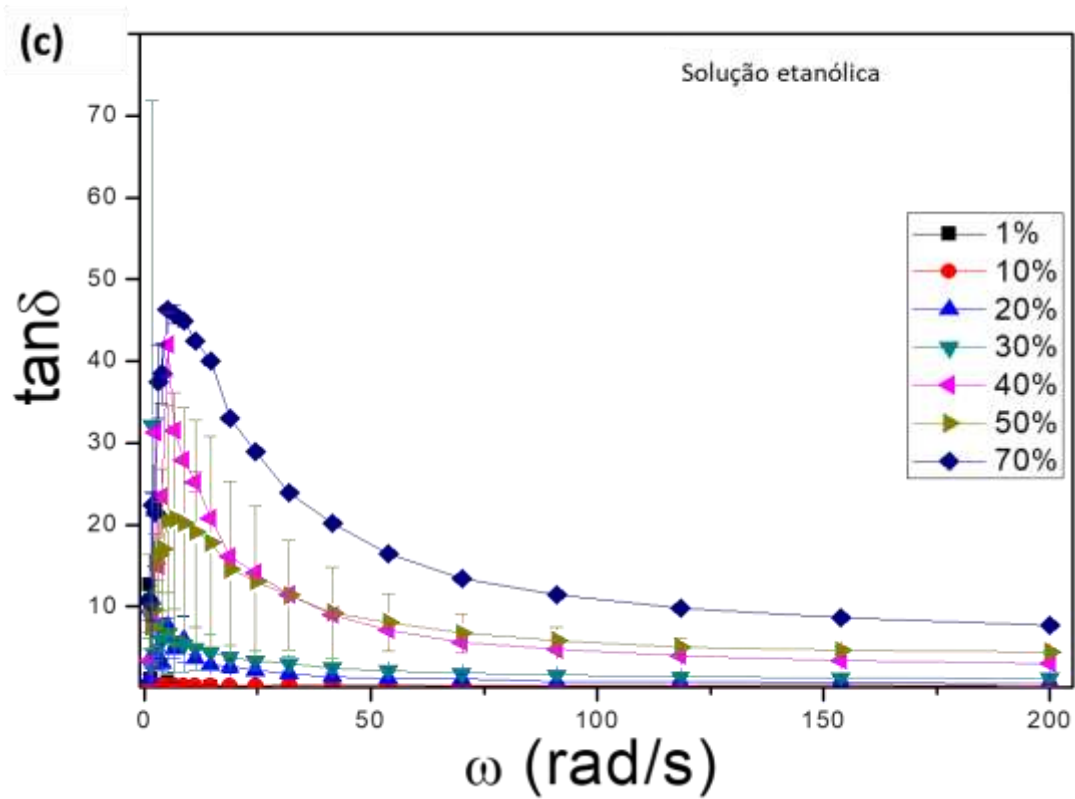


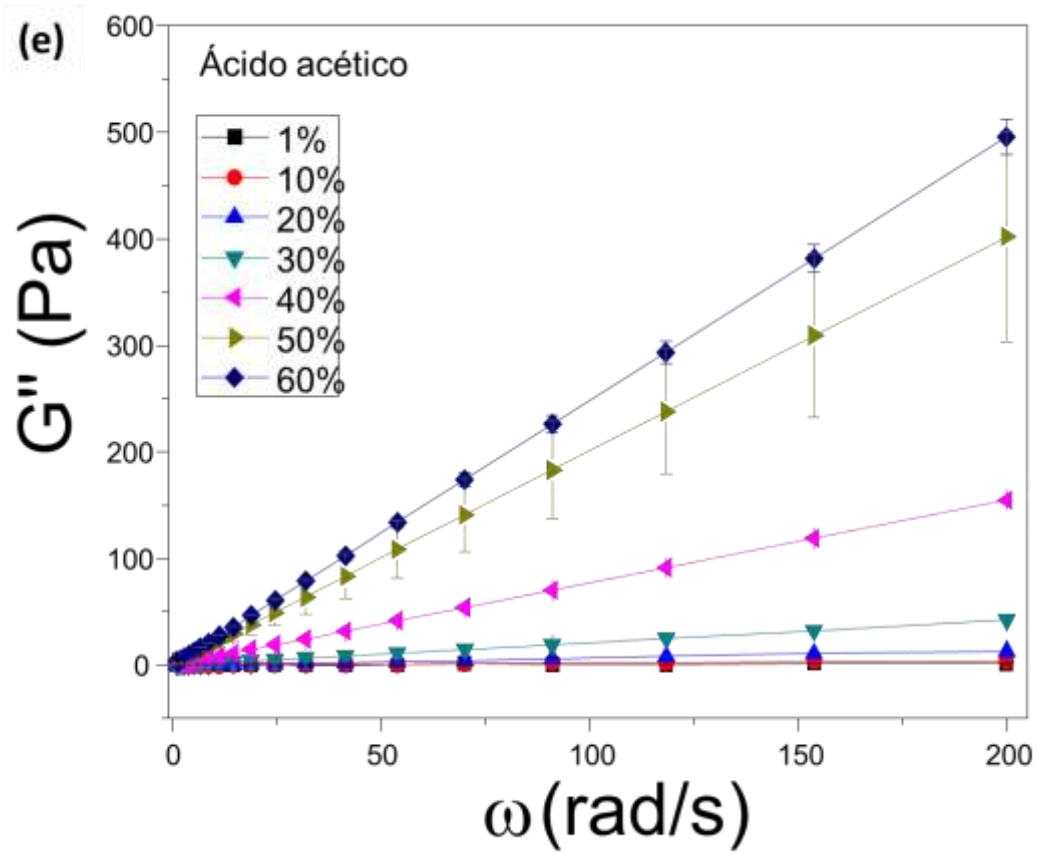
FIGURA 2.34 - Viscosidade dinâmica ($n = 3$) em função da concentração de zeína. (a) com ácido acético e (b) solução etanólica 80%. Os valores apresentados na parte superior esquerda do gráfico referem-se à inclinação das retas.

O ensaio reológico oscilatório traz informações sobre o comportamento elástico (G') e viscoso (G'') das soluções poliméricas. Para

melhor verificação do efeito do comportamento elástico e viscoso em relação à concentração das soluções, foi analisado o valor de $\tan\delta$, o qual corresponde à razão entre G'' e G' ($\tan\delta = G''/G'$)^{94,97}. Assim, a FIGURA 2.15 apresenta os gráficos de $\tan\delta$, G' e G'' para as soluções preparadas por ambos solventes. Na FIGURA 2.15-a observa-se que G' aumenta ligeiramente com a concentração, mas não há tendência clara. O aumento de G' com a frequência indica uma estrutura com mobilidade (típico de líquido e géis fracos)^{94,97}. O mesmo comportamento é observado para as soluções obtidas com ácido acético (FIGURA 2.15-d).







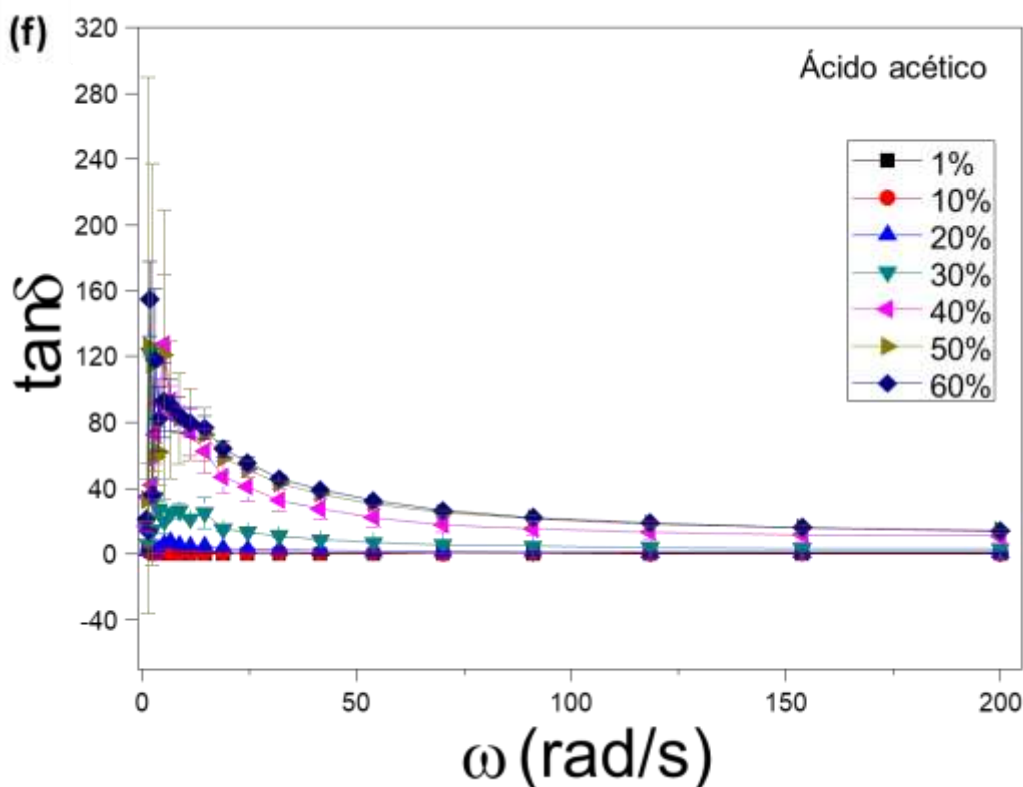


FIGURA 2.4 - Ensaio de reologia oscilatória. Módulo de armazenamento G' (componente elástica) médio ($n = 2$) em função da frequência de oscilação das soluções de zeína (a) para solução etanólica e (d) para ácido acético; Módulo de perda G'' (componente viscosa) médio ($n = 2$) em função da frequência de oscilação das soluções de zeína (b) para solução etanólica e (e) para ácido acético; $\tan\delta$ ($\tan\delta = G''/G'$) médio ($n = 2$) em função da frequência de oscilação das soluções de zeína (c) para solução etanólica e (f) para ácido acético.

A análise do comportamento do módulo viscoso para ambos os solventes (FIGURA 2.15 – b e c) demonstra uma tendência mais clara, pois quando G'' aumenta com a frequência, tem-se um comportamento típico de líquido e géis fracos, ou seja, a estrutura possui certa mobilidade. Ao se comparar o comportamento de G'' e G' observa-se que, em geral, G'' possui um valor superior em relação ao G' , o que confere as soluções um comportamento

mais de líquido que sólido para todas as concentrações. Tal evidência é melhor observada quando se analisa o gráfico de $\tan\delta$ ($\tan\delta = G''/G'$).

Na FIGURA 2.15 c - f é apresentado o gráfico de $\tan\delta$ em relação às diferentes concentrações das soluções de zeína para solução etanólica e ácido acético, respectivamente. Observa-se que há uma boa correlação do aumento do $\tan\delta$ com a concentração das soluções para ambos os solventes. $\tan\delta$ diminui com a frequência, porém apenas para as soluções de 1 e 10% os valores são abaixo de 1, confirmando o comportamento mais de líquido que sólido para concentrações acima de 10%.

Visando à comparação de ambos os sistemas, o valor de frequência angular em 10 Hz foi fixado e então avaliado o valor de $\tan\delta$ em função das concentrações das soluções poliméricas para ambos os solventes (FIGURA 2.16). Observa-se que o sistema possui um comportamento mais pronunciado de líquido do que de sólido para concentrações acima de 1%. Além disso, observa-se que os valores de $\tan\delta$ são bem maiores para as soluções obtidas com ácido acético, o que demonstra que tal solvente possui melhor interação com a zeína, o que também foi observado na FIGURA 2.14⁷⁹.

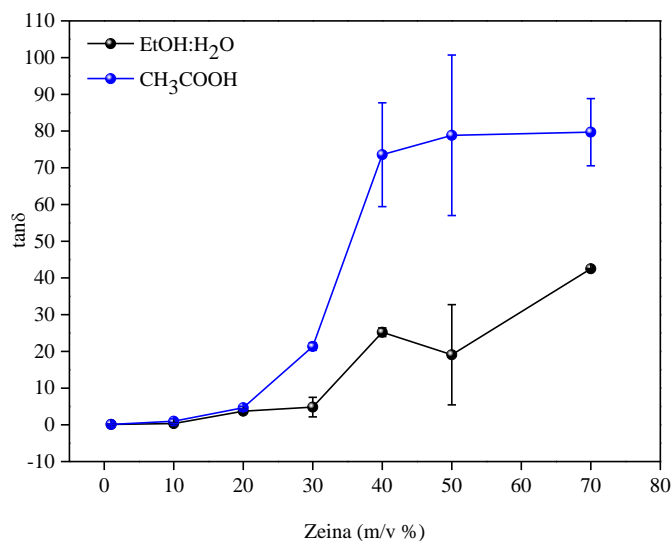


FIGURA 2.5 - Gráfico de $\tan\delta$ em função das diferentes concentrações de soluções poliméricas, para ácido acético e solução etanólica 80%.

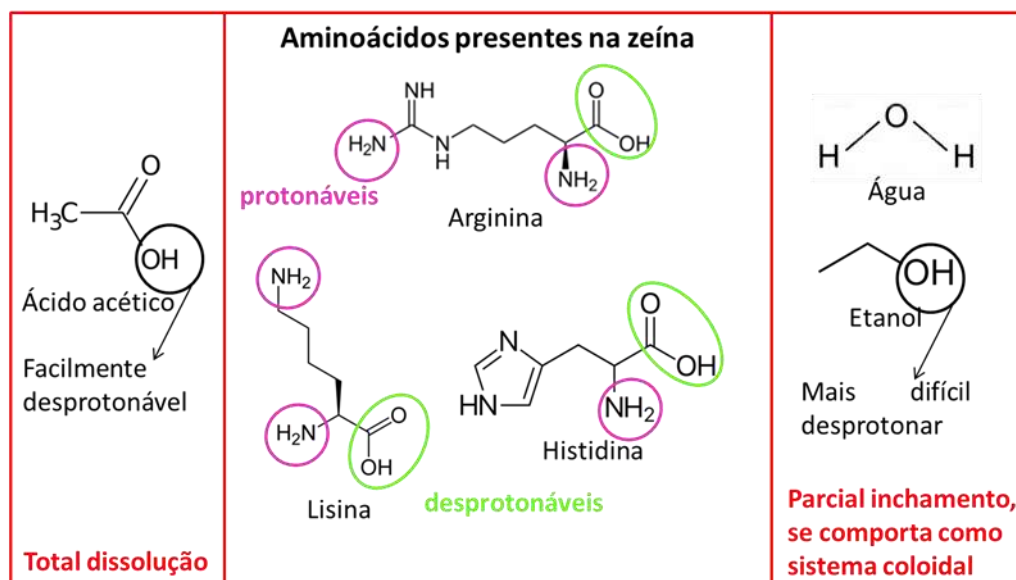


FIGURA 2.16 - Grupos protonáveis e desprotonáveis da zeína e dos solventes água, etanol e ácido acético.

Como consequência, a obtenção de *bags* e fibras para ambos os solventes está relacionado aos parâmetros experimentais da técnica fiação por sopro em solução, assim como ao perfil reológico das soluções poliméricas.

Oliveira e colaboradores⁴⁸ relatam que, para FSS, uma alta viscosidade da solução polimérica diminui a segregação das moléculas de solvente, o que ocasiona uma maior interação entre as moléculas de solvente e as cadeias poliméricas. Desta forma, quando a gota polimérica, presente na ponta da agulha, é estirada pela influência das forças de arraste do ar comprimido, as moléculas do solvente não se aglomeram com o emaranhado de cadeias poliméricas da solução, o que resulta em uma menor tendência de formação de partículas. Porém, vale ressaltar que algumas soluções, mesmo se encontrando no regime diluído, não favorecem a formação de fibras, conforme observado para as soluções poliméricas baseadas em solução etanoica. Yu e colaboradores⁹⁸ demonstraram em seu trabalho que a elasticidade da solução polimérica (viscosidade extensional) não está totalmente atrelada aos emaranhamentos poliméricos da solução; desta forma pode-se obter fibras uniformes quando a solução polimérica possui resposta elástica suficientemente forte, mesmo que estas estejam em regime diluído.

Desta forma, ao se buscar a formação de *bags* por fiação por sopro em solução, é necessário que a solução polimérica se encontre em regime diluído ou início de regime semidiluído, o que não garante que a viscosidade extensional durante todo o estiramento seja alta, gerando a instabilidade do jato⁴⁸. Já a formação de fibras se intensifica quando temos soluções poliméricas em regimes semidiluídos. Porém, soluções em regimes concentrados tendem a produzir fibras com morfologias diferentes^{45,46,48} quando se formam, e obstruem o orifício da agulha impossibilitando a passagem da solução polimérica.

2.5 - CONCLUSÃO PARCIAL – CAPÍTULO 2

A formação de diferentes estruturas de zeína pela técnica de fiação por sopro em solução mostrou-se promissora como uma rota alternativa para obtenção de partículas (*bags*) e fibras. Tal resultado é interessante, pois estende

ainda mais a possibilidade de aplicação *in situ* das estruturas de zeínas, seja para liberação lenta como também para engenharia de tecidos.

Sobre a avaliação dos parâmetros referentes à solução, conclui-se que o aquecimento a 80°C das soluções preparadas com solução etanólica e com ácido não afetam efetivamente as estruturas secundárias da zeína. Porém, o uso de soluções etanólicas possibilitou o maior estiramento das gotas poliméricas durante o processo de fiação. Já para as soluções com ácido acético, tal processo diminuiu a viscosidade da solução e conseqüentemente não houve melhora no estiramento da gota.

Em relação à concentração polimérica, conclui-se que seu aumento acarreta em uma maior possibilidade de formação de fibras de zeína. Contudo, mesmo em concentrações altas, não foi possível obter fibras de zeína com solução etanólica. Assim, a formação de fibras somente ocorreu para as soluções de ácido acético, devido à melhor interação deste com a zeína. Já a formação de *bags* foi obtida para ambos os solventes, ácido acético e solução etanólica 80%.

CAPÍTULO 3 – MICRO/NANOESTRUTURAS DE ZEÍNAS COM VITAMINA C INCORPORADA

3.1 - CONTEXTUALIZAÇÃO E MOTIVAÇÃO

De acordo com SCHULTER ⁹⁹, o crescimento populacional mundial gera grande preocupação em relação à segurança alimentar e sustentabilidade ambiental, constituindo-se como um dos principais desafios a serem enfrentados nas próximas décadas. O Brasil (FAO 2016) é um dos principais países produtores de carne bovina, suína e de frango, porém ainda possui pouca produtividade em relação à produção de pescado, mesmo possuindo uma grande área hídrica. A piscicultura ganha cada vez mais destaque no cenário mundial, visto que animais aquáticos possuem um alto valor nutricional com baixo teor de gordura, além de serem fonte de ômega, suprindo alguns nutrientes que não são encontrados em outras carnes ⁶². O Brasil não está entre os maiores produtores de pescado, mas em 2015 houve um crescimento de aproximadamente 1,5% na produção de pescado, em relação ao ano de 2014. Dados apresentados pela Embrapa (2017) informam que, dentre as espécies comumente cultivadas no país, a tilápia vem se destacando no consumo interno e como mercadoria de exportação. A expansão da piscicultura para ambos os tipos de viveiros (escavados e tanque-rede) pode gerar inúmeros benefícios econômicos e de mercado de trabalho no país. Um aspecto bastante relevante na piscicultura se refere à nutrição animal (manejo alimentar), na qual rações específicas vem sendo desenvolvidas para garantir maior desempenho no crescimento e na reprodução do animal ^{62,63,100-102}.

A produção de pescado por meio do cultivo em tanque-rede requer maior cuidado e eficiência em relação à nutrição dos peixes, visto que a única fonte de nutrientes é restrita a rações. Sendo assim, a eficiência da alimentação e

reprodução vê-se norteadas pela qualidade nutricional essencial para o metabolismo eficiente do peixe. Diversos são os relatos de problemas caracterizados pela deficiência de vitaminas e minerais na alimentação de pescados. Nesse cenário, Dawood e colaboradores¹⁰³ avaliaram a importância de nano partículas de selênio como complementação de rações para peixes (*Pagrus major*), tendo como resultado que a administração destas melhora sua resposta imune e resistência ao estresse quanto a salinidade do ambiente aquático. SALARO¹⁰⁴ aborda em seu trabalho a importância da suplementação alimentar de trairão juvenil com vitamina C. Os resultados obtidos demonstraram que a vitamina C não causou deformidades ósseas e não ajudou no perfil de crescimento do animal, porém influencia na produção de ácidos graxos importantes em diversas etapas metabólicas. Dawood⁶³ em seu *review* destaca alguns trabalhos que demonstraram danos em animais aquáticos por déficit de vitaminas. Um dos exemplos que este aborda é a deformidade de alguns bagres por deficiência de vitamina C.

A FIGURA 3.1 aborda o ciclo metabólico referente ao desenvolvimento ósseo de peixes, mostrando a importância das vitaminas em diversas atividades. A vitamina C possui funções importantes relacionadas ao crescimento, formação da matriz óssea, além de ajudar no funcionamento do sistema imunológico, e não é sintetizada por grande parte das espécies^{63,104-106}. Nesse contexto, a suplementação de rações com vitaminas e minerais, em especial com a vitamina C, é crucial para o desenvolvimento da produção e qualidade do pescado.

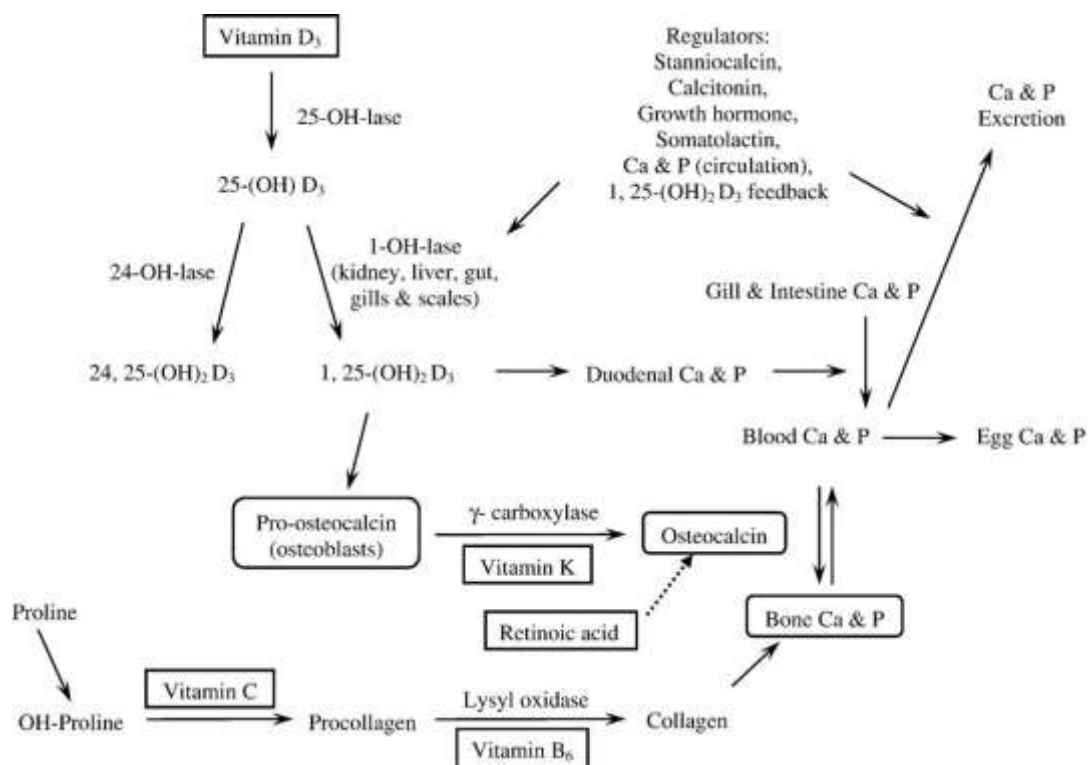


FIGURA 3.1- Funções metabólicas de peixes - visão da influência de algumas vitaminas. Imagem retirada da ref. ⁶³

Devido à sua instabilidade a mudanças no meio, como pH e temperatura, a vitamina C sofre perdas durante sua incorporação como suplementação e estocagem. Assim, algumas vezes pode ser necessário utilizar do artifício da super-dosagem da vitamina na ração dos animais, visando diminuir estes prejuízos. Como alternativa ao emprego da super-dosagem e visando diminuir perdas relacionadas à vitamina, novas alternativas tecnológicas têm sido buscadas, incluindo a encapsulação de vitaminas, de modo a proteger o material ativo (vitamina C) do meio externo e promover a sua liberação controlada ^{82,107}.

Neste capítulo são apresentados os resultados referentes à utilização das estruturas de zeínas obtidas por FSS como material para incorporação de vitamina C, com potencial aplicação como suplementação de pescados. Vale destacar que, dentre as estruturas obtidas (Capítulo 2), selecionou-se as *bags*

obtidas em temperatura ambiente e com solução etanoica como material para a incorporação da vitamina. Tal escolha está baseada em alguns pontos: (i) a solução etanólica é um solvente de menor custo em relação ao ácido acético além de ser menos agressivo ao meio ambiente; (ii) a realização do processo de solubilização na temperatura ambiente evita o aceleração da degradação da vitamina C¹⁰⁸; e (iii) as *bags*, foram escolhidas por serem uma estrutura menos estudada na literatura que as fibras para encapsulamento de princípios ativos. As outras estruturas, obtidas com ácido acético, serão avaliadas futuramente, também visando seu emprego como matriz transportadora de materiais ativos.

3.2 – OBJETIVO

Aplicação de *bags* obtidas pela fiação por sopro de soluções etanólicas de zeína como carreadoras de vitamina C visando à liberação deste insumo em meio aquoso para potencial emprego desse sistema como suplementação na piscicultura.

3.3 - MÉTODOS

3.3.1 - Fiação por sopro em solução

A solubilização da vitamina C foi realizada inicialmente em água deionizada (já na quantidade a ser usada para preparo da solução etanólica) e depois foi adicionado o etanol – originando a solução etanoica de 80% com a vitamina C já solubilizada. Posteriormente foi adicionada a zeína e então se vedou o recipiente e esperou a total dissolução (cerca de 1 hora) da zeína, em agitação magnética. A solução foi mantida em temperatura de 27°C. Para a obtenção dessas *bags* usou-se as seguintes condições:

Concentração de zeína (m/v): 24%;

Concentração de vitamina C (m/m): 15%;

Taxa de ejeção da solução polimérica: 0,06mL.min⁻¹;

Pressão do ar comprimido: 50psi;

Distancia de trabalho: 60cm.

3.3.2 - Caracterizações físico-químicas

As caracterizações físico-químicas que foram realizadas estão descritas em detalhes no Capítulo 1.

3.3.3 – Cinética de liberação

A cinética de liberação da vitamina C foi investigada por meio da técnica espectroscópica de absorção na região do ultravioleta visível (UV-Vis), na região espectral de 180 a 1100 nm, sendo avaliada a absorbância em 266/267 nm. Para determinação da quantidade de vitamina liberada, foi levantada uma curva padrão de calibração, baseada nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os experimentos foram feitos em triplicata na temperatura de 25°C. A concentração da vitamina nos meios de liberação foi determinada por meio da curva padrão através da Lei de Lambert Beer ^{82,85,107,109}.

A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada de acordo com o método descrito por Cruz e colaboradores¹⁷ (EQUAÇÃO 1) com algumas modificações. Neste caso, a eficiência de encapsulação foi calculada através da relação descrita na Equação 1.

$$EE(\%) = \frac{m_{AA\text{total}} + m_{AA\text{superficial}}}{m_{AA\text{total}}} * 100 \quad \text{Equação 1}$$

onde $m_{AA\text{superficial}}$ é a massa em $t_0 = 1$ minuto e $m_{AA\text{total}}$ foi obtido pela soma de $m_{AA\text{superficial}}$ com a média das massas de vitamina C no equilíbrio. Os valores usados foram calculados em função da média das medidas feitas em triplicatas.

Para o ensaio de liberação, uma quantidade de 1 mg de *bags* de zeína com vitamina C (*bagVita*) incorporada foi adicionada em um recipiente com 25mL de solução tampão de fosfato pH 7. Foram retiradas alíquotas de acordo com os tempos (*t*) de 1, 5, 10, 15 e 30 minutos; 1, 2, 3, 6, 12 e 24 horas. As alíquotas foram devolvidas no mesmo recipiente após a medição, tomando-se cuidado para não alterar o volume inicial de 25mL. As amostras foram adicionadas em recipiente e local sem exposição à luz.

3.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. Caracterizações físico-químicas

A morfologia das *bags* de zeína antes e após a incorporação da vitamina C foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e são apresentadas na FIGURA 4.2. Nota-se que não houve diferença morfológica entre as *bags* de zeína (FIGURA 3.2- a) com e sem incorporação de vitamina C (FIGURA 3.2- b). Porém o tamanho médio destas apresentou diferença, sendo que ao se incorporar a vitamina observou-se uma diminuição significativa deste tamanho, de $40 \pm 18 \mu\text{m}$ para $25 \pm 9 \mu\text{m}$.

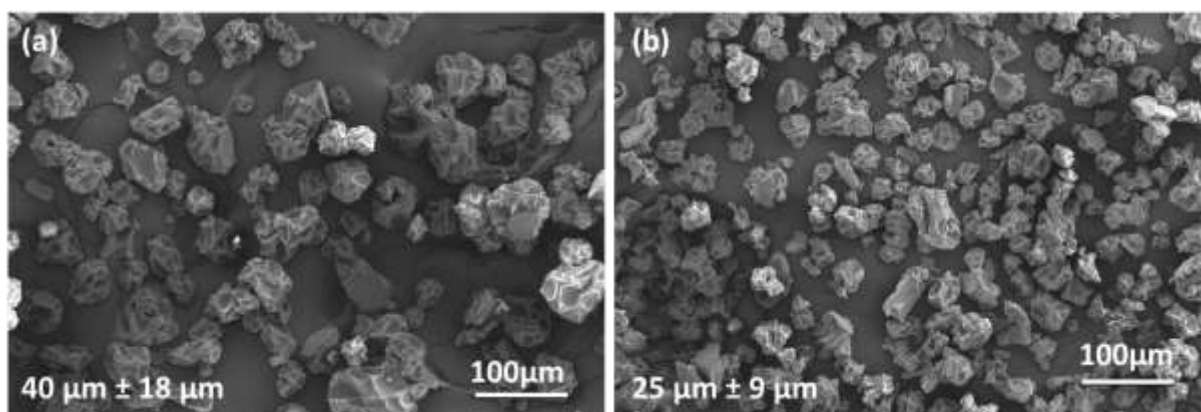


FIGURA 3.2 – Microscopia eletrônica de varredura de estruturas de zeínas produzidas por fiação por sopro em obtidas por meio de soluções de zeínas com solução etanoica 80%. Sistema de bico sólido e temperatura de 27°C (a) Zeína24% (m/v) e (b) Zeína 24% (m/v) com 15% (m/m) de vitamina C.

A diferença de tamanho observada, após a incorporação da vitamina, pode estar relacionada à interação entre os grupos químicos presentes na estrutura química da zeína com a vitamina C. A zeína dissolve-se parcialmente em solução etanoica (ver Capítulo 1), desta forma é possível supor que suas cadeias poliméricas se encontram parcialmente emaranhadas e envoltas por solvente. Ao se incorporar a vitamina C, ocorre uma possível melhora na solubilidade da solução polimérica no sistema etanólico, o quê consequentemente diminui o tamanho das *bags*¹¹⁰.

Foi avaliado se a incorporação da vitamina C na zeína afetou as estrutura secundária característica da zeína. Para tal estudo foi realizado o estudo de dicroísmo circular (CD) e a espectroscopia de ressonância magnética de ¹H. A FIGURA 3.3 mostra os espectros de DC obtidos para as *bags* e para as *bags* com vitamina incorporada, não sendo observada nenhuma variação das estruturas obtidas em relação à incorporação da vitamina. Todas as amostras apresentaram espectros com um pico largo negativo por volta de 228 nm, característico da estrutura secundária α – hélice (TABELA 3.1)^{64,95}.

TABELA 3.1- Ocorrência de estruturas secundárias para “bags” de zeína com e sem incorporação de vitamina C, ambas obtidas por fiação por sopro em solução.

	Zeína partida	"Bags" (EtOH:H₂O) 27°C	"Bags" (EtOH:H₂O) 27°C com Vitamina C
α - hélice	98,4%	99,0%	98,5%

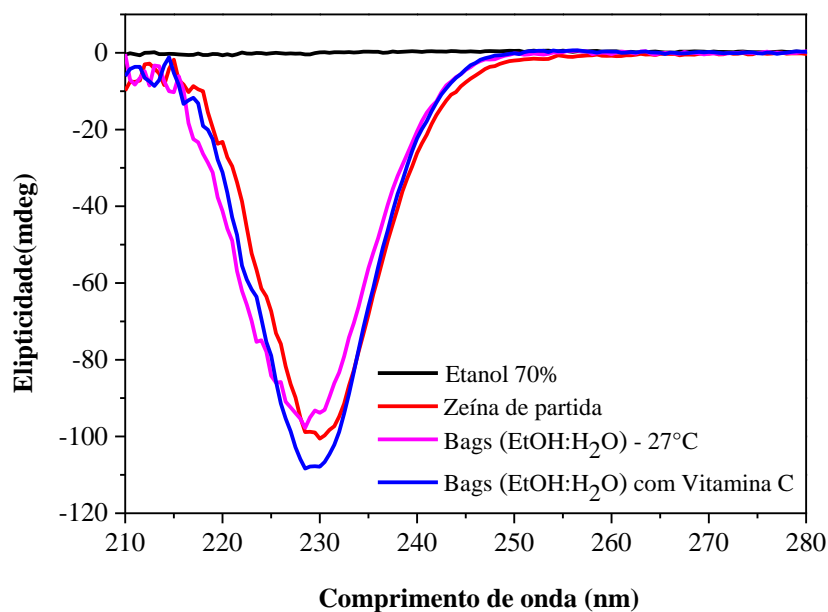


FIGURA 3.3 - Espectros CD das *bags* de zeína com e sem incorporação de vitamina C, ambas obtidas por fiação por sopro em solução.

Na FIGURA 3.4 é mostrado o espectro de RMN de ^1H para *bags* com vitamina C incorporada, o qual evidencia os sinais referentes a grupos químicos presentes na zeína, o quais foram em aproximadamente 8ppm, 2,8 ppm, de 2 a 1ppm (TABELA 4.2). Em virtude da presença da vitamina C e caracterizando a presença desta na amostra, foram observados sinais em 3,7 ppm, 4,5 ppm, e 4,1 ppm (TABELA 3.2) ¹¹¹.

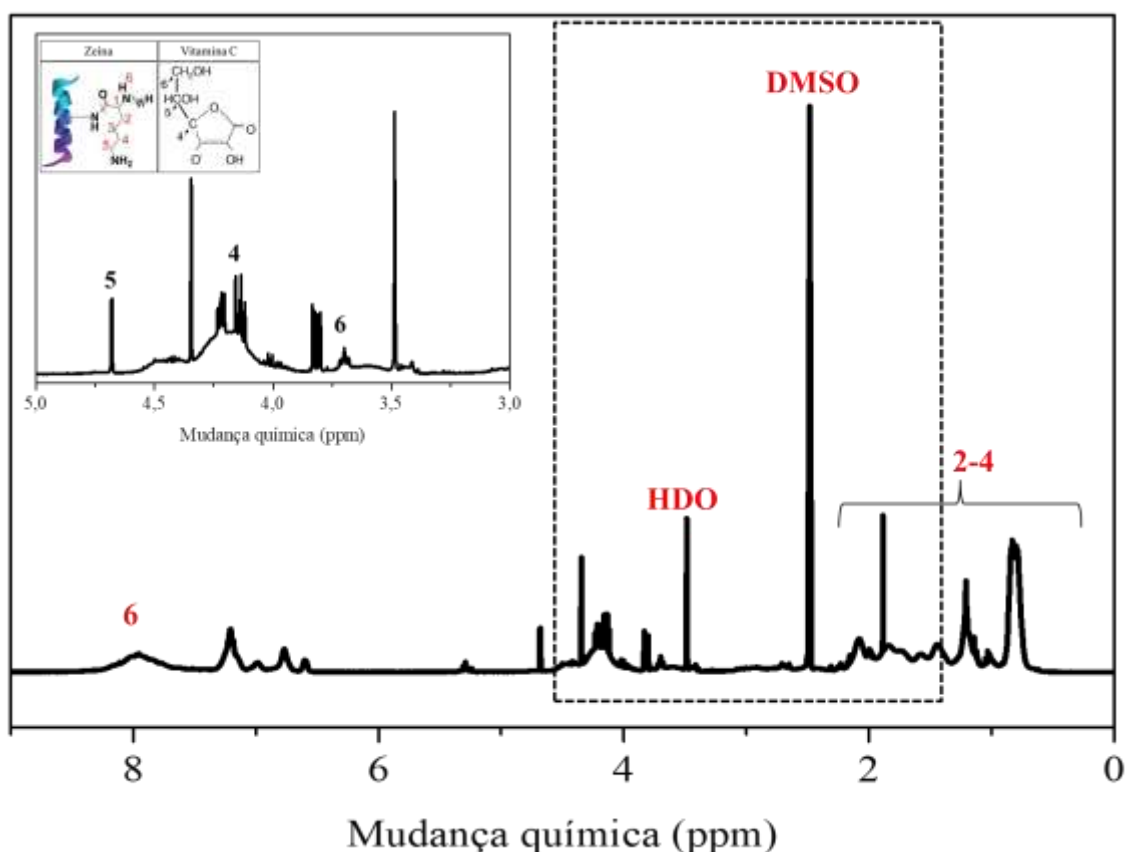


FIGURA 3.4- Espectro de RMN 1H para bags com vitamina C incorporada, obtidas por SB-Spinning e, espectro em destaque para a região de 5 – 3 ppm.

TABELA 3.2- Grupos químicos observados por RMN 1H. Os números que indicam os grupos químicos nas estruturas são apresentados na representação gráfica destas na FIGURA 3.4⁶⁴.

	Indicação na figura	Deslocamento químico (ppm)	Grupos químicos
Zeína	2-4	1,2	CH ₂
	5	2,9	CH ₂ (da amina secundária)
	6	8,0	NH ₂
Vitamina C	6	3,73	CH ₂
	4	4,50	CH (do anel)
	5	4,01	CH

A fim de verificar a presença de vitamina C, assim como possíveis interações que esta pode ter com a zeína, foi realizada espectroscopia de

absorção na região do infravermelho, cujos espectros são apresentados na FIGURA 3.5. No espectro correspondente as *bags* de zeína com vitamina C incorporada foi possível observar bandas correspondentes a zeína, como as bandas referentes às amidas A (3287 cm^{-1}), I (1641 cm^{-1}), II (1525 cm^{-1}), sendo que elas correspondem ao estiramento NH, ao estiramento da ligação C=O presente na ligação peptídica, e ao estiramento e dobramento da ligação CN e NH, respectivamente. Contudo este também apresenta os principais bandas referentes aos grupos C=O da lactona (1641 cm^{-1}), estiramento C=C (1751 cm^{-1}), ao dobramento C-O-H (1315 cm^{-1}) e ao estiramento correspondente C-O-C (1196 cm^{-1}) presentes na vitamina C.

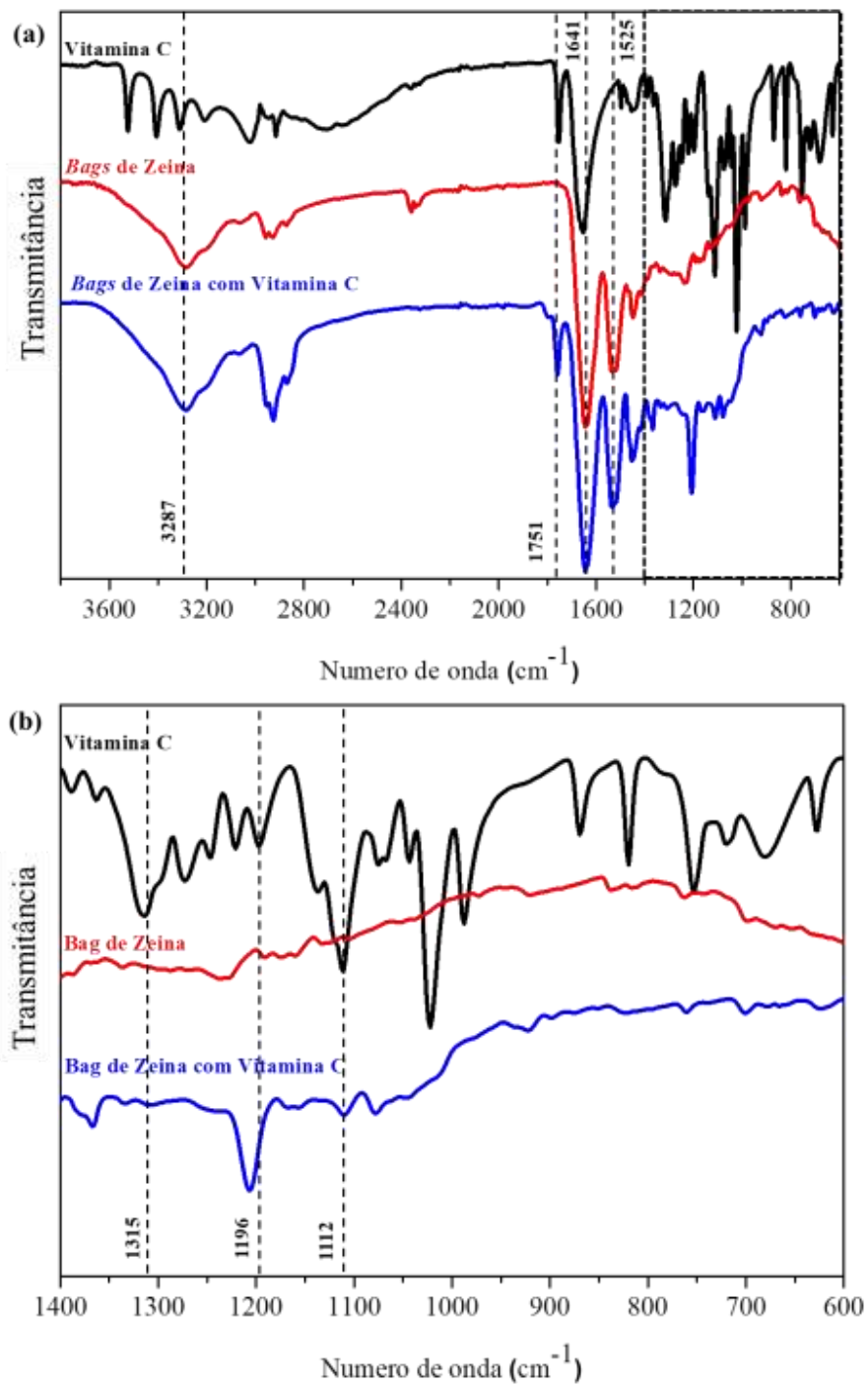


FIGURA 3.5 - Espectros de absorção na região do infravermelho para as *bags* sem e com incorporação de vitamina C, assim como a vitamina C pura.

O gráfico de DTG (FIGURA 3.6) mostra o comportamento térmico apresentado pelas *bags* com vitamina C incorporada. Estes dados confirmam a presença da vitamina C nas *bags*, visto que na sua curva há a presença do pico característico da vitamina C, além da presença do pico característico da zeína. A temperatura que corresponde à máxima taxa de perda de massa da vitamina C é em 215°C, apresentando outro pico, de menor intensidade, em 288°C. O primeiro pico está relacionado ao ácido ascórbico e o segundo proveniente de substâncias relacionadas a sua degradação¹⁷. Já as *bags* de zeína apresentam um pequeno pico na região de 50 a 100°C proveniente da perda de água e de resíduo de solventes. Os picos apresentados em 284°C e 312°C estão associados à ruptura de ligações intermoleculares de baixa energia, que mantem a conformação da zeína⁷⁴. Na TABELA 3.3 são apresentadas as temperaturas provenientes dos gráficos de TG e DTG, além da perda de massa relacionada ao processo térmico.

TABELA 3.3- Eventos térmicos, das *bags* com e sem vitamina C incorporada, obtidos por meio dos gráficos de TG e DTG.

Amostras	T_{on set} (°C)	T_{max} (°C)	Perda de massa (%)
Vitamina C	218/269	215/286	34,96/ 40,23 (res= 24,81)
“ <i>Bags</i> ” zeína	315	283/313	5,56/ 80,99 (res= 13,45)
“ <i>Bags</i> ” zeína com Vitamina C	291	208/271/312	5,56/ 83,38 (res= 16,62)

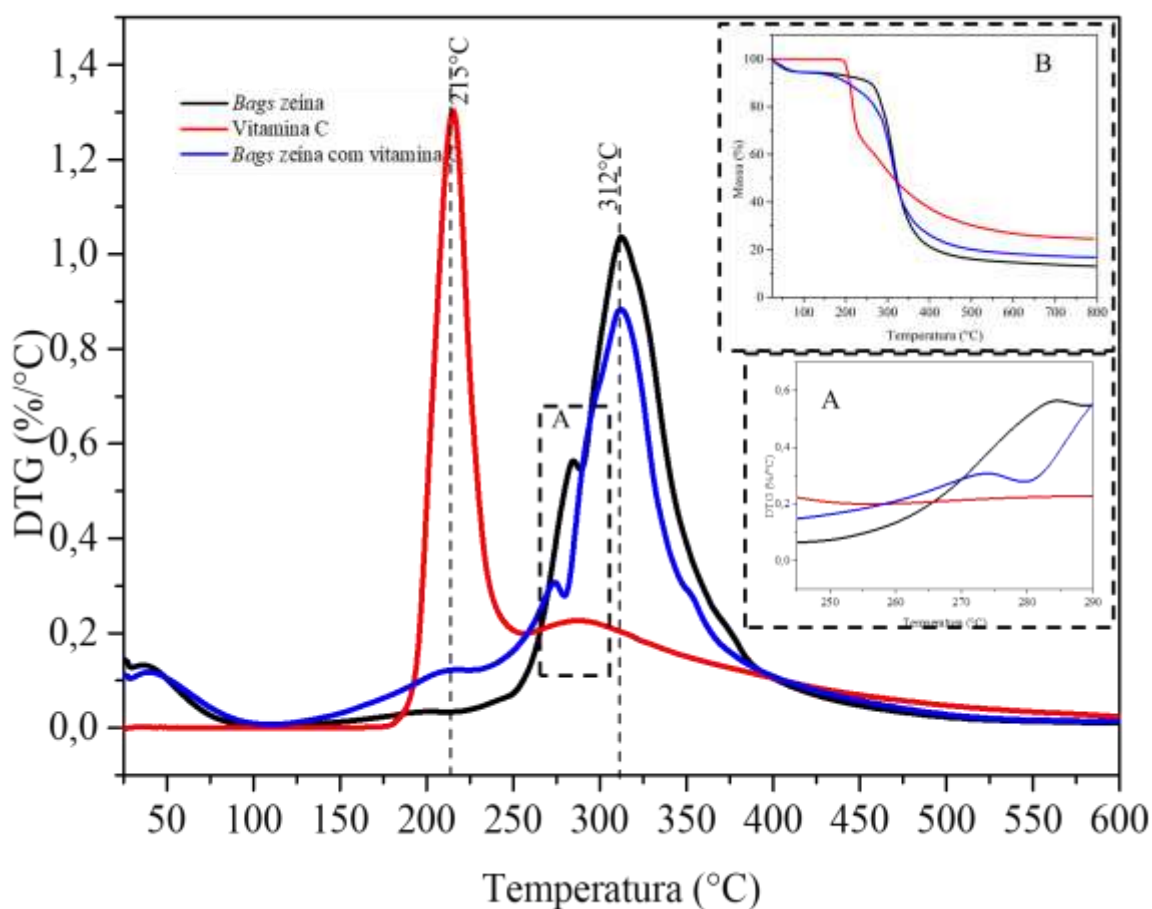


FIGURA 3.6 – Curvas de TG, evidenciando comportamento térmico da vitamina C, da *bags* de zeína e das *bags* de zeína com vitamina C incorporada.

3.4.2 - Estudo de liberação de vitamina C a partir das *bags*

Após as caracterizações das *bags* e verificada a presença da vitamina C, foi realizado o estudo cinético de liberação da vitamina em meio tamponado pH 7. Na FIGURA 3.7 são apresentados os espectros UV-Vis das soluções padrão de vitamina C e a curva padrão obtida a partir deles.¹⁰⁷

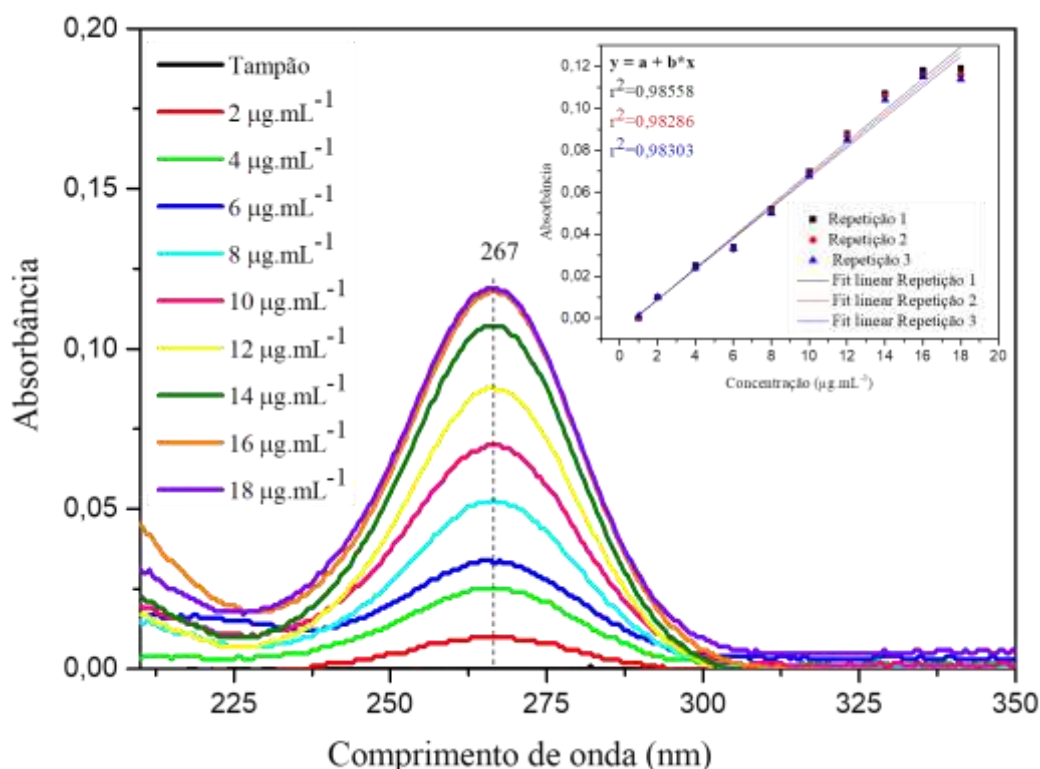


FIGURA 3.7 - Curva padrão de vitamina C, em tampão fosfato pH 7 para diferentes concentrações. O detalhe da figura mostra o ajuste linear da curva padrão.

Na FIGURA 3.8 são apresentadas as triplicatas das curvas de liberação de vitamina C em meio tamponado pH 7. O valor percentual da massa de vitamina C liberada no meio, em função do tempo foi determinado empregando a curva padrão (detalhe mostrado na Figura 3.7) e a Lei de Lambert - Beer (EQUAÇÃO 2).

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon l c \quad \text{Equação 2}$$

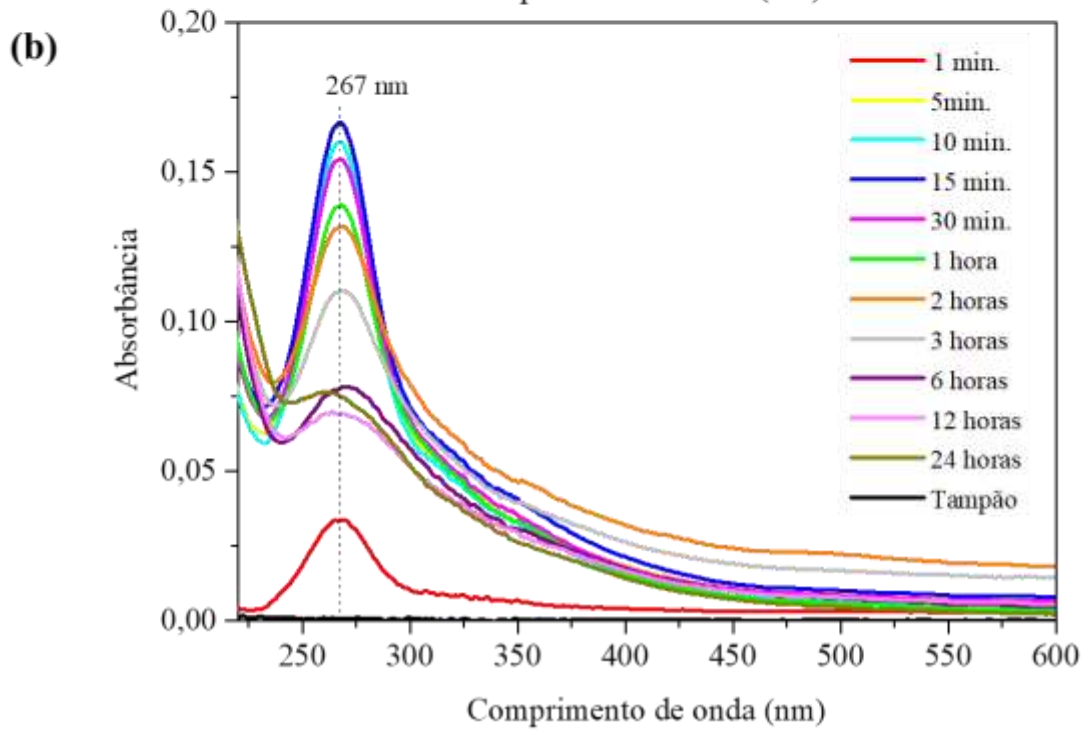
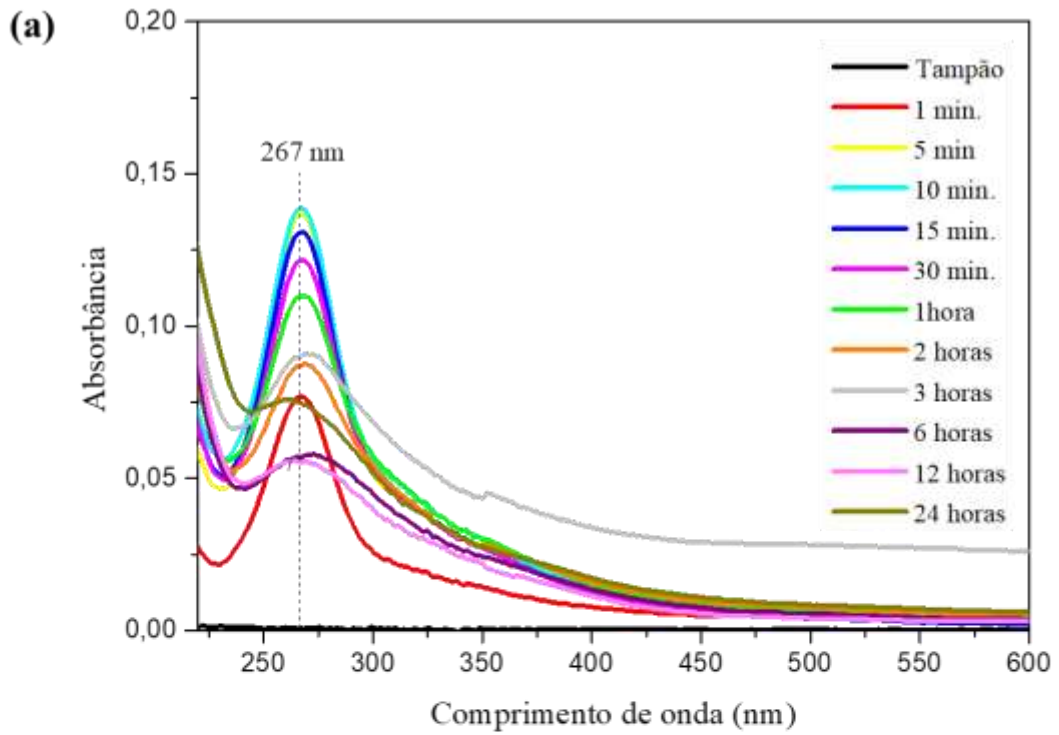
onde A é absorvância do sistema, ϵ é o coeficiente de absorvidade molar, l é o caminho óptico e c é a concentração de absorvedores. Conhecendo o valor de l , o coeficiente de absorvidade molar (em 267 nm) pode ser determinado pela

inclinação da reta de melhor ajuste da curva padrão da vitamina C, cujo valor encontrado foi de $1320,89 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

O percentual cumulativo (Pc) relacionado a liberação de vitamina C foi calculado utilizando-se a EQUAÇÃO 4.

$$Pc(\%) = \frac{M_t}{M_0} * 100 \quad \text{Equação 4}$$

onde M_t é a massa no tempo t e, M_0 é a massa inicial, a qual é equivalente à $m_{AAtotal}$, e que como descrito anteriormente, foi calculada pela soma da massa em t_0 (1 minuto) com a média das massas de vitamina C no equilíbrio. O perfil de liberação representado pelo percentual cumulativo versus tempo é mostrado na FIGURA 3.8-d.



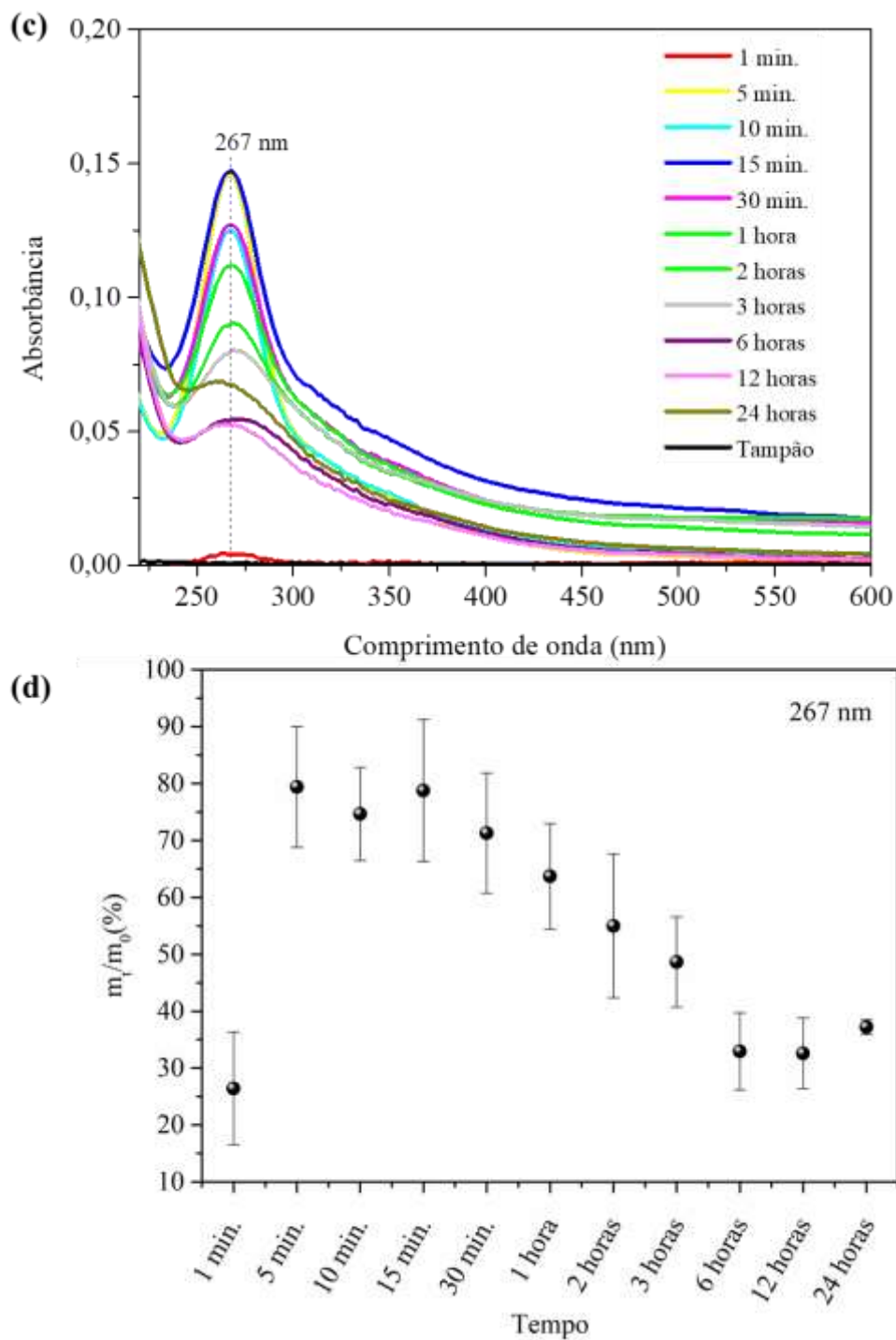


FIGURA 3.8- Estudo da liberação de vitamina C em solução tamponada pH7, durante 24 horas e realizado em triplicata. (a) Repetição 1; (b) Repetição 2, (c) Repetição 3 e (d) Percentual cumulativo relacionado a liberação de vitamina C em função do tempo.

O perfil de liberação observado para as *bags* mostra uma liberação inicial de vitamina C, aproximadamente 26,4% do conteúdo total (FIGURA 3.8-d), indicando que uma parte da vitamina pode estar adsorvida na superfície destas *bags* (mesmo não sendo observado indício de estruturas adsorvidas pelas análises de MEV (FIGURA 3.2 –b)). Posteriormente, para o tempo de 5 minutos observou-se uma rápida liberação de aproximadamente 79,4% do total de vitamina. Tal comportamento pode ser denominado efeito *burst*, e pode ser explicado por processo de liberação caracterizado por difusão das moléculas de vitamina C na matriz de zeína. Na sequência, a quantidade de vitamina liberada foi constante para os tempos seguintes, indicando um patamar de liberação até 60 minutos (FIGURA 3.8). Transcorrido o tempo de 60 minutos, (FIGURA 3.8), observa-se que a absorção em 267 nm, referente à massa de vitamina C liberada, diminui. Tal processo pode estar relacionado ao início de degradação da vitamina. Processos de degradação da vitamina C podem ocorrer por oxidação do ácido ascórbico, decorrente do maior tempo de exposição ao meio (solução tampão) e ao ambiente ¹¹². Porém, a liberação de vitamina ainda pode estar ocorrendo, no entanto de forma mais lenta que o processo de degradação, o que resulta na visualização da diminuição da absorbância, em 267 nm, com o tempo.

A eficiência de encapsulação (EE%) para as *bags* com vitamina C incorporada foi de 73,3%. É importante ressaltar que as *bags* empregadas na triplicata do estudo de liberação foram provenientes de diferentes lotes de produção.

3.5. CONCLUSÃO PARCIAL – CAPÍTULO 3

As *bags* de zeína apresentaram-se como eficiente alternativa à incorporação de vitamina C. O estudo de cinética de liberação da vitamina C realizado apresentou perfil com liberação inicial acima de 20% do conteúdo de vitamina sugerindo a presença da mesma na superfície das *bags*. Tal

característica pode ser procedente do processo de fabricação das *bags*, uma vez que a formação do *spray* pode resultar na segregação parcial das fases e assim ocorrer à deposição das partículas de vitamina na superfície das *bags*. No entanto, as porcentagens de vitamina C liberada em maiores tempos indica que grande parte da vitamina C encontra-se incorporada nas *bags*. Como determinado pelo cálculo de EE, ~73% da quantidade total de vitamina encontra-se encapsulada. Adicionalmente, as *bags* apresentaram boa reprodutibilidade nos perfil de liberação apesar de terem sido produzidas em diferentes lotes.

CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A execução deste trabalho possibilitou o desenvolvimento e caracterização de estruturas de zeína pela técnica de fiação por sopro em solução, obtidas em formatos de fibras e estruturas com geometria não regular, chamadas aqui de *bags*. As fibras de zeína foram obtidas empregando ácido acético como solvente, enquanto que a produção de *bags* ocorreu por meio do uso de ácido acético e solução etanólica 80%. Em relação à temperatura utilizada na solubilização da zeína nos diferentes solventes, observou-se que: (i) para a solução etanólica, tal processo ajuda no estiramento da gota polimérica durante o processo de fiação por sopro em solução, que resulta em maior probabilidade de formação de fibras; (ii) para as soluções com ácido acético, tal processo reduz a viscosidade da solução, o que facilita a formação de *bags*. O estudo da concentração polimérica para este material teve resposta similar às respostas de outros polímeros, ou seja, o aumento da concentração acarreta em uma maior possibilidade de formação de fibras de zeína, devido ao maior emaranhamento das cadeias poliméricas.

A fim de possibilitar o emprego da zeína como matriz de incorporação de materiais ativos, usou-se as *bags* produzidas com solução etanólica como modelo de incorporação de vitamina C. As técnicas de caracterização indicaram a presença de vitamina C nas amostras de *bags*, porém não foi possível determinar precisamente se estas estavam presentes na superfície das *bags* ou encapsulados, ou até mesmo ambos os casos. De forma a melhorar os resultados obtidos, sugere-se a utilização da técnica difração de raio X de pequeno ângulo (SAX) para entender melhor a estrutura cristalina da zeína e se a vitamina C causa alguma alteração nestas. As *bags* com vitamina C incorporada mostraram-se adequadas como matriz de liberação, especialmente

no período de 0 a 15 minutos. As *bags* são promissoras para este tipo de aplicação, pois apresentaram uma boa eficiência de encapsulação (EE) de 73,3 %.

A formação de diferentes estruturas de zeína pela técnica de fiação por sopro em solução mostrou-se promissora como uma rota alternativa para obtenção de partículas (*bags*) e fibras. Tal resultado é interessante, pois estende ainda mais a possibilidade de aplicação *in situ* das estruturas de zeínas, seja para liberação lenta como também para engenharia de tecidos. Outro ponto relevante é uma nova estratégia de encapsulação de vitamina C, podendo aumentar seu tempo de vida de prateleira, além de servir como material para suplementação de rações para peixes.

Como perspectivas para trabalhos futuros, propõe-se: (i) avaliação de outras variáveis do processo de fiação por sopro em solução, visando à obtenção de fibras de zeínas com solução etanoica, abrangendo ainda mais seu campo de aplicação; (ii) estudo da aprofundado da cinética de liberação da vitamina com emprego de modelamento matemático; (iii) utilização de materiais encapsulantes em conjunto com a zeína, em ambas estruturas, a fim de prolongar o tempo de liberação; (iv) Aplicação das *bags* com vitamina C incorporada como suplementação de rações de peixes e verificação de sua rota de ação e influência no metabolismo destes animais; (v) utilização das *bags* com vitamina C incorporada como “tempero” em flores comestíveis, sendo assim aplicada como suplementação alimentar humana; (vi) utilização de ambas estruturas de zeínas obtidas por FSS como matriz carregamento de outros materiais ativos de interesse, tanto na área alimentícia, médica como agrícola (em relação fertilizantes e pesticidas).

REFERENCIAS

1. Kim, D.-Y. *et al.* Recent developments in nanotechnology transforming the agricultural sector: a transition replete with opportunities. *Journal of the science of food and agriculture* **98**, 849–864 (2018).
2. Conceição, J. C. P. R. da & Conceição, P. H. Z. da. Agricultura: evolução e importância para a balança comercial brasileira. (2014).
3. Chaudhry, N. *et al.* Bio-inspired nanomaterials in agriculture and food: current status, foreseen applications and challenges. *Microbial pathogenesis* **123**, 196–200 (2018).
4. Achari, G. A. & Kowshik, M. Recent Developments on Nanotechnology in Agriculture: Plant Mineral Nutrition, Health, and Interactions with Soil Microflora. *Journal of agricultural and food chemistry* **66**, 8647–8661 (2018).
5. Rai, P. K. *et al.* Nanoparticle-plant interaction: Implications in energy, environment, and agriculture. *Environment international* **119**, 1–19 (2018).
6. Yata, V. K., Tiwari, B. C. & Ahmad, I. Nanoscience in food and agriculture: research, industries and patents. *Environmental chemistry letters* **16**, 79–84 (2018).
7. Dasgupta, N., Ranjan, S. & Ramalingam, C. Applications of nanotechnology in agriculture and water quality management. *Environmental chemistry letters* **15**, 591–605 (2017).
8. Kaphle, A., Navya, P. N., Umapathi, A. & Daima, H. K. Nanomaterials for agriculture, food and environment: applications, toxicity and regulation. *Environmental chemistry letters* **16**, 43–58 (2018).

9. McDonough, L. M. Controlled release of insect sex pheromones from a natural rubber substrate. in *ACS Symposium series-American Chemical Society (USA)* (1991).
10. Trenkel, M. E. *Controlled-release and stabilized fertilizers in agriculture*. **11**, (International fertilizer industry association Paris, 1997).
11. da Silva, D. *et al.* Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems. *Chemical Engineering Journal* **340**, 9–14 (2018).
12. Schneider, R. *et al.* Biocompatible electrospun nanofibers containing cloxacillin: Antibacterial activity and effect of pH on the release profile. *Reactive and Functional Polymers* **132**, 26–35 (2018).
13. Chaparro, F. J. *et al.* Sintered electrospun poly(ϵ -caprolactone)–poly(ethylene terephthalate) for drug delivery. *Journal of Applied Polymer Science* **136**, 47731 (2019).
14. Castro-Enríquez, D.-D. *et al.* Development of microparticles from wheat glutenins by electrospray and potential application as controlled-release fertilizers. *Bulletin of Materials Science* **42**, 41 (2019).
15. Peršin, Z. *et al.* Bio-nanofibrous mats as potential delivering systems of natural substances. *Textile Research Journal* **87**, 444–459 (2017).
16. Rempel, S. P. *et al.* Nano/microfibers of EVA copolymer obtained by solution blow spinning: Processing, solution properties, and pheromone release application. *Journal of Applied Polymer Science* **136**, 47647 (2019).
17. da Cruz, M. C. R., Dagostin, J. L. A., Perussello, C. A. & Masson, M. L. Assessment of physicochemical characteristics, thermal stability and release

profile of ascorbic acid microcapsules obtained by complex coacervation. *Food hydrocolloids* **87**, 71–82 (2019).

18.Pradeepkumar, P., Govindaraj, D., Jeyaraj, M., Munusamy, M. A. & Rajan, M. Assembling of multifunctional latex-based hybrid nanocarriers from *Calotropis gigantea* for sustained (doxorubicin) DOX releases. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **87**, 461–470 (2017).

19.Riyajan, S.-A. A Novel Hybrid 2,4-Dichlorophenoxy Acetate Bead from Modified Cassava Starch and Sodium Alginate with Modified Natural Rubber Coating. *Journal of Polymers and the Environment* **26**, 1950–1961 (2018).

20.Chen, J. *et al.* Environmentally friendly fertilizers: A review of materials used and their effects on the environment. *Science of the Total Environment* **613**, 829–839 (2018).

21.Qiao, D. *et al.* Preparation and characterization of slow-release fertilizer encapsulated by starch-based superabsorbent polymer. *Carbohydrate Polymers* **147**, 146–154 (2016).

22.Hernández-Hernández, H. *et al.* Effects of chitosan–PVA and Cu nanoparticles on the growth and antioxidant capacity of tomato under saline stress. *Molecules* **23**, 178 (2018).

23.Liu, Z. *et al.* Preparation of avermectin microcapsules with anti-photodegradation and slow-release by the assembly of lignin derivatives. *New J. Chem.* **41**, 3190–3195 (2017).

24.Bortolin, A., Aouada, F. A., Mattoso, L. H. & Ribeiro, C. Nanocomposite PAAm/methyl cellulose/montmorillonite hydrogel: evidence of synergistic effects for the slow release of fertilizers. *Journal of agricultural and food chemistry* **61**, 7431–7439 (2013).

- 25.Paes, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. *Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)* (2006).
- 26.Shukla, R. & Cheryan, M. Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products* **13**, 171–192 (2001).
- 27.Wang, H.-J., Gong, S.-J. & Wang, J.-Y. Mechanical improvement of zein protein as scaffold for bone tissue engineering. *Materials Science and Technology* **24**, 1045–1052 (2008).
- 28.Assis, O. B. G. & Leoni, A. M. Protein hydrophobic dressing on seeds aiming at the delay of undesirable germination. *Scientia Agricola* **66**, 123–126 (2009).
- 29.Liu, X., Sun, Q., Wang, H., Zhang, L. & Wang, J.-Y. Microspheres of corn protein, zein, for an ivermectin drug delivery system. *Biomaterials* **26**, 109–115 (2005).
- 30.Fu, J.-X., Wang, H.-J., Zhou, Y.-Q. & Wang, J.-Y. Antibacterial activity of ciprofloxacin-loaded zein microsphere films. *Materials Science and Engineering: C* **29**, 1161–1166 (2009).
- 31.Hurtado-López, P. & Murdan, S. Zein microspheres as drug/antigen carriers: A study of their degradation and erosion, in the presence and absence of enzymes. *Journal of microencapsulation* **23**, 303–314 (2006).
- 32.Salerno, A., Zeppetelli, S., Maio, E. D., Iannace, S. & Netti, P. A. Novel 3D porous multi-phase composite scaffolds based on PCL, thermoplastic zein and ha prepared via supercritical CO₂ foaming for bone regeneration. *Composites Science and Technology* **70**, 1838–1846 (2010).

- 33.Hurtado-López, P. & Murdan, S. An investigation into the adjuvanticity and immunogenicity of zein microspheres being researched as drug and vaccine carriers. *Journal of pharmacy and pharmacology* **58**, 769–774 (2006).
- 34.Wang, H.-J., Lin, Z.-X., Liu, X.-M., Sheng, S.-Y. & Wang, J.-Y. Heparin-loaded zein microsphere film and hemocompatibility. *Journal of Controlled Release* **105**, 120–131 (2005).
- 35.Laelorspoen, N., Wongsasulak, S., Yoovidhya, T. & Devahastin, S. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in zein–alginate core–shell microcapsules via electrospraying. *Journal of Functional Foods* **7**, 342–349 (2014).
- 36.Luo, Y., Zhang, B., Whent, M., Yu, L. (Lucy) & Wang, Q. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro controlled release study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **85**, 145–152 (2011).
- 37.Parris, N., Cooke, P. H. & Hicks, K. B. Encapsulation of Essential Oils in Zein Nanospherical Particles. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4788–4792 (2005).
- 38.Moomand, K. & Lim, L.-T. Oxidative stability of encapsulated fish oil in electrospun zein fibres. *Food Research International* **62**, 523–532 (2014).
- 39.Moomand, K. & Lim, L.-T. Effects of solvent and n-3 rich fish oil on physicochemical properties of electrospun zein fibres. *Food Hydrocolloids* **46**, 191–200 (2015).
- 40.Mercante, L. A., Scagion, V. P., Migliorini, F. L., Mattoso, L. H. & Correa, D. S. Electrospinning-based (bio) sensors for food and agricultural applications: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2017).

41. Khajavi, R. & Abbasipour, M. Electrospinning as a versatile method for fabricating coreshell, hollow and porous nanofibers. *Scientia Iranica* **19**, 2029–2034 (2012).
42. Haider, A., Haider, S. & Kang, I.-K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry* **11**, 1165–1188 (2018).
43. Hu, X. *et al.* Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release* **185**, 12–21 (2014).
44. Oliveira, J. E., Mattoso, L. H. C., Orts, W. J. & Medeiros, E. S. Structural and Morphological Characterization of Micro and Nanofibers Produced by Electrospinning and Solution Blow Spinning: A Comparative Study. *Advances in Materials Science and Engineering* **2013**, 14 (2013).
45. Medeiros, E. S., Glenn, G. M., Klamczynski, A. P., Orts, W. J. & Mattoso, L. H. Solution blow spinning: A new method to produce micro-and nanofibers from polymer solutions. *Journal of applied polymer science* **113**, 2322–2330 (2009).
46. Daristotle, J. L., Behrens, A. M., Sandler, A. D. & Kofinas, P. A Review of the Fundamental Principles and Applications of Solution Blow Spinning. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 34951–34963 (2016).
47. Paschoalin, R. T. *et al.* Solution blow spinning fibres: New immunologically inert substrates for the analysis of cell adhesion and motility. *Acta Biomaterialia* **51**, 161–174 (2017).

- 48.Oliveira, J. E. *et al.* Nano and submicrometric fibers of poly (D, L-lactide) obtained by solution blow spinning: Process and solution variables. *Journal of Applied Polymer Science* **122**, 3396–3405 (2011).
- 49.Kriegel, C., Arrechi, A., Kit, K., McClements, D. J. & Weiss, J. Fabrication, functionalization, and application of electrospun biopolymer nanofibers. *Critical reviews in food science and nutrition* **48**, 775–797 (2008).
- 50.Lim, C. T. Nanofiber technology: current status and emerging developments. *Progress in Polymer Science* **70**, 1–17 (2017).
- 51.Assadpour, E. & Jafari, S. M. Advances in Spray-Drying Encapsulation of Food Bioactive Ingredients: From Microcapsules to Nanocapsules. *Annual Review of Food Science and Technology* **10**, 103–131 (2019).
- 52.Arpagaus, C., Collenberg, A., Rütli, D., Assadpour, E. & Jafari, S. M. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* **546**, 194–214 (2018).
- 53.Sosnik, A. & Seremeta, K. P. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in Colloid and Interface Science* **223**, 40–54 (2015).
- 54.Arpagaus, C. A novel laboratory-scale spray dryer to produce nanoparticles. *Drying Technology* **30**, 1113–1121 (2012).
- 55.Krishnaiah, D., Nithyanandam, R. & Sarbatly, R. A critical review on the spray drying of fruit extract: Effect of additives on physicochemical properties. *Critical reviews in food science and nutrition* **54**, 449–473 (2014).
- 56.Jaworek, A., Gañán-Calvo, A. M. & Machala, Z. Low temperature plasmas and electrosprays. *Journal of Physics D: Applied Physics* **52**, 233001 (2019).

- 57.Zhang, S., Campagne, C. & Salaün, F. Influence of Solvent Selection in the Electrospinning Process of Polycaprolactone. *Applied Sciences* **9**, 402 (2019).
- 58.Soares, R. M. D., Siqueira, N. M., Prabhakaram, M. P. & Ramakrishna, S. Electrospinning and electrospay of bio-based and natural polymers for biomaterials development. *Materials Science and Engineering: C* **92**, 969–982 (2018).
- 59.Anu Bhushani, J. & Anandharamakrishnan, C. Electrospinning and electrospinning techniques: Potential food based applications. *Trends in Food Science & Technology* **38**, 21–33 (2014).
- 60.Bodnár, E., Grifoll, J. & Rosell-Llompart, J. Polymer solution electrospinning: A tool for engineering particles and films with controlled morphology. *Journal of Aerosol Science* **125**, 93–118 (2018).
- 61.Smeets, A., Clasen, C. & Van den Mooter, G. Electrospinning of polymer solutions: Study of formulation and process parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **119**, 114–124 (2017).
- 62.Diana, R., Pinto, O., Motta, W. & Silva, F. K. A importância das vitaminas E, C e A na reprodução de peixes: revisão de literatura. *Rev. Bras. Reprod. Anim* **33**, 20–25 (2009).
- 63.Dawood, M. A. & Koshio, S. Vitamin C supplementation to optimize growth, health and stress resistance in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture* **10**, 334–350 (2018).
- 64.Bicudo, T. C. *et al.* γ -Zein secondary structure in solution by circular dichroism. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules* **89**, 175–178 (2008).

65. Forato, L. A., Bernardes Filho, R. & Colnago, L. A. Estudo de métodos de aumento de resolução de espectros de FTIR para análise de estruturas secundárias de proteínas. *Quimica Nova* **21**, 146–150 (1998).
66. Dai, L., Zhou, H., Wei, Y., Gao, Y. & McClements, D. J. Curcumin encapsulation in zein-rhamnolipid composite nanoparticles using a pH-driven method. *Food Hydrocolloids* **93**, 342–350 (2019).
67. Wang, H. *et al.* Release kinetics and antibacterial activity of curcumin loaded zein fibers. *Food Hydrocolloids* **63**, 437–446 (2017).
68. Zhang, F., Khan, M. A., Cheng, H. & Liang, L. Co-encapsulation of α -tocopherol and resveratrol within zein nanoparticles: Impact on antioxidant activity and stability. *Journal of Food Engineering* **247**, 9–18 (2019).
69. Huang, X. *et al.* Encapsulation of resveratrol in zein/pectin core-shell nanoparticles: Stability, bioaccessibility, and antioxidant capacity after simulated gastrointestinal digestion. *Food Hydrocolloids* **93**, 261–269 (2019).
70. Horuz, T. İ. & Belibağlı, K. B. Nanoencapsulation of carotenoids extracted from tomato peels into zein fibers by electrospinning. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **99**, 759–766 (2019).
71. Dehcheshmeh, M. A. & Fathi, M. Production of core-shell nanofibers from zein and tragacanth for encapsulation of saffron extract. *International Journal of Biological Macromolecules* **122**, 272–279 (2019).
72. Torkamani, A. E., Syahariza, Z. A., Norziah, M. H., Wan, A. K. M. & Juliano, P. Encapsulation of polyphenolic antioxidants obtained from *Momordica charantia* fruit within zein/gelatin shell core fibers via coaxial electrospinning. *Food bioscience* **21**, 60–71 (2018).

73. Yao, Z.-C., Chang, M.-W., Ahmad, Z. & Li, J.-S. Encapsulation of rose hip seed oil into fibrous zein films for ambient and on demand food preservation via coaxial electrospinning. *Journal of Food Engineering* **191**, 115–123 (2016).
74. Brahatheeswaran, D. *et al.* Hybrid fluorescent curcumin loaded zein electrospun nanofibrous scaffold for biomedical applications. *Biomedical Materials* **7**, 045001 (2012).
75. Gómez-Mascaraque, L. G., Tordera, F., Fabra, M. J., Martínez-Sanz, M. & Lopez-Rubio, A. Coaxial electrospaying of biopolymers as a strategy to improve protection of bioactive food ingredients. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **51**, 2–11 (2019).
76. Argos, P., Pedersen, K., Marks, M. D. & Larkins, B. A. A structural model for maize zein proteins. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 9984–9990 (1982).
77. Cuq, B., Gontard, N. & Guilbert, S. Proteins as agricultural polymers for packaging production. *Cereal chemistry* **75**, 1–9 (1998).
78. Larkins, B. A. & Hurkman, W. J. Synthesis and deposition of zein in protein bodies of maize endosperm. *Plant Physiology* **62**, 256–263 (1978).
79. Li, Y. *et al.* Understanding the dissolution of α -zein in aqueous ethanol and acetic acid solutions. *The Journal of Physical Chemistry B* **116**, 12057–12064 (2012).
80. Huang, W. *et al.* Development of a resveratrol–zein–dopamine–lecithin delivery system with enhanced stability and mucus permeation. *Journal of Materials Science* **54**, 8591–8601 (2019).

81. Yuan, X., Zhang, M., Wang, Y., Zhao, H. & Sun, D. Using co-axial electro-spray deposition to eliminate burst release of simvastatin from microparticles and to enhance induced osteogenesis. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **30**, 355–375 (2019).
82. SOUZA, C. de *et al.* Encapsulação do ácido l-ascórbico no biopolímero natural galactomanana por spray-drying: preparação, caracterização e atividade antioxidante. *Quim. Nova* **38**, 877–883 (2015).
83. Kampeerappun, P. & Phanomkate, N. Slow release fertilizer from core-shell electrospun fibers. *Chiang Mai J Sci* **40**, 775–782 (2013).
84. Yarin, A. L. Coaxial electrospinning and emulsion electrospinning of core-shell fibers. *Polymers for Advanced Technologies* **22**, 310–317 (2011).
85. Zamani, M., Prabhakaran, M. P., San Thian, E. & Ramakrishna, S. Protein encapsulated core-shell structured particles prepared by coaxial electro-spraying: investigation on material and processing variables. *International journal of pharmaceutics* **473**, 134–143 (2014).
86. Behrens, A. M. *et al.* In Situ Deposition of PLGA Nanofibers via Solution Blow Spinning. *ACS Macro Lett.* **3**, 249–254 (2014).
87. Ma, Z., Kotaki, M., Inai, R. & Ramakrishna, S. Potential of Nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds. *Tissue Engineering* **11**, 101–109 (2005).
88. Mercante, L. A. *et al.* Solution blow spun PMMA nanofibers wrapped with reduced graphene oxide as an efficient dye adsorbent. *New J. Chem.* **41**, 9087–9094 (2017).
89. Souza, M. A., Oliveira, J. E., Medeiros, E. S., Glenn, G. M. & Mattoso, L. H. C. Controlled Release of Linalool Using Nanofibrous Membranes of Poly(lactic

acid) Obtained by Electrospinning and Solution Blow Spinning: A Comparative Study. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **15**, 5628–5636 (2015).

90.Souza, M. A., Sakamoto, K. Y. & Mattoso, L. H. C. Release of the diclofenac sodium by nanofibers of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) obtained from electrospinning and solution blow spinning. *J. Nanomaterials* **2014**, 56–56 (2014).

91.Liu, F. *et al.* Preparation of Zein Fibers Using Solution Blow Spinning Method. *Journal of Food Science* **81**, N3015–N3025 (2016).

92.Zhang, H. *et al.* Determining electrospun morphology from the properties of protein–polymer solutions. *Soft matter* **14**, 3455–3462 (2018).

93.Hansen, C. M. *Hansen solubility parameters: a user's handbook*. (CRC press, 2002).

94.Sebastião, V. C. *Ciência dos Polímeros: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros*. São Paulo: Editora Artliber 17–19 (2006).

95.Turasan, H. & Kokini, J. L. Advances in understanding the molecular structures and functionalities of biodegradable zein-based materials using spectroscopic techniques: A review. *Biomacromolecules* **18**, 331–354 (2017).

96.Yoshida, T. M. *Obtenção e caracterização de filmes de zeína adicionados de celulose bacteriana*. (Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2017).

97.Canevarolo Jr, S. V. *Técnicas de caracterização de polímeros*. Artliber, São Paulo **430**, (2004).

98.Jian, H. Y., Fridrikh, S. V. & Rutledge, G. C. The role of elasticity in the formation of electrospun fibers. *Polymer* **47**, 4789–4797 (2006).

- 99.Schulter, E. P. & Vieira Filho, J. E. R. *Evolução da Piscicultura no Brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia*. (Texto para Discussão, 2017).
- 100.Navarro, J. C., Monroig, Ó. & Sykes, A. V. Nutrition as a key factor for cephalopod aquaculture. in *Cephalopod culture* 77–95 (Springer, 2014).
- 101.Pohlenz, C. & Gatlin, D. M. Interrelationships between fish nutrition and health. *Aquaculture* **431**, 111–117 (2014).
- 102.Bombardelli, R. A. *et al.* Growth and reproduction of female Nile tilapia fed diets containing different levels of protein and energy. *Aquaculture* **479**, 817–823 (2017).
- 103.Dawood, M. A. O. *et al.* Dietary supplementation of selenium nanoparticles modulated systemic and mucosal immune status and stress resistance of red sea bream (*Pagrus major*). *Fish Physiology and Biochemistry* **45**, 219–230 (2019).
- 104.Salaro, A. L. *et al.* Suplementação de vitamina C em dietas para juvenis de trairão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **48**, 1096–1102 (2013).
- 105.Chagas, E. C. & Val, A. L. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **38**, 397–402 (2003).
- 106.Kubitza, F. Nutrição e alimentação de tilápias—parte I. *Panorama da Aquicultura* **9**, 42–50 (1999).
- 107.Amiri, S., Rezazadeh-Bari, M., Alizadeh-Khaledabad, M. & Amiri, S. New formulation of vitamin C encapsulation by nanoliposomes: production and evaluation of particle size, stability and control release. *Food Science and Biotechnology* **28**, 423–432 (2019).

- 108.Kadakal, C., Duman, T. & Ekinici, R. Thermal degradation kinetics of ascorbic acid, thiamine and riboflavin in rosehip (*Rosa canina* L) nectar. *Food Science and Technology* 0–0 (2017).
- 109.Malik, S. A. *et al.* Electrospray synthesis and properties of hierarchically structured PLGA TIPS microspheres for use as controlled release technologies. *Journal of colloid and interface science* **467**, 220–229 (2016).
- 110.Galvão, A. C. *et al.* Solubility and thermodynamics of vitamin C in binary liquid mixtures involving water, methanol, ethanol and isopropanol at different temperatures. *The Journal of Chemical Thermodynamics* **121**, 8–16 (2018).
- 111.Terpstra, M. & Gruetter, R. ¹H NMR detection of vitamin C in human brain in vivo. *Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine* **51**, 225–229 (2004).
- 112.Sapei, L. & Hwa, L. Study on the Kinetics of Vitamin C Degradation in Fresh Strawberry Juices. *Procedia Chemistry* **9**, 62–68 (2014).

APÊNDICE A - LISTAS DE PUBLICAÇÕES DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO (2015-2019)

Artigos científicos

- **KELCILENE B.R. TEODORO; FLÁVIO M. SHIMIZU; VANESSA P. SCAGION; DANIEL S. CORREA.** Ternary nanocomposites based on cellulose nanowhiskers, silver nanoparticles and electrospun nanofibers: Use in an electronic tongue for heavy metal detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 290, p. 387-395, 2019.
- **TERRA, IDELMA A. A.; SANFELICE, RAFAELA C.; SCAGION, VANESSA P.; TOMAZIO, NATHALIA B.; MENDONÇA, CLEBER R.; NUNES, LUIZ A. O.; CORREA, DANIEL S.** Polyvinylpyrrolidone electrospun nanofibers doped with Eu: Fabrication, characterization, and application in gas sensors. *JOURNAL OF APPLIED POLYMER SCIENCE*, v. 136, p. 47775, 2019.
- **MERCANTE, LUIZA A.; SCAGION, VANESSA P.; MIGLIORINI, FERNANDA L.; MATTOSO, LUIZ H.C.; CORREA, DANIEL S.** Electrospinning-based (bio)sensors for food and agricultural applications: A review. *TRAC-TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY*, v. 91, p. 91-103, 2017.
- **MONGE NETO, ANDRÉ A.; STRÖHER, RAQUEL; ASSENHA, HELOISA B. R.; SCAGION, VANESSA P.; CORREA, DANIEL S.; ZANIN, GISELLA M.** Interaction of peptides obtained from the enzymatic hydrolysis of soybean meal with cyclodextrins: an evaluation of bitterness reduction. *JOURNAL OF INCLUSION PHENOMENA AND MACROCYCLIC CHEMISTRY* v. 89, p. 59-69, 2017.
- **SCAGION, VANESSA P.; MERCANTE, LUIZA; SAKAMOTO, KARINE; OLIVEIRA, JULIANO; FONSECA, FERNANDO J; MATTOSO, LUIZ HENRIQUE; FERREIRA, MARCOS DAVID; CORREA, DANIEL.** An electronic tongue based on conducting electrospun nanofibers for detecting

tetracycline in milk samples. RSC Advances: an international journal to further the chemical sciences, v. 6, p. 103740-103746, 2016.

- MERCANTE, LUIZA A.; PAVINATTO, ADRIANA; IWAKI, LEONARDO E. O.; **SCAGION, VANESSA P.**; ZUCOLOTTI, VALTENCIR; OLIVEIRA, OSVALDO N.; MATTOSO, LUIZ H. C.; CORREA, DANIEL. Electrospun Polyamide 6/Poly(allylamine hydrochloride) Nanofibers Functionalized with Carbon Nanotubes for Electrochemical Detection of Dopamine. ACS Applied Materials & Interfaces, v. 7, p. 4784-4790, 2015.
- MERCANTE, LUIZA A.; **SCAGION, VANESSA P.**; PAVINATTO, ADRIANA; SANFELICE, RAFAELA C.; MATTOSO, LUIZ H. C.; CORREA, DANIEL S.. Electronic Tongue Based on Nanostructured Hybrid Films of Gold Nanoparticles and Phthalocyanines for Milk Analysis. Journal of Nanomaterials, v. 2015, p. 1-7, 2015.

Capítulos e livros

- AFONSO, A. F.; MARQUES, C. M. P.; BERTOLIN, R. V.; SCAGION, V. P.; MARTINS, A. C.; KUBO, A. M.; GOMES, B. L.; GOMES, C. J. C.; HARTWIG, D. R.; ZANON, D. A. V.; PONTES, J. G. M.; MATIELLO, J. R.; CARNIER, K.; SILVA, M. J.; THEODORO, M. E. C.; COSTA, N. C.; FALCAO, P. T. S.; BRETONES, P. S.; SOUZA, R. F.; CORREA, R. G.; STRADIOTO, S. . Guia de Experimentos de Química para o Ensino Médio. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2016. v. 1. 56p .