

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**MATERIAIS BIOPOLIMÉRICOS MULTICAMADAS**  
**PRODUZIDOS POR *CASTING* CONTÍNUO E DEPOSIÇÃO**  
**POR SOPRO EM SOLUÇÃO**

**Giuliana Thalina Franco\***

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

**Orientador: Luiz Henrique Caparelli Mattoso**

**Coorientador: Caio Gomide Otoni**

**\* bolsista FAPESP (Processo 2019/26577-9)**

**São Carlos - SP**  
**2024**



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Giuliana Thalina Franco, realizada em 28/08/2024.

#### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso (EMBRAPA)

Profa. Dra. Juliana da Silva Bernardes (CNPEN)

Prof. Dr. Lucas Henrique Staffa (UFSCar)

Prof. Dr. Caio Marcio Paranhos da Silva (UFSCar)

Profa. Dra. Rubia Figueredo Gouveia (CNPEN)

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Maria José e Luiz Carlos,  
e a minha irmã, Lulliana,  
com todo amor,  
dedico.*

*“O começo de todas as ciências é o espanto  
de as coisas serem o que são”.*

*(Aristóteles)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pela vida e por proporcionar as condições para que eu pudesse seguir o caminho que eu escolhi;

aos meus pais, Maria José e Luiz Carlos, pelo apoio incondicional e suporte durante esta longa jornada;

à minha irmã, Lulliana, e meu cunhado, Rodrigo, que também me acompanharam nesta trajetória;

à minha filhota de quatro patas, Debinha, que sempre me fez companhia nos longos dias da escrita da tese;

aos meus orientadores, Luiz Mattoso e Caio Otoni, que não só me orientaram nesta jornada, como me ouviram e me aconselharam nos períodos difíceis. Sou muito agradecida por toda a ajuda;

à Emily Cranston, da UBC no Canadá, pela oportunidade, pelo conhecimento e pelo acolhimento durante o período que passei em seu laboratório;

aos meus colegas da Embrapa, Jhonny, Thalita Bondância, Ju Farinassi, Rodrigo Duarte, Carol Piccinin, Luana Figueiredo, Matheus Barros, entre muitos outros que me acompanharam nos cafés da tarde e sempre estiveram presentes na minha jornada no exterior;

aos colegas que conheci no Canadá, Marcus Jonhs e Yi Lu, que me ajudaram imensamente durante minha aprendizagem com o AFM;

à toda equipe da Embrapa Instrumentação que vai desde o pessoal da limpeza à chefia, que proporcionaram toda a infraestrutura para o desenvolver do trabalho;

às meninas no NAP, em especial a Suzane, Maína e Jacque, que nos socorriam com a documentação e com a parte financeira;

ao pessoal do PPGQ, principalmente as meninas da secretária, pela ajuda burocrática;

à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado no país (Processo: 2019/26577-9) e pela bolsa de estágio no exterior BEPE (Processo: 2022/05608-6);

ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio através do INCT Circularidade em Materiais Poliméricos (processo 406925/2022-4).

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- $\dot{\gamma}_w$ : taxa de cisalhamento entre geometria e parede do reômetro
- $R_c$ : raio do orifício interno da agulha
- $\dot{T}_{alim.}$ : taxa de alimentação
- $a^*$  e  $b^*$ : parâmetros colorimétricos (escala CIE)
- AC: ângulo de contato
- AFM: microscopia de força atômica
- ANOVA: análise de variância
- AT: ácido tânico
- ATR: *attenuated total reflectance*
- b.s.: base seca
- BTCA: 1,1,4,4-ácido butanotetracarboxílico
- b.u.: base úmida
- c.m.c.: concentração micelar crítica
- CA: camada de caseína; substrato de caseína (AFM)
- CA-CMC: filmes bicamadas de caseína e carboximetilcelulose
- CA<sub>sonda</sub>: sonda de AFM modificada com caseína
- CMC: carboximetilcelulose; camada de CMC; substrato de CMC sem adição de ácido tânico (AFM)
- CMC<sub>5%AT</sub>: substrato de CMC contendo 5% de ácido tânico (AFM)
- CMC<sub>30%AT</sub>: substrato de CMC contendo 30% de ácido tânico (AFM)
- DSS: deposição por sopro em solução
- DTG: derivada da curva termogravimétrica
- E. coli*: *Escherichia coli*
- E: módulo de elasticidade
- EDC: cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
- ELS: energia livre de superfície
- FTIR: Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
- GI: grau de intumescimento
- GS: grau de solubilidade
- HPS: hipofosfito de sódio

IA: índice de alvura  
k: constante de mola  
L\*: luminosidade (escala CIE)  
MES: ácido 2-etanossulfônico  
MEV: microscopia eletrônica de varredura  
MEV-FEG: microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo  
NHS: N-hidroxisuccinimida  
pI: ponto isoelétrico  
PLL: poli-L-lisina  
PVA: permeabilidade ao vapor de água  
QCM-D: microbalança de cristal de quartzo com monitoramento de dissipação de energia  
Rq: rugosidade quadrática média  
*S. aureus*: *Staphylococcus aureus*  
SBS: solution blow spinning  
Si-NPs: nanopartículas de sílica carboxilada  
TG: termogravimetria  
Trigger point: ponto de gatilho (AFM)  
UFC: unidades formadoras de colônia  
UR: umidade relativa  
UV: luz ultravioleta  
UV-VIS: Espectroscopia no ultravioleta e visível  
vOCG: modelo de van Oss, Chaudhury e Good  
vOCG: modelo teórico de van Oss, Chaudhury e Good  
W<sub>a</sub>: trabalho de adesão total  
W<sub>a</sub><sup>AB</sup>: componente de ácido-base de Lewis do trabalho de adesão  
W<sub>a</sub><sup>LW</sup>: componente de Lifshitz-van der Waals do trabalho de adesão  
ZN<sub>15%AT</sub>: substrato de zeína contendo 15% de ácido tânico (AFM)  
ZN: camada de zeína; substrato de zeína (AFM)  
ZN-CA-CMC: filme multicamada de zeína, caseína e carboximetilcelulose  
γ: componente básica de Lewis da tensão superficial

$\gamma^+$ : componente ácida de Lewis da tensão superficial

$\gamma^{AB}$ : componente ácido-base de Lewis da tensão superficial

$\gamma^{LW}$ : componente de Liftshitz-van der Waals da tensão superficial

$\Delta E^*$ : diferença de cor total

$\Delta I$ : diferença entre as intensidades das bandas de FTIR da face delaminada e externa

$\epsilon$ : deformação na ruptura

$\sigma$ : resistência à tração

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>TABELA 3.1.</b> Composições biopoliméricas de filmes multicamadas e suas respectivas propriedades alcançadas.....	17
<b>TABELA 5.1.</b> Concentrações de glicerol e dos reticulantes ácido cítrico e ácido 1,2,3,4-butanotetracarboxílico (BTCA) utilizados na composição dos filmes de carboximetilcelulose (CMC) e caseína. As concentrações foram em relação a massa seca do polímero.....	20
<b>TABELA 5.2.</b> Concentrações (m/m, base seca) de 1,2,3,4-ácido butanotetracarboxílico (BTCA) e ácido tânico (AT) utilizados nas composições dos filmes bicamadas produzidos por casting contínuo. As concentrações utilizadas foram em relação à massa seca de polímero.....	22
<b>TABELA 5.3.</b> Valores das concentrações das soluções de zeína, concentração do ácido acético incorporado e volume de solução depositada sobre os filmes monocamadas de caseína nos testes iniciais. As concentrações de zeína foram em relação ao volume total da solução e as concentrações do ácido tânico foi em relação à massa de proteína.....	25
<b>TABELA 5.4.</b> Quantidades dos polímeros e dos reticulantes utilizadas nas soluções para a produção dos substratos. A proporção foi de 1g de BTCA para 0,5 g de HPS.....	34
<b>TABELA 6.1.</b> Valores dos atributos mecânicos – resistência à tração ( $\sigma$ ), alongação na ruptura ( $\mathcal{E}$ ) e módulo de elasticidade ( $E$ ) – e da solubilidade em água dos filmes de carboximetilcelulose (CMC) e caseína (CA). Diferentes índices indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dentro da mesma coluna.....	40
<b>TABELA 6.2.</b> Valores dos atributos mecânicos –resistência a tração ( $\sigma$ ), alongação na ruptura ( $\mathcal{E}$ ) e módulo de elasticidade ( $E$ )– dos corpos de prova do filme de CMC no sentido paralelo e perpendicular à laminação e em diferentes velocidades de laminação. Diferentes índices indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dentro da mesma coluna.....	45
<b>TABELA 6.3.</b> Valores dos atributos mecânicos e afinidade com a água-permeabilidade ao vapor de água ( $PVA$ ), ângulo de contato ( $AC$ ) grau de intumescimento ( $GI$ ) e grau de solubilidade ( $GS$ ). Os valores de $GI$ e $GS$ foram	

obtidos após 24h e o AC após 30 s de análise. Diferentes índices indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dentro da mesma coluna.....49

**TABELA 6.4.** Valores da diferença das intensidades ( $\Delta I$ ) de transmitância entre a face delaminada e a face externa das camadas de caseína e carboximetilcelulose (CMC). Os números de ondas selecionadas referem-se à vibração de ligações típicas de cada matriz polimérica.....54

**TABELA 6.5.** Valores dos ângulos de contato dos filmes monocamadas de caseína (CA), carboximetilcelulose (CMC) e zeína (ZN) nas diferentes composições em relação aos solventes água, glicerol e tolueno. Os valores correspondem a 30 s de análise.....65

**TABELA 6.6.** Valores dos atributos mecânicos resistência à tração ( $\sigma$ ), alongação na ruptura ( $\mathcal{E}$ ), módulo de elasticidade ( $E$ ) e força máxima de rasgo ( $F_{rasgo}$ ). Os valores de  $F_{rasgo}$  foram normalizados pelas espessuras dos filmes. Diferentes índices indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dentro da mesma coluna.....77

**TABELA 6.7.** Valores das temperaturas de *onset* ( $T_{onset}$ ) para os filmes mono, bi e multicamadas.....78

**TABELA 6.8.** Valores dos parâmetros colorimétricos ( $a^*$ ,  $b^*$  e  $L^*$ ), da diferença de cor total ( $\Delta E$ ) e do índice de alvura (IA).....80

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 2.1.</b> Principais aminoácidos da composição da caseína.....	4
<b>FIGURA 2.2.</b> Estrutura química da carboximetilcelulose forma de um sal sódico (Lin et al., 2005).....	5
<b>FIGURA 2.3.</b> Principais aminoácidos da composição da zeína.....	6
<b>FIGURA 2.4.</b> Mecanismo de formação da ligação cruzada entre a carboximetilcelulose (CMC) e o ácido cítrico (Modificado de Ghorpade et al., (2017)).....	7
<b>FIGURA 2.5.</b> Mecanismo de reação de reticulação entre o ácido tânico e uma proteína (modificado de Alavarse et al., (2022)). .....	8
<b>FIGURA 2.6.</b> (a) Esquema da máquina de <i>casting</i> contínuo (modificado de Irfan et al., (2016)), (b) imagem real da máquina utilizada na produção dos filmes bicamadas, (c-d) imagens da etapa de laminação da solução polimérica por uma faca e (e) etapa final do processo em que os filmes secos são enrolados em rolos.....	10
<b>FIGURA 2.7.</b> (a) Esquema do arranjo experimental da técnica de deposição por sopro (modificado de Medeiros et al., (2009)), (b) representação do corte transversal do bocal e das agulhas concêntricas e a ilustração do cone de solução (modificado de Oliveira et al., (2013)), (c) sistema real utilizado para a aspersão da camada de zeína sobre os filmes bicamadas e (d) imagem de filmes de caseína depositados com aspersão ou fibras de zeína devido a mudanças na concentração da solução proteica. ....	11
<b>FIGURA 2.8.</b> (a) Esquema do aparato experimental da técnica de microscopia de força atômica (modificado de Zeng et al., (2012)) e (b) imagem MEV de uma sonda coloidal sobre o cantiléver (autoria própria).....	12
<b>FIGURA 2.9.</b> (a) Representação da posição $\Delta z_p$ do piezo, da distância $\Delta z_c$ de deflexão do cantiléver e da separação $D$ entre a sonda e o substrato e (b) curva força-distância teórica e as respectivas interações entre uma sonda e uma superfície plana (modificado de Ralston et al., 2005).....	13
<b>FIGURA 3.1.</b> (a) Representação de um filme multicamada destacando o papel de bloqueio da luz UV e os efeito de barreira à umidade e ao oxigênio de cada camada e, (b) esquema da difusão de umidade e oxigênio através de diferentes	

camadas com permeabilidades distintas. (Imagens retiradas de Pasquier et al., (2022)).....	15
<b>FIGURA 5.1.</b> Esquema da produção dos filmes multicamadas por meio da combinação das técnicas de <i>casting</i> contínuo e deposição por sopro em solução.....	23
<b>FIGURA 5.2.</b> Esquema e nomenclatura atribuída para as faces dos filmes bicamadas.....	26
<b>FIGURA 5.3.</b> Representação das componentes da tensão superficial envolvidas em uma medida de ângulo de contato. $\gamma_{SV}$ é a tensão entre o sólido e o ar, $\gamma_{LV}$ é a tensão entre o líquido e o ar e $\gamma_{SL}$ é a tensão entre o sólido e o líquido.....	29
<b>FIGURA 5.4.</b> Corpos de prova dos testes de tração uniaxial e de rasgo e as respectivas direções de aplicação da força.....	32
<b>FIGURA 5.5.</b> Esquema dos testes de delaminação utilizando um texturômetro.....	32
<b>FIGURA 5.6.</b> (a) Esquema e (b) imagem do filme bicamada com fitas adesivas colocadas em ambas as superfícies dos filmes para a realização do teste qualitativo de adesão.....	33
<b>FIGURA 6.1.</b> (a) Curvas do potencial Zeta em função do pH das soluções aquosas de caseína e CMC e (b) imagens das soluções de caseína em água nos diferentes pH e representação esquemática da protonação e desprotonação das proteínas quando abaixo, acima e no ponto isoelétrico.....	38
<b>FIGURA 6.2.</b> Imagens dos filmes de (a) carboximetilcelulose e (b) caseína produzidos por <i>casting</i> de bancada.....	39
<b>FIGURA 6.3.</b> (a-b) Curvas da viscosidade em função da taxa de cisalhamento e (c-d) curvas logarítmicas da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para soluções de CMC e caseína em diferentes concentrações. Os valores de índice de fluxo ( $n$ ) correspondem ao coeficiente linear das curvas logarítmicas. ....	43
<b>FIGURA 6.4.</b> (a) Sistema de laminação da máquina de <i>casting</i> contínuo e (b) representação do alinhamento das cadeias poliméricas devido ao cisalhamento promovido pela etapa de laminação.....	44

**FIGURA 6.5.** (a-b) Curvas reológicas da solução polimérica de CMC com destaques das velocidades angulares avaliadas que correspondem diferentes viscosidade e taxa de cisalhamento. (c) A equação descrita relaciona a velocidade angular com a velocidade escalar utilizada durante a laminação dos filmes. (d) A tabela mostrada apresenta os valores das propriedades reológicas atreladas às velocidades mencionadas. (e) O esquema representa a obtenção dos corpos de prova nas direções paralela e perpendicular à direção de laminação. ....45

**FIGURA 6.6.** (a) Imagens dos filmes monocamadas e bicamadas produzidos a partir da combinação de CMC e caseína. (b) A mistura de ambos os polímeros resultou em uma solução esbranquiçada a qual apresentou um aspecto não homogêneo durante a laminação no processo de *casting* contínuo. (c) Os filmes obtidos a partir da mistura foram opacos e com defeitos. (d) Pacotes selados à quente utilizando os filmes bicamadas, com a face de caseína voltada para o interior, permitiram a contenção de óleo de soja por mais de 4 semanas.....47

**FIGURA 6.7.** (a) Imagem do filme bicamada delaminado e o (b) esquema do teste qualitativo de delaminação em que um fita adesiva foi colada em cada face. As imagens mostram os filmes bicamadas de caseína e carboximetilcelulose sem adição do ácido tânico (CA/CMC), com a adição do ácido tânico na camada de caseína (CA+AT/CMC) e com a adição de ácido tânico na camada de CMC (CA/CMC+AT) após a delaminação.....48

**FIGURA 6.8.** Imagens MEV-FEG da secção transversal dos filmes bicamadas de CA-CMC nas diferentes composições.....50

**FIGURA 6.9.** Relação entre os valores do grau de intumescimento e força de delaminação dos filmes bicamadas CA-CMC nas diferentes composições. O teste de delaminação foi feito segundo esquematizado na figura.....51

**FIGURA 6.10.** Valores do ângulo de contato para as faces externas e delaminadas de ambas as camadas do filme bicamada CA-CMC. Os valores correspondem a 30 s de análise. Diferentes índices indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) no mesmo gráfico.....52

- FIGURA 6.11.** (a) Esquema das faces externas e delaminada utilizadas nas análises e (b) imagens MEV das superfícies das faces externas e delaminadas de ambas as camadas após a delaminação do filme CA-CMC<sub>15/30</sub>.....53
- FIGURA 6.12.** Permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes bicamadas para as diferentes composições entre caseína (CA) e carboximetilcelulose (CMC). Diferentes índices indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) no mesmo gráfico.....56
- FIGURA 6.13.** Espectros no infravermelho dos filmes bicamadas. Espectros normalizados pela soma das intensidades.....57
- FIGURA 6.14.** Espectros de absorção de luz na região do ultravioleta e visível dos filmes bicamadas.....59
- FIGURA 6.15.** (a) Curvas tensão-deformação representativas dos filmes bicamadas e (b) imagem da quebra antecipada da camada de caseína observada durante os testes mecânicos de tração uniaxial.....60
- FIGURA 6.16.** Atributos mecânicos – resistência à tração ( $\sigma$ ), alongação na ruptura ( $\mathcal{E}$ ) e módulo de elasticidade ( $E$ ) – dos filmes bicamadas. Diferentes índices indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) no mesmo gráfico.....60
- FIGURA 6.17.** Análises em QCM-D referentes a deposições subsequentes de soluções poliméricas sobre um sensor recoberto com sílica. As curvas representam (a e c) as variações das frequências do terceiro harmônico e (b e d) os dados de dissipação em função do tempo. Os experimentos associados às curvas pretas foram realizados em água, e as curvas vermelhas foram realizadas em etanol 60%.....62
- FIGURA 6.18.** (a) Valores da tensão superficial total ( $\gamma_s$ ) para as diferentes composições dos filmes, (b) componentes Liftshitz-van der Waals ( $\gamma_{sv}^{LW}$ ) plotado em função das componentes ácido-base de Lewis ( $\gamma_{sv}^{AB}$ ), (c) razão entre as componentes polares e apolares ( $\gamma_{sv}^{AB} / \gamma_{sv}^{LW}$ ) versus as componentes polares ( $\gamma_{sv}^{AB}$ ), (d) componente base de Lewis ( $\gamma_s^-$ ) plotado em função da componente ácido de Lewis ( $\gamma_s^+$ ) e (e) valores calculados do trabalho total de adesão ( $Wa$ ) e de suas componentes apolares ( $Wa^{LW}$ ) e polares ( $Wa^{AB}$ ) para os filmes de bicamada (d). As linhas pontilhadas representam a curva onde os valores das componentes são iguais ( $\gamma_x = \gamma_y$ ).....67

- FIGURA 6.19.** (a) Curvas da viscosidade em função da taxa de cisalhamento para soluções de zeína em diferentes concentrações e os respectivos (b) regimes de comportamento de viscosidade das soluções quando submetidas a uma taxa de cisalhamento de  $200 \text{ s}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .....70
- FIGURA 6.20.** (a-e) Imagens de filmes monocamadas de caseína depositadas com aspersão ou fibras de zeína (ZN), com ou sem a incorporação de ácido tânico (AT), e (f-o) imagens MEV das superfícies dos filmes. A descrição acima remete a concentração da solução de zeína, a presença do ácido tânico na formulação e o volume de solução depositada sobre um filme monocamada de caseína com dimensões de  $13 \text{ cm} \times 22 \text{ cm}$ .....72
- FIGURA 6.21.** (a-b) Imagens dos filmes multicamadas e de suas respectivas (c-d) imagens MEV da secção transversal.....74
- FIGURA 6.22.** Espectros FTIR dos filmes controles e multicamadas (a)  $\text{ZN}_{\text{AT-CA-CMC}}_{15/5}$  e (b)  $\text{ZN}_{\text{AT-CA-CMC}}_{15/30}$ . Espectros normalizados pela soma das intensidades.....75
- FIGURA 6.23.** (a) Gráficos referentes as medidas de ângulo de contato após 30 s de análise referente à face da última camada depositada, (b) permeabilidade ao vapor de água (PVA) tendo a última camada depositada voltada para o interior da cela contendo água e (c) grau de intumescimento após 24 h em UR= 50 % à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Diferentes índices indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) no mesmo gráfico.....75
- FIGURA 6.24.** Curvas termogravimétricas e suas respectivas derivadas para os filmes mono, bi e multicamadas.....78
- FIGURA 6.25.** Espectros de transmitância de luz na região do ultravioleta e visível dos filmes bicamadas.....79
- FIGURA 6.26.** Imagens dos testes de disco difusão para as bactérias *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*) dos filmes mono, bi e multicamadas.....81
- FIGURA 6.27.** Mecanismo de reação de acoplamento entre uma partícula carboxilada e uma proteína utilizando os reagentes EDC/NHS via acoplamento mediado por carbodiimida (modificado de Xu et al., (2022)). EDC: cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida; NHS: N-hidroxisuccinimida.....83

- FIGURA 6.28.** Imagens MEV da sonda modificada com caseína (a-c) antes e (d-f) após as medidas de força.....83
- FIGURA 6.29.** Representação do mapa de força de *pull-off*, histograma e curvas força-distância adquiridas através de medidas de força por AFM. Cada pixel no mapa corresponde a uma curva força-distância, no qual as forças de *pull-off* são avaliadas na forma de um histograma.....85
- FIGURA 6.30.** Histogramas das distribuições de forças de *pull-off* entre sondas não modificadas e os substratos de caseína (CA), zeína (ZN) e carboximetilcelulose contendo 30% de ácido tânico (CMC<sub>30%AT</sub>). As distribuições de força correspondem aos tempos de contato de 0, 5 e 10 s. Os valores entre parênteses são a média aritmética e os desvios padrões das forças de *pull-off*.....86
- FIGURA 6.31.** Histogramas das distribuições de forças de *pull-off* entre sondas modificadas com caseína (CA<sub>sonda</sub>) e os substratos de caseína (CA), zeína sem (ZN) e com a incorporação de ácido tânico (ZN<sub>15%AT</sub>) e carboximetilcelulose sem (CMC), contendo 5% (CMC<sub>5%AT</sub>) e 30% de ácido tânico (CMC<sub>30%AT</sub>). As distribuições de força correspondem aos tempos de contato de 0, 5 e 10 s. Os valores entre parênteses são a média aritmética e os desvios padrões das forças de *pull-off*.....87
- FIGURA 6.32.** Curvas representativas de força-distância para as medidas entre a sonda modificada com caseína (CA<sub>sonda</sub>) e substratos de (a) caseína (CA) e zeína sem (ZN) e com a incorporação de ácido tânico (ZN<sub>15%AT</sub>) e (b) carboximetilcelulose sem (CMC), contendo 5% (CMC<sub>5%AT</sub>) e 30% de ácido tânico (CMC<sub>30%AT</sub>). As curvas correspondem a medidas de força com tempo de contato de 10 s.....89
- FIGURA 6.33.** Histogramas das distribuições das energias de adesão entre sondas não modificadas e substratos de caseína (CA), zeína sem (ZN) e com a incorporação de ácido tânico (ZN<sub>15%AT</sub>) e carboximetilcelulose sem (CMC), contendo 5% (CMC<sub>5%AT</sub>) e 30% de ácido tânico (CMC<sub>30%AT</sub>). As distribuições de força correspondem aos tempos de contato de 0 s, 5 s e 10 s. Os valores entre parênteses são a média aritmética e os desvios padrões das energias de adesão.....91

**FIGURA 6.34.** Histogramas das distribuições das energias de adesão entre sondas modificadas com caseína ( $CA_{\text{sonda}}$ ) e substratos de caseína (CA), zeína sem (ZN) e com a incorporação de ácido tânico ( $ZN_{15\%AT}$ ) e carboximetilcelulose sem (CMC), contendo 5% ( $CMC_{5\%AT}$ ) e 30% de ácido tânico ( $CMC_{30\%AT}$ ). As distribuições de força correspondem aos tempos de contato de 0 s, 5 s e 10 s. Os valores entre parênteses são a média aritmética e os desvios padrões das energias de adesão.....92

## RESUMO

MATERIAIS BIOPOLIMÉRICOS MULTICAMADAS PRODUZIDOS POR *CASTING* CONTÍNUO E DEPOSIÇÃO POR SOPRO EM SOLUÇÃO. Alinhados com a crescente demanda por estratégias sustentáveis que visam à minimização dos impactos ambientais causados por materiais plásticos, os polímeros naturais biodegradáveis destacam-se como substitutos, ainda que parciais, dos polímeros oriundos de fontes petroquímicas, principalmente os não biodegradáveis. Neste trabalho, vislumbrou-se, de forma pioneira, a conformação de materiais biopoliméricos multicamadas utilizando técnicas de processamento contemporâneas denominadas evaporação de solvente em modo contínuo (ou *casting* contínuo) e deposição por sopro em solução (DSS). O trabalho teve como foco a multiestruturação de diferentes biopolímeros de forma a viabilizar suas compatibilizações e a combinação de suas propriedades em um sistema contendo três camadas. Para tal, filmes bicamadas foram inicialmente produzidos a partir de laminações consecutivas de uma camada suporte de carboximetilcelulose (CMC) e uma camada de caseína, esta última destacada pelas suas propriedades de barreira. Sobre esta, uma camada hidrofóbica de zeína foi aspergida com o intuito de diminuir a susceptibilidade do material à umidade. O conceito-chave neste sistema é a compatibilidade interfacial entre as camadas biopoliméricas, o qual assegura uma relação sinérgica entre os componentes. Investigou-se o uso do ácido tânico (AT) na promoção da adesão interfacial na bicamada, assim como, o efeito das proporções deste com o reticulante 1,1,4,4- ácido butanotetracarboxílico (BTCA), incorporados na camada de CMC. Além disso, estudaram-se os aspectos reológicos adequados para a deposição da camada de zeína e sua influência na interação com a água. Os materiais multicamadas foram extensivamente caracterizados segundo suas características mecânicas, de barreira, térmicas, morfológicas e estruturais, assim como das energias de adesão interfaciais pela técnica de microscopia de força atômica (AFM). O estudo realizado mostrou que a estruturação dos filmes em multicamadas é uma estratégia para a combinação de proteínas e polissacarídeos em um material contendo uma interface que abrange toda sua extensão bidimensional. Também, permitiu a compreensão dos aspectos que influenciam a compatibilidade entre os biopolímeros e as forças responsáveis

pelas interações interfaciais. **Palavras-chave:** biopolímeros; materiais multicamadas; deposição por sopro em solução; *casting* contínuo; forças de adesão; microscopia de força atômica.

## ABSTRACT

PRODUCTION OF MULTILAYER BIOPOLYMERIC MATERIALS BY CONTINUOUS CASTING AND SOLUTION BLOW DEPOSITION. In line with the growing demand for sustainable strategies to minimize the environmental impacts caused by plastics, natural and biodegradable polymers emerge as substitutes, albeit partially, for petrochemical polymers that are non-biodegradable. In this work, we pioneered the development of multilayer biopolymeric materials using contemporary processing techniques as continuous solvent evaporation (or continuous casting) and solution blow deposition (SBD). The work focused on multistructuring different biopolymers to promote a compatible system with their properties combined in a system containing three layers. To achieve this, bilayer films were initially produced by consecutive lamination steps of carboxymethylcellulose (CMC) as a support layer and casein layer, which exhibits good barrier properties. Additionally, a hydrophobic layer of zein was sprayed on the bilayer film to reduce the material's susceptibility to humidity. The key concept of this system is the interfacial compatibility between biopolymeric layers, which ensures a synergic relationship between the components. Incorporating tannic acid (TA) and 1,1,4,4-butanetetracarboxylic acid (BTCA) into the CMC layer, along with their respective proportions, was investigated to promote interfacial adhesion of the bilayer. The appropriate rheological aspects for the zein deposition on the bistructured films and its influence on the interaction with water were studied. The multilayer materials were extensively characterized according to their generic characteristics (mechanical, barrier, thermal, morphological, and structural), and the interfacial adhesion energies were quantified using atomic force microscopy (AFM). This research showed that multilayer films are a strategy for combining proteins and polysaccharides in a material with an interface that covers its entire two-dimensional extension. Also, the study allowed for the understanding of the aspects that influence the compatibility of biopolymers and the forces responsible for interfacial interactions. **Keywords:** biopolymers; multilayer materials; solution blow deposition; continuous casting; adhesion forces; atomic force microscopy.

## SUMÁRIO

FOLHA DE APROVAÇÃO.....	ii
DEDICATÓRIA.....	ii
AGRADECIMENTOS .....	v
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABELAS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT .....	xx
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	3
2.1. Biopolímeros.....	3
2.2. Caseína.....	4
2.3. Carboximetilcelulose .....	5
2.4. Zeína.....	6
2.5. Reticulantes.....	7
2.6. Filmes multiestruturados biopoliméricos.....	8
2.7. <i> Casting </i> contínuo.....	9
2.8. Deposição por sopro em solução .....	10
2.9. Medidas de força por microscopia de força atômica (AFM) .....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
4. OBJETIVO.....	18
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19

5.1. Reagentes.....	19
5.2. Metodologia.....	19
5.2.1. Produção dos filmes de CMC e caseína por <i>casting</i> de bancada – Otimização da composição.....	19
5.2.2. Soluções filmogênicas (SFs) para <i>casting</i> contínuo.....	21
5.2.3. Produção dos filmes monocamada e bicamadas CA-CMC por <i>casting</i> contínuo.....	22
5.2.4. Produção da camada de zeína por deposição por sopro em solução (DSS).....	24
5.2.5. Potencial Zeta <i>versus</i> pH .....	25
5.2.6. Espectroscopia no infravermelho (FTIR) .....	26
5.2.7. Microbalança de cristal de quartzo com monitoramento de dissipação de energia (QCM-D).....	26
5.2.8. Espectroscopia nas regiões do ultravioleta e do visível (UV-VIS).....	27
5.2.9. Colorimetria.....	27
5.2.10. Solubilidade e intumescimento em água.....	28
5.2.11. Ângulo de contato e energia livre de superfície (ELS) .....	28
5.2.12. Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	29
5.2.13. Análise reológica.....	30
5.2.14. Termogravimetria (TG).....	31
5.2.15. Ensaio mecânicos.....	31
5.2.16. Teste qualitativo de delaminação dos filmes bicamadas CA-CMC ..	32
5.2.17. Espessuras dos filmes .....	33
5.2.18. Microscopia eletrônica de varredura .....	33
5.2.19. Teste antimicrobiano de disco difusão .....	33
5.2.20. Medidas de força por microscopia de força atômica (AFM) .....	34

5.2.20.1. Soluções poliméricas para produção de substratos .....	34
5.2.20.2. Produção dos substratos .....	35
5.2.20.4. Modificação da sonda coloidal carboxilada .....	35
5.2.20.5. Medições de força-distância AFM .....	36
5.2.21. Análise estatística dos dados .....	36
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
6.1. Produção da bicamada caseína-carboximetilcelulose por <i>casting</i> contínuo.....	37
6.1.1. Otimização das composições dos filmes monocamadas de CMC e caseína.....	37
6.1.2. Otimização dos parâmetros para obtenção de filmes por <i>casting</i> contínuo.....	41
6.1.3. Produção de filmes bicamadas de caseína e CMC (CA-CMC) por <i>casting</i> contínuo.....	46
6.1.4. Avaliação dos efeitos dos reticulantes nas interações interfaciais e nas propriedades dos filmes.....	49
6.1.5. Estudo da compatibilidade entre os biopolímeros por QCM-D.....	61
6.1.6. Cálculo das energias livre de superfície (ELS) e dos trabalhos de adesão pelo modelo teórico de vOCG.....	64
6.2. Produção da camada de zeína (ZN) por deposição por sopro em solução (DSS).....	69
6.2.1. Otimização das condições de obtenção da camada de ZN por DSS.	69
6.2.2. Caracterização dos filmes multicamadas (ZN-CA-CMC) .....	73
6.3. Medidas das forças de interação entre os biopolímeros por microscopia de força atômica (AFM).....	81
6.3.1. Modificação da sonda coloidal carboxilada de AFM com caseína .....	82
6.3.2. Medidas de força por AFM .....	84
7. CONCLUSÕES .....	94

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	96
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97
APÊNDICE A.....	118
APÊNDICE B.....	119
APÊNDICE C .....	120

## 1. INTRODUÇÃO

Polímeros sintéticos são utilizados em larga escala devido às suas vantajosas relações entre custo e benefício, às suas versatilidades, aos seus grandes potenciais de aplicação e à facilidade de suas rotas de obtenção. A maioria dos polímeros sintéticos apresenta-se satisfatória no tocante às propriedades essenciais às suas aplicações em massa, conferindo a eles o rótulo de “convencionais” nos setores de embalagens, automobilísticos e construção civil, dentre outros (Ahmadzadeh & Khaneghah, 2020). Entretanto, o uso demasiado de tais polímeros, acumulado a seus descartes incorretos, tem acarretado grande geração de resíduos e importantes consequências ambientais (López De Dicastillo et al., 2016). As embalagens alimentícias de uso único representam uma parte significativa do material descartado e têm chamado atenção devido à sua curta vida útil e à dificuldade de reciclagem, seja pela contaminação com resíduos alimentares ou pela complexidade de suas composições (Alias et al., 2022).

O desenvolvimento de materiais poliméricos oriundos de fontes naturais renováveis e que sejam competitivos com as embalagens convencionais requer que eles apresentem desempenhos compatíveis (Pasquier et al., 2022). Desta forma, as escolhas das matérias-primas, as combinações entre elas e os métodos de processamento têm sido abordadas na direção de obter materiais mais eficientes e produzidos em larga escala (Ossio et al., 2023). Os principais biopolímeros utilizados são as proteínas e os polissacarídeos, os quais podem advir de fontes animal, vegetal ou microbiana (Vitorazi et al., 2014). Estes são comumente utilizados na formação de filmes poliméricos devido às suas características de biodegradabilidade, baixa toxicidade e alta barreira a gases e aromas, dentre outras (Wei & Huang, 2019). Por outro lado, o uso da maioria dos biopolímeros apresenta limitações, como baixa estabilidade térmica, alta permeabilidade à umidade, baixa resistência mecânica e alto custo de obtenção comparados aos polímeros convencionais (Pasquier et al., 2022). Desta forma, estratégias que contornem tais implicações têm sido empregadas, como produção de blendas poliméricas, dispersão de nanoestruturas em materiais compósitos, produção de multicamadas com materiais com propriedades de interesse e modificação química dos polímeros (Peelman et al., 2013, Abdullah et al., 2022).

Materiais multicamadas biopoliméricos é uma estratégia que permite a combinação de diferentes polímeros com propriedades específicas visando o

aperfeiçoamento e a otimização do sistema para uma aplicação de interesse (La Fuente Arias et al., 2021). No setor de embalagens alimentícias, as multicamadas são aplicadas na obtenção de produtos com melhor resistência mecânica, barreira a gases e umidade, propriedades ópticas e resistência à água. A escolha dos polímeros para compor essas estruturas multicamadas é de grande relevância, pois influencia diretamente o desempenho do produto final, a compatibilidade entre os componentes e o processo de fabricação (Cerqueira et al., 2018).

A CMC é um polímero derivado da celulose, solúvel em água que possui a capacidade de formar soluções viscosas e gelatinosas, o que a torna ideal para aplicações como espessante, estabilizante e agente de formação de gel. O polissacarídeo é amplamente aplicado em formulações de medicamentos, na composição de produtos alimentícios e como agente de retenção de água em cosméticos. Sua versatilidade faz da CMC um aditivo valioso em uma ampla gama de produtos (de Melo Fiori et al., 2019; Esteghlal et al., 2018). A caseína é a principal proteína encontrada no leite, representando cerca de 80%, organizada na forma de micelas que estabilizam o fosfato de cálcio e as mantém em suspensão em meio aquoso. Devido à sua natureza anfifílica, a caseína pode ser utilizada como agente compatibilizante e em aplicações como adesivos e tintas, além de ser amplamente explorada na indústria alimentícia, principalmente na produção de queijos e outros produtos lácteos (Hammam et al., 2021; Holt et al., 2013). A zeína, proteína obtida do milho, apresenta um caráter hidrofóbico o que a torna útil em aplicações como revestimentos de alimentos e embalagens biodegradáveis. Sua composição de aminoácidos confere à zeína características de interesse, possibilitando a obtenção de embalagens com proteção contra umidade e oxidação, além de resistência a gorduras e óleos (Mouzakitis et al., 2022; Zhang et al., 2015).

O emprego de técnicas escalonáveis no processamento destes materiais permite a obtenção de materiais mais homogêneos, alta produtividade e implementação industrial (Otoni et al., 2021). A evaporação de solvente em modo contínuo (ou *casting* contínuo) para a produção de filmes possibilita a obtenção de filmes finos autossuportáveis a partir da laminação de uma solução polimérica sobre um substrato permitindo uma maior eficiência da secagem e economia de tempo (Otoni et al., 2021). A deposição por meio da aspensão de uma solução possibilita a formação de uma camada polimérica diretamente sobre o sistema de interesse (Oliveira et al., 2013).

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Biopolímeros

Polissacarídeos e proteínas são macromoléculas orgânicas com estrutura polimérica que, na maioria dos casos, são atóxicos, biocompatíveis e solúveis em água (Abdullah et al., 2022). Dos polissacarídeos, destacam-se amido, celulose, quitosana, alginato e pectina. As proteínas comumente utilizadas são gelatina, zeína, caseína, colágeno, whey e glúten (Beikzadeh et al., 2020).

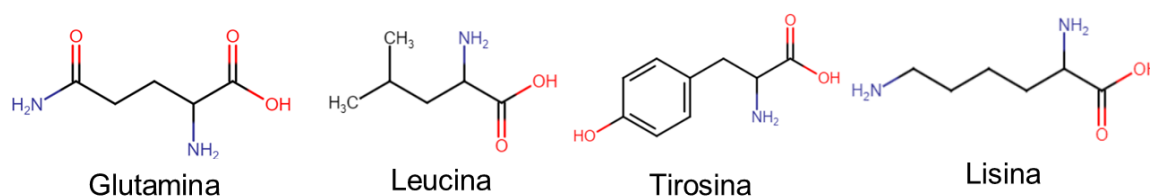
A escolha dos tipos de polímeros naturais é guiada pelos atributos finais do material desejado. Alguns biopolímeros apresentam propriedades como atividade antimicrobiana, caráter hidrofóbico ou hidrofílico, maior ou menor exposição de grupos funcionais, alta ou baixa solubilidade em água, entre outras (Noreen et al., 2020). Outro fator importante refere-se à sua processabilidade, já que na maioria das vezes, é necessário manipular as características do biopolímero para sua aplicação final (Pang et al., 2019).

Das aplicações exploradas recentemente, a literatura mostra diferentes vertentes para o uso polímeros naturais como desenvolvimento de embalagens alimentícias ativas e/ou comestíveis (Grzebieniarz et al., 2023), filtração de água (Li et al., 2022), curativos e materiais antissépticos (Sheokand et al., 2023), engenharia de tecido (Zha et al., 2020), liberação controlada de fármacos (Pacheco et al., 2020) e até mesmo sensores (Piccinin et al., 2024).

A celulose e seus derivados têm ganhado destaque no desenvolvimento de materiais biopoliméricos devido às suas excelentes propriedades mecânicas, superfície altamente funcionalizável, e à formação de uma rede tridimensional interconectada por meio de ligações de hidrogênio (Heinze et al., 2018). No entanto, a celulose é um material de difícil processabilidade, uma vez que apresenta alta coesão entre as cadeias, o que limita sua solubilidade e manuseio. Deste modo, o uso de derivados é uma opção que permite o processamento da matéria com o aproveitamento das características da celulose, como é o caso da carboximetilcelulose (CMC). A CMC é composta por uma cadeia de celulose, no qual os grupos hidroxilas são substituídos por carboximetilas podendo apresentar diferentes graus de substituição (Heinze et al., 2018).

## 2.2. Caseína

A caseína é uma fosfoproteína obtida do leite, representando cerca de 80% do seu conteúdo proteico total, obtida pela precipitação em meio ácido ou por meio de ação de enzimas. Devido ao alto grau de fosforilação dos resíduos de serina, a proteína exibe elevada afinidade por cátions bivalentes, como cálcio e magnésio (Wusigale et al., 2020). A caseína é composta por várias frações, sendo as principais no leite bovino a  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseína, cada uma com propriedades distintas. A  $\alpha$ -caseína corresponde a 10% do total de caseínas e é a fração mais fosforilada, com diferentes graus de modificação entre  $\alpha_{S1}$ - e  $\alpha_{S2}$ -caseína, o que afeta sua sensibilidade ao cálcio. A  $\beta$ -caseína representa 35% das caseínas sendo a mais hidrofóbica dentre elas, contribuindo para o caráter anfifílico da proteína. Já a  $\kappa$ -caseína corresponde a 15% das caseínas e se diferencia das outras por ser glicosilada, apresentando forte caráter anfifílico devido à separação entre as extremidades N-terminal hidrofóbica e C-terminal hidrofílica (Holt et al., 2013). Os aminoácidos majoritariamente presentes na estrutura proteica são glutamina (10%), prolina (8%), leucina (8%) e lisina (6%) (McMeekin, 1949) (**FIGURA 2.1**).



**FIGURA 2.1.** Principais aminoácidos da composição da caseína.

Além disso, as caseínas são naturalmente desnaturadas, devido ao alto teor de prolina, que por sua vez impede a formação de estruturas secundárias e inibe sua organização em conformações proteicas funcionais (Wusigale et al., 2020). Desta forma, a proteína se organiza na forma de micelas, com diâmetro médio de 120 nm (Rehan et al., 2019), as quais são essenciais para a estabilidade e solubilidade da caseína no leite. Estas micelas são constituídas basicamente pelas diferentes frações de caseína, água e sais minerais. Tais sistemas coloidais são caracterizados como estruturas supramoleculares dinâmicas, que se adaptam em função das mudanças nas condições físico-químicas do meio, como pH, temperatura e força iônica (Rehan et al., 2019). Sua principal função no leite, além de fonte de aminoácidos, é atuar como

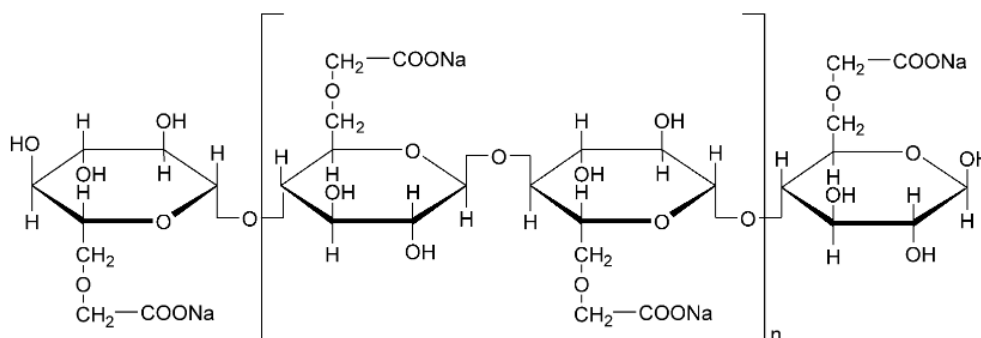
vetor de cálcio, o qual se encontra na forma de fosfato de cálcio ligado aos resíduos fosforilados (Holt et al., 2013).

A estrutura micelar da caseína ainda permanece em debate, sendo os modelos mais utilizados as submicelas e os *nanoclusters*. O modelo de submicelas considera que a partícula coloidal é dividida em subunidades, com  $\kappa$ -caseína localizada na superfície, e os aglomerados de fosfato de cálcio atuando como agentes de ligação entre as submicelas (Walstra, 1999). Já o modelo de *nanocluster*, proposta por impedimento estérico (*“brush repulsion”*) associados à  $\kappa$ -caseína localizada na superfície das partículas. Entretanto, a dispersão coloidal pode ser facilmente desestabilizada adicionando-se etanol ou alterando-se o pH da solução para valores abaixo do ponto isoelétrico da caseína (pI 4,6) (Rehan et al., 2019). Tal fenômeno está associado à desidratação e a alterações das cargas superficiais, causando a coalescência das micelas de caseína (Mikheeva et al., 2003).

Na indústria de alimentos, a caseína é amplamente utilizada devido às suas propriedades funcionais, como emulsificação, gelificação, texturização e retenção de água. Esses atributos tornam a caseína um ingrediente versátil em produtos lácteos, como queijos e iogurtes (Hammam et al., 2021).

### 2.3. Carboximetilcelulose

A carboximetilcelulose (CMC) é polieletrólito aniônico obtido pela modificação química da celulose. O derivado de polissacarídeo é composto por unidades de anidroglicose com hidroxilas substituídas por carboxilas, formando um éter celulósico (**FIGURA 2.2**), o que a torna solúvel em meio aquoso (de Melo Fiori et al., 2019).

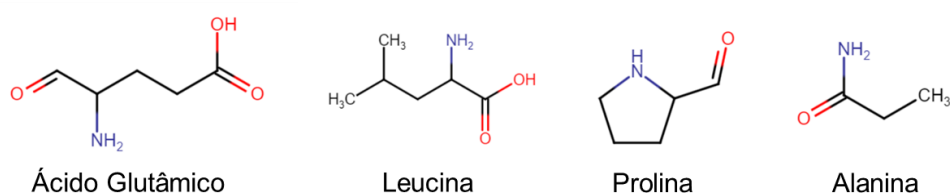


**FIGURA 2.2.** Estrutura química da carboximetilcelulose, em sua forma de sal sódico (Lin et al., (2005)).

A CMC é o derivado da celulose mais utilizado por ser bastante versátil devido à sua capacidade de formar soluções viscosas, baixa toxicidade, biocompatibilidade, dentre outras características que a tornam interessante para aplicação nos setores alimentício, farmacêutico, cosmético, têxtil e de higiene pessoal (Esteghlal et al., 2018). Adicionalmente, a CMC exibe uma excelente capacidade de formação de matrizes filmogênicas com atributos mecânicos compatíveis com o setor de embalagens (Zennifer et al., 2021).

## 2.4. Zeína

A zeína é uma proteína prolamina predominantemente encontrada no endosperma do milho, representando cerca de 50% a 60% das proteínas totais do grão. Sua baixa toxicidade e biocompatibilidade acarretam uma ampla aplicação nos setores farmacêutico e médico, além de ser considerada segura para a ingestão (Mouzakitis et al., 2022; Zhong & Jin, 2009). A proteína contém mais de 50% de aminoácidos hidrofóbicos em sua composição, destacando seu alto teor de prolina e glutamina, o que promove um elevado caráter hidrofóbico. Os aminoácidos em maior quantidade na estrutura da zeína são ácido glutâmico (20%), leucina (19%), prolina (10%) e alanina (12%) (Gianazza et al., 1977) (**FIGURA 2.3**). A principal diferença da zeína para a maioria das demais proteínas é sua baixa quantidade de lisina e triptofano (Yuan et al., 2022). A zeína pode ser subclassificada em  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -zeína, já que exibem diferentes sequências de aminoácidos, peso molecular e solubilidade (Zhong & Jin, 2009). Tem solubilidade restrita em solventes orgânicos, como acetona, ácido acético, álcoois aquosos e soluções aquosas alcalinas (Zhang et al., 2015), e baixa solubilidade em água, tendo sido aplicada como filmes e revestimentos biodegradáveis resistentes à umidade. Os filmes de zeína têm mostrado interessantes propriedades de barreira ao oxigênio e ao vapor de água, com potencial de aplicação em embalagens que auxiliam na conservação de alimentos (Mouzakitis et al., 2022).

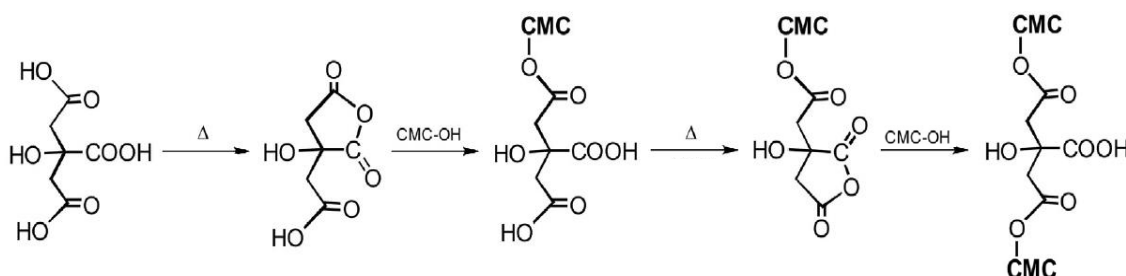


**FIGURA 2.3.** Principais aminoácidos da composição da zeína.

## 2.5. Reticulantes

A reticulação de polímeros é um processo químico no qual as cadeias de polímeros são interligadas por ligações predominantemente covalentes, o que pode ser feito ou não pela introdução de um agente reticulante, formando uma rede tridimensional (Alavarse et al., 2022). Tal reação tem como objetivo aprimorar as propriedades mecânicas, térmicas e químicas dos polímeros, uma vez que proporciona uma maior coesão entre as cadeias poliméricas, restringindo sua mobilidade (Zheng et al., 2017). Para o caso de polímeros naturais hidrossolúveis, a formação de uma rede interconectada tem como principal objetivo diminuir a solubilidade em água, expandindo suas possíveis aplicações industriais.

Os polissacarídeos que apresentam alta disponibilidade de hidroxilas em sua estrutura, como a CMC, pode ser reticulados a partir de uma reação de esterificação com um ácido policarboxílico, como o ácido cítrico e o ácido 1,2,3,4-butanotetracarboxílico (BTCA) (Ghorpade et al., 2017). A **FIGURA 2.4** ilustra a reação de esterificação entre a CMC e o ácido cítrico.



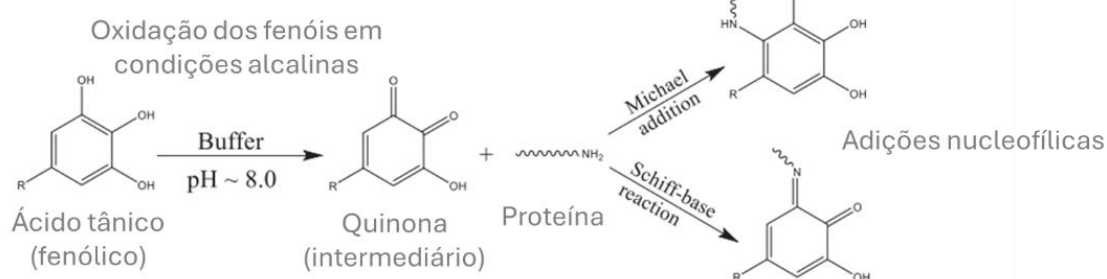
**FIGURA 2.4.** Mecanismo de formação da ligação cruzada entre a carboximetilcelulose (CMC) e o ácido cítrico (Modificado de Ghorpade et al., 2017).

O mecanismo de reação inicia-se com a condensação do ácido cítrico ao ser aquecido, formando um anidrido cíclico intermediário. O ataque nucleofílico da hidroxila da CMC promove a abertura do anel do anidrido resultando em uma ligação éster. A exposição de uma nova unidade carboxílica no intermediário promove a formação de um anidrido intramolecular, que é novamente atacado pela hidroxila da CMC, gerando um diéster (Demitri et al., 2008). Para o uso do BTCA como reticulante, o mecanismo de reação é análogo e apresenta maior eficiência devido ao maior número de carboxilas (Alavarse et al., 2022; Gillingham et al., 1999).

A literatura descreve o uso do hipofosfito de sódio (HPS) como um catalisador da reação de esterificação, o qual atua no enfraquecimento das ligações

de hidrogênio entre os grupos ácidos carboxílicos de forma a favorecer a formação do anidrido cíclico (Feng et al., 2014; Garcia et al., 2014). No entanto, ainda não há um consenso acerca da eficiência do sal, já que há autores que não observaram alteração na eficiência do processo (Azeredo et al., 2015).

Para as proteínas, o ácido tânico (AT) é amplamente utilizado como agente reticulante devido à sua capacidade de formar complexos estáveis com essas macromoléculas. O AT interage com proteínas através de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e ligações covalentes entre os grupos fenólicos do AT e os grupos amina, carboxila e tiol das proteínas. O mecanismo da reação de reticulação de proteínas com o AT ainda não foi totalmente elucidado. A literatura descreve que a reação acontece a partir da oxidação do AT, que gera uma quinona (**FIGURA 2.5**), a qual pode reagir com a proteína via reação de Michael ou por meio da formação de uma base de Schiff (Alavarse et al., 2022).



**FIGURA 2.5.** Mecanismo de reação de reticulação entre o ácido tânico e uma proteína (modificado de Alavarse et al., 2022).

A rota de reação depende das condições do meio, sendo relatado que a reação via adição de Michael ocorre preferencialmente em meio alcalino e aeróbico, enquanto aquela via base de Schiff se dá na presença de oxidantes fortes. A proteína é adicionada ao intermediário por meio de uma adição nucleofílica e a ligação covalente é estabelecida. No entanto, alguns autores observaram desvios nos mecanismos nas condições mencionadas, mas há um consenso acerca da necessidade da presença de oxigênio para o processo oxidativo (Chen et al., 2022).

## 2.6. Filmes multiestruturados biopoliméricos

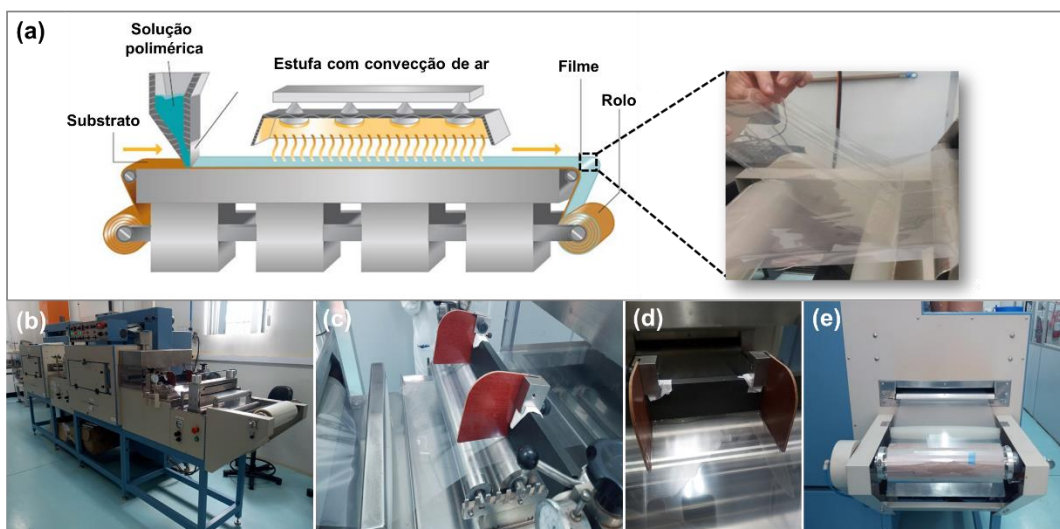
Filmes poliméricos são materiais autossuportáveis e geralmente finos (Grzebieniarz et al., 2023). Para a conformação deste tipo de material é necessário

que haja a formação de uma matriz coesa e contínua, podendo ou não estar solubilizada em solvente (Otoni et al., 2017). A estruturação de filmes em duas (bicamadas), três ou mais (multicamadas) camadas tem como intuito o aprimoramento e a combinação de propriedades de interesse (La Fuente Arias et al., 2023). Os filmes multiestruturados apresentam um *design* estratégico que reúne diferentes polímeros com características de interesse sem que haja perda da continuidade das matrizes, além de apresentar uma interface que abrange toda a extensão bidimensional do sistema (Cerqueira et al., 2018). Para tal, a compatibilidade termodinâmica e, conseqüentemente, a adesão interfacial ditam as relações sinérgicas entre os componentes do sistema (Ajitha & Thomas, 2020; Sarath et al., 2014). As quais ocorrem principalmente por meio de interações eletrostáticas, van der Waals, empilhamento  $\pi$ - $\pi$ , ligações covalentes e ancoragem física (Alavarse et al., 2022).

## 2.7. *Casting* contínuo

A produção dos filmes a partir de uma solução polimérica pode ser feita por diversas técnicas sendo que a mais comum é a de *casting*. Este consiste no espalhamento de uma solução polimérica sobre um substrato para que haja a evaporação do solvente que, quando produzido em batelada, é denominado de descontínuo. Este processo pode ser escalonado a partir do uso de um sistema de laminação contínua que, neste caso, é denominado *casting* contínuo (Otoni et al., 2017). Para tal, faz-se necessário o uso de uma máquina equipada com um substrato (**FIGURA 2.6**), sobre o qual é despejada a solução polimérica, o qual move-se em direção a uma faca com uma distância previamente estabelecida em relação ao substrato, promovendo a laminação. Este processo implica no cisalhamento e na homogeneização da espessura da solução filmogênica sobre o substrato. Em seguida, o substrato é direcionado para estufas de secagem convectiva, onde ocorre a secagem do filme, e posteriormente, o material seco é bobinado (Leite et al., 2020). A viscosidade da solução polimérica é um aspecto importante a ser considerado, visto que esta deve ser viscosa o suficiente para que haja a laminação do material sobre o substrato, garantindo que a espessura do filme formado seja adequada para que o mesmo seja autossuportável (Demay & Agassant, 2021). Já parâmetros operacionais como temperatura de secagem, velocidade do substrato, e distância da lâmina em relação ao substrato (espessura da lâmina úmida) dependem do sistema trabalhado

e afetam principalmente o tempo de produção. Das vantagens da técnica, pode-se mencionar a obtenção de filmes com maior homogeneidade, otimização da transferência de calor durante a secagem, minimização da interferência do operador e economia de espaço (Otoni et al., 2021). Para a produção de filmes multicamadas, ciclos consecutivos podem ser realizados para a deposição de diversas camadas sobrepostas.



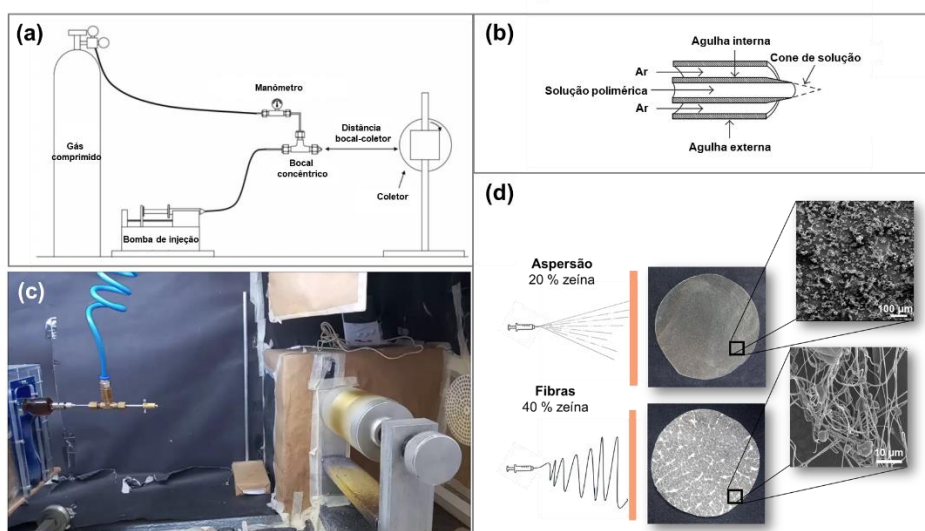
**FIGURA 2.6.** (a) Esquema da máquina de casting contínuo (modificado de Irfan et al., (2016)), (b) imagem real da máquina utilizada na produção dos filmes bicamadas, (c-d) imagens da etapa de laminação da solução polimérica por uma faca e (e) etapa final do processo em que os filmes secos são enrolados em rolos.

## 2.8. Deposição por sopro em solução

A técnica de deposição por sopro em solução (DSS) envolve a extrusão de uma solução polimérica, que é submetida a uma elevada força de arraste e sustentação aerodinâmica por meio de um fluxo de ar direcionado a um substrato (Medeiros et al., 2009). O arranjo experimental, ilustrado na **FIGURA 2.7**, é o mesmo utilizado na técnica de *solution blow spinning* (SBS), comumente aplicada na produção de (nano)fibras. O sistema DSS (**FIGURA 2.7a,c**) consiste em uma bomba de ejeção, uma fonte de ar comprimido, um coletor cilíndrico rotacional ou estático e um bocal acoplado a uma agulha em uma disposição concêntrica (**FIGURA 2.7b**). Nesta configuração, a solução polimérica é ejetada pelo orifício interno, enquanto o fluxo de ar é liberado pelo orifício externo, o que causa a formação de um cone devido ao

balanço das forças de arraste, coesão e viscosidade, forçando a mesma a ser depositada sobre o coletor (Oliveira et al., 2013).

Fatores como massa molar, concentração de solutos e viscosidade, além dos parâmetros experimentais como pressão do gás, distância bocal-coletor e taxa de alimentação da solução e geometria do dispositivo, influenciam nas características finais do material depositado (Medeiros et al., 2009). O grau de entrelaçamento das cadeias poliméricas afeta diretamente o fenômeno de arraste do material pelo fluxo de ar, já que dependendo do comportamento reológico da solução – diluído, semidiluído ou concentrado – há a formação de aspensão ou de fibras (**FIGURA 2.7d**) (Daristotle et al., 2016). A técnica permite o uso de vários, mas a escolha deve considerar sua volatilidade, já que o solvente deve ser evaporado durante o percurso entre o bocal e o coletor (Daristotle et al., 2016).



**FIGURA 2.7.** (a) Esquema do arranjo experimental da deposição por sopro (modificado de Medeiros et al., 2009), (b) representação do corte transversal do bocal e das agulhas concêntricas e a ilustração do cone de solução (modificado de Oliveira et al., (2013)), (c) sistema real utilizado para a aspensão da camada de zeína sobre os filmes bicamadas e (d) imagem de filmes de caseína depositados com aspensão ou fibras de zeína devido a mudanças na concentração da solução proteica.

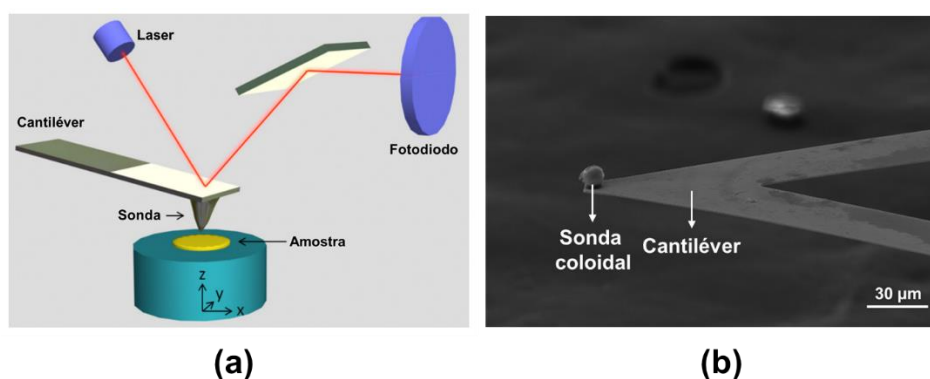
As vantagens desta técnica incluem alta produtividade, simplicidade de manuseio, não utilização de tensão elétrica (como na eletrofiação), e o fato de permitir a aspensão da camada polimérica *in situ* (Daristotle et al., 2016; Oliveira et al., 2013).

O método de DSS, assim como *casting* contínuo, é escalonável, o que os torna interessantes para o setor industrial.

## 2.9. Medidas de força por microscopia de força atômica (AFM)

Como já argumentado, o sucesso dos filmes multicamadas depende da compatibilidade termodinâmica entre os componentes que, conseqüentemente, acarreta a adesão interfacial entre as camadas. A elucidação dos mecanismos de interação fornece informações-chave para a modificação das superfícies, incorporação de compatibilizantes e/ou ativação da superfície para compatibilização (Shin et al., 2002).

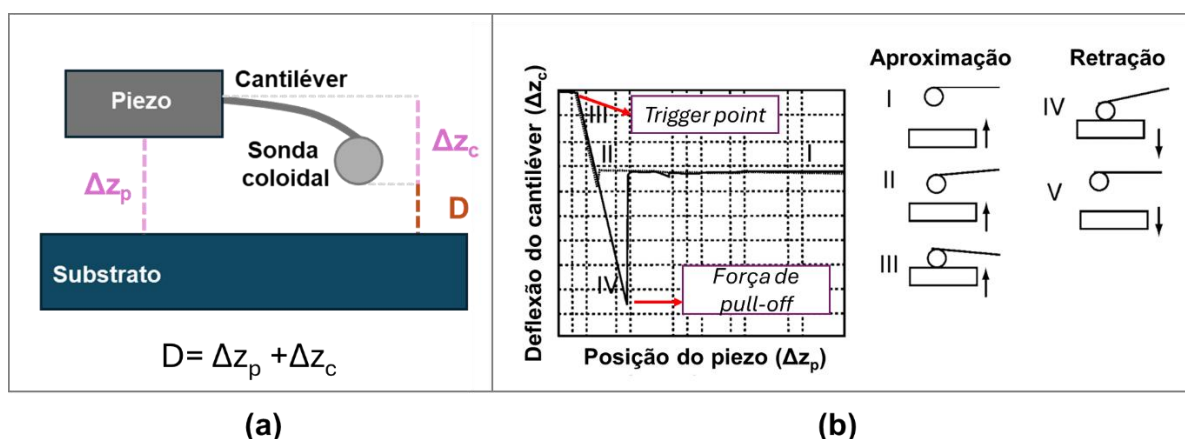
A microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica versátil, de alta resolução e sensibilidade e que fornece informações em escala subnanométrica sobre os sistemas estudados (Ralston et al., 2005). A técnica tem como fundamento a varredura da superfície de uma amostra por uma sonda acoplada a um cantiléver, o qual sofre deflexões devido a interações com a amostra. As deflexões são monitoradas por mudanças na voltagem do feixe de laser que é incidido sobre o cantiléver, como representado na **FIGURA 2.8** (Zeng et al., 2012).



**FIGURA 2.8.** (a) Esquema do aparato experimental da técnica de microscopia de força atômica (modificado de Zeng et al., (2012)) e (b) imagem MEV de uma sonda coloidal sobre o cantiléver (autoria própria).

As medidas de força por AFM permitem a quantificação das forças de interação (força de *pull-off*) entre uma sonda (ou “*probe*”) e um substrato (Nugroho et al., 2019). O uso de uma partícula coloidal como sonda oferece melhor controle de sua geometria e, conseqüentemente, da área de contato. A análise consiste em

monitorar a deflexão do cantiléver ( $\Delta z_c$ ) (**FIGURA 2.9a**) em função da aproximação ou retração do transdutor piezoelétrico (piezo,  $\Delta z_p$ ) em relação ao substrato (**FIGURA 2.9**) (Ralston et al., 2005). A magnitude das forças de interação entre duas superfícies depende das propriedades dos materiais e da geometria das mesmas. A curva teórica (**FIGURA 2.9b**) ilustra as cinco principais etapas: (I) a sonda é inicialmente aproximada do substrato, onde nenhuma força atua sobre o sistema. Quando em separações curtas, (II) a sonda pode experimentar uma força de atração, o que leva a (III) seu contato físico com o substrato. O cantiléver continua sendo empurrado contra a superfície até um ponto de gatilho (“*trigger point*”) pré-definido, mudando a direção do movimento. Durante a retração, se houver adesão, (IV) a sonda permanece em contato com o substrato até que a força restauradora do cantiléver supere as forças de interação e (V) as superfícies são separadas até o ponto em que nenhuma força relativa à superfície atue sobre a sonda (Ralston et al., 2005).



**FIGURA 2.9.** (a) Representação da posição  $\Delta z_p$  do piezo, da distância  $\Delta z_c$  de deflexão do cantiléver e da separação  $D$  entre a sonda e o substrato e (b) curva força-distância teórica e as respectivas interações entre uma sonda e uma superfície plana (modificado de Ralston et al., (2005))

Para obter a curva força-distância é necessário realizar algumas conversões matemáticas dos parâmetros, como descrito pelas seguintes relações (Butt et al., 1995; Nugroho et al., 2019):

$$F = k \times \Delta z_c$$

$$D = (\Delta z_p + \Delta z_c) \times \delta$$

onde  $F$  é a força (N),  $k$  é a constante de mola característico do cantiléver (N/m),  $\Delta z_c$  é a deflexão do cantiléver (V),  $D$  é a separação entre sonda e substrato (m),  $\Delta z_p$  é a

posição do piezo ( $V$ ) e  $\delta$  é a sensibilidade de deflexão (m/V). A força de *pull-off* é definida como a força requerida para a separação entre as superfícies da sonda e do substrato, correspondendo ao valor mínimo observado na curva de retração (Moore & Houston, 2010).

O potencial de interação ou energia de adesão ( $V(D)$ ) entre duas superfícies planas pode ser calculado pela aproximação de Derjaguin (Derjaguin, 1934):

$$V(D) = \int_D^{\infty} V_A(z) dA$$

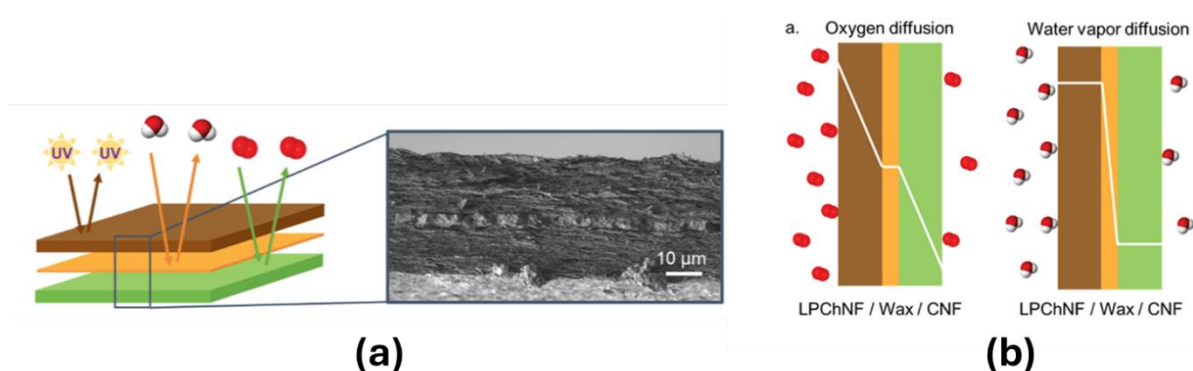
onde  $V(D)$  depende da separação  $D$  entre as superfícies de interação e  $V_A$  é a energia potencial por unidade de área na posição  $z$  do piezo. Desta forma, para sondas com pontas afiadas, a determinação da geometria torna-se uma limitação para a aplicação do modelo, o que torna interessante o uso de partículas com diâmetros bem definidos. Para um sistema constituído de uma sonda coloidal e uma superfície plana (substrato), a energia potencial pode ser calculada da seguinte forma:

$$V_A(D) = \frac{F(D)}{2\pi R},$$

onde  $F(D)$  é força em relação a separação  $D$  e  $R$  é o raio da partícula coloidal (Butt et al., 1995). Em resumo, o potencial de interação pode ser determinado integrando a área entre a curva de retração e a linha de base (força zero), normalizando pela geometria da sonda (Nugroho et al., 2019).

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O conceito de circularidade tem ganhado destaque como uma ideologia que busca alinhar a vida útil dos materiais com o tempo de uso dos produtos. Isso inclui prolongar a vida útil dos produtos, reciclar para reintroduzi-los no ciclo produtivo, e utilizar recursos renováveis e/ou biodegradáveis, dentre outras práticas (Ossio et al., 2023). As pesquisas recentes têm desempenhado um papel importante no desenvolvimento de materiais multiestruturados, os quais já têm sido explorados nas indústrias de embalagens (La Fuente Arias et al., 2023). Os filmes multicamadas combinados a partir de polímeros naturais de diferentes naturezas permite permeabilidade seletiva, adequação das características hidrofílicas/hidrofóbicas, estabilidade nos coeficientes de expansão entre os componentes e mudanças na interação e difração da luz (Abdullah et al., 2022). O esquema da **FIGURA 3.1** ilustra um filme multicamada, destacando a função de cada camada e a representação da difusão de oxigênio e vapor de água através das camadas com diferentes permeabilidades.



**FIGURA 3.1.** (a) Representação de um filme multicamada destacando o papel de bloqueio da luz UV e os efeitos de barreira à umidade e ao oxigênio de cada camada e, (b) esquema da difusão de umidade e oxigênio através de diferentes camadas com permeabilidades distintas. (Imagens retiradas de Pasquier et al., (2022)).

Dentre os biopolímeros utilizados na produção de embalagens, as proteínas e os polissacarídeos são os mais utilizados devido a suas disponibilidades e ao fato de serem passíveis de modificação química e facilmente associados a outros polímeros (Wei & Huang, 2019). Tendo em vista que as embalagens de alimentos desempenham um papel de preservação, proteção e informação dos produtos alimentícios, os filmes multicamadas tendem a ser projetados para atender aos

requisitos necessários para que sejam competitivos frente às embalagens convencionais (Grzebieniarz et al., 2023). Uma compilação de filmes multicamadas com a finalidade de embalagens alimentícias é mostrada na **TABELA 3.1**.

A transparência é uma característica bastante importante para um material utilizado na fabricação de embalagens, pois afeta a aparência do produto alimentício e as decisões dos consumidores. A literatura mostra que a multiestruturação de filmes pode provocar mudanças na coloração e na transmissão de luz (Grzebieniarz et al., 2023). A transparência destes sistemas é influenciada pela natureza do polímero, espessura e número de camadas e, até mesmo, pelas técnicas de processamento (Xia et al., 2019).

As propriedades térmicas também representam outro fator relevante, já que muitos trabalhos apontam que as multicamadas podem modular as temperaturas de fusão em relação aos componentes isolados (Jamróz et al., 2022; Zhu et al., 2019). Em relação ao efeito de barreira, propriedade que afeta diretamente a conservação de várias classes de alimentos, a combinação de camadas com diferentes caracteres hidrofílicos/hidrofóbicos pode desfavorecer a permeação de umidade e gases evitando a proliferação microbiana, alterações na textura dos alimentos e processos oxidativos (Pasquier et al., 2022; Satam et al., 2018). A literatura mostra que as camadas proteicas são as mais promissoras para estabelecer tal efeito.

Os atributos mecânicos são importantes para a manipulação, o transporte, o armazenamento e a comercialização das embalagens alimentícias (Abdullah et al., 2022). O uso de celulose e seus derivados como componentes de sistemas multiestruturados tem mostrado contribuições significativas na *performance* mecânica dos sistemas em que são adicionados (Jridi et al., 2019; W. Zhang et al., 2019).

A solubilidade em água é a propriedade mais limitante dos polissacarídeos e das proteínas, visto que as embalagens precisam apresentar certa resistência à umidade para que mantenham se estáveis. A deposições de camadas hidrofóbicas ou uso de reticulantes são artifícios que diminuem a suscetibilidade do material à água (Cai et al., 2020; Pasquier et al., 2022).

**TABELA 3.1.** Composições biopoliméricas de filmes multicamadas e suas respectivas propriedades alcançadas.

<i>Matrizes combinadas</i>	<i>Compostos adicionados</i>	<i>Método de obtenção</i>	<i>Propriedades alcançadas</i>	<i>Referências</i>
NFC, cera de carnaúba e NFs de quitina com lignina	-	Sequência de filtrações	Barreira a umidade de oxigênio e bloqueio luz UV	(Pasquier et al., 2022)
Fibroína de seda, quitosana e alginato	-	<i>Casting</i> em solução	Liberção controlada de fármaco e atividade antimicrobiana	(Pacheco et al., 2020)
PLA, NFs de quitosana e NCC	-	Aspersão	Barreira a umidade e ao oxigênio	(Satam et al., 2018)
Etilcelulose e gelatina	Curcumina	<i>Eletrofiação</i>	Encapsulação de ativo e barreira à umidade	(Wang et al., 2020)
Zeína e gelatina	OE de orégano	<i>Casting</i> contínuo	Conservação de morangos	(Cai et al., 2020)
Gelatina e ágar	Extrato de filha de videira	<i>Casting em solução</i>	Atividade antioxidante e resistência mecânica	(Jridi et al., 2019)
Amido e zeína	-	<i>Casting em solução</i>	Proteção UV e resistência à água	(Chen et al., 2019)
Furcellarano e gelatina	Curcumina, capsaicina, montmorilonita e AgNPs	<i>Casting em solução</i>	Atividade antioxidante e conservação de filé de peixe	(Grzebieniarz et al., 2023)

Konjacglucomanano e carragenina	Óleo de camélia, curcumina e antocianinas de preto de mirtilo	<i>Casting</i> em solução	Mudanças de cor com pH, bloqueio luz UV e barreira à água	(Zhou et al., 2021)
FucoPol e quitosana	-	<i>Casting</i> em solução	Transparência e diminuição da molhabilidade	(Ferreira et al., 2016)
CMC, gelatina, furcellarano	Extrato de <i>lingoberry</i>	<i>Casting</i> em solução	Estabilidade térmica, atividade antioxidante e conservação de tomates	(Jamróz et al., 2022)
Quitosana e alginato	Ácido ferúlico, ácido ascórbico e ácido cítrico	<i>Casting</i> em solução	Estabilidade térmica, atividade antioxidante e conservação de tomates cerejas	(Zhu et al., 2019)
Zeína e gelatina	Polifenóis	<i>Casting</i> em solução	Atividade antioxidante, bloqueio luz UV e conservação de carne	(Xia et al., 2019a)
Alginato e quitosana	OE de canela	<i>Casting</i> em solução	Resistência mecânica e barreira à água	(Zhang et al., 2019)

---

*EC: etilcelulose, OE: óleo essencial, NFs: nanofibras, NCC: nanocristais de celulose, NFC: nanofibras de celulose, CMC: carboximetilcelulose, AgNP: nanopartículas de prata.*

A literatura apresenta diferentes formas de produção das multicamadas, sendo as mais encontradas sequências de filtração, *layer-by-layer*, *casting* em solução, coextrusão, aspersão e eletrofiação (La Fuente Arias et al., 2023). A metodologia de obtenção afeta a escalabilidade de produção, os aspectos morfológicos e até mesmo as propriedades finais dos filmes (Otoni et al., 2021). Adicionalmente, a multiestruturação possibilita uma ampla gama de combinações de composição, ordenamento e número de camadas que permite a adaptação do sistema para a aplicação desejada. Em resumo, tais materiais apresentam grande potencial e aspectos a serem explorados (Abdullah et al., 2022).

#### 4. OBJETIVO

O trabalho desenvolvido teve como objetivo a produção de materiais multicamadas a partir da combinação de diferentes biopolímeros – a saber: carboximetilcelulose, caseína e zeína – utilizando as técnicas escalonáveis *casting* contínuo e deposição por sopro em solução. O material multiestruturados teve como objetivo acoplar propriedades de interesse como o desempenho mecânico da CMC, a propriedade de barreira contra água da caseína e a hidrofobicidade da zeína. Os sistemas foram caracterizados com relação às suas propriedades mecânicas, de barreira, térmicas, morfológicas e estruturais, assim como pela quantificação das energias de adesão interfaciais pela técnica de microscopia de força atômica. O material desenvolvido visa a aplicações como embalagens sustentáveis para alimentos.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes químicos: carboximetilcelulose sal sódico – CMC (Synth, viscosidade 700 cP, 1% m/v, 1 s<sup>-1</sup>, 25 °C); caseína (Éxodo, viscosidade 2,6-3,7 cP, 1% m/v, 1 s<sup>-1</sup>, 25 °C); zeína (Sigma-Aldrich, USP); glicerol – C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> (Cromoline, pureza 99,5%); ácido cítrico – C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> (Vetec, pureza 99,5%); ácido 1,2,3,4-butanotetracarboxílico – C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>8</sub> (Sigma-Aldrich, P.A.); hipofosfito de sódio – Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (Synth, P.A.); ácido tânico – C<sub>76</sub>H<sub>52</sub>O<sub>46</sub> (Synth, P.A.); sulfato de cobre pentahidratado – CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (Synth, P.A.); poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, 0,1% m/v); cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida – C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>.HCl (Thermo Scientific); N-hidroxisuccinimida – C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, pureza 98%); ácido 2-etanossulfônico – C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S (tampão MES, Sigma-Aldrich, pureza 99%); cloreto de sódio – NaCl (Sigma-Aldrich, P.A.); ácido clorídrico – HCl (Sigma-Aldrich, pureza 37%); ácido sulfúrico – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, pureza 99%); peróxido de hidrogênio – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, concentração 30% m/m); *wafer* de sílica (100 MM P-Type Prime, Wafer Pro); nanopartículas de sílica carboxiladas (Creative Diagnostics, 25 mg.mL<sup>-1</sup>); etanol – C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O (Neon, pureza 99,8%); ácido acético glacial – C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (Neon, pureza 99,8%); água ultrapura deionizada em sistema Milli-Q ( $\rho = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ; Barnstead Nanopure Diamond).

### 5.2. Metodologia

#### 5.2.1. Produção dos filmes de CMC e caseína por *casting* de bancada – Otimização da composição

Inicialmente, filmes de CMC e caseína foram produzidos por *casting* de bancada para a determinação das melhores formulações. Filmes de CMC foram produzidos a partir de uma solução polimérica 2% (m/v, base úmida-b.u.) em água. O sistema foi mantido sob agitação (1800 rpm) a 40 °C até a total solubilização do polímero. Posteriormente, adicionou-se o reticulante – ácido cítrico ou BTCA – na presença ou não do catalisador HPS (1 g de reticulante:0,5 g de HPS) com o objetivo de diminuir a solubilidade do material em água. Os diferentes reticulantes e o uso do catalisador foram avaliadas a fim de investigar as melhores condições para a

reticulação da CMC. A solução foi então aquecida a 80 °C por 30 min (Juncu et al., 2016) e, em seguida, deixada em repouso até resfriar a 50 °C. Após esse resfriamento, foi incorporado o plastificante glicerol, visando aumentar a maleabilidade e flexibilidade do material. Os reticulantes e o glicerol foram previamente solubilizados em 5 mL de água, sendo que para os filmes que não tiveram a adição destes componentes, as etapas correspondentes foram ignoradas. Para os filmes de caseína, preparou-se uma solução aquosa de 2% (m/v, b.u.) da proteína, a qual foi solubilizada acima do seu ponto isoelétrico ( $pI$ ) em  $pH > 5$  a fim de se obter uma suspensão estável devido a repulsão entre as micelas. Após completa solubilização, adicionaram-se quantidades conhecidas de glicerol solubilizado em 5 mL de água. O sistema foi mantido em agitação por 20 min e o pH foi ajustado para 7 com uma solução aquosa de hidróxido de sódio ( $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ). O ajuste do pH para 7 é devido a estabilização máxima das cargas negativas da suspensão de caseína, como discutido pelas curvas de potencial Zeta em função do pH na sessão dos resultados.

As soluções poliméricas foram depositadas em substrato de poliéster (Mylar®, Dupont), os quais permitem que os filmes sejam destacados com facilidade, e secas à temperatura ambiente por 48 h. As quantidades de glicerol, ácido cítrico e BTCA utilizadas estão descritas na **TABELA 5.1**.

**TABELA 5.1.** Concentrações de glicerol e dos reticulantes ácido cítrico e ácido 1,2,3,4-butanotetracarboxílico (BTCA) utilizados na composição dos filmes de carboximetilcelulose (CMC) e caseína. As concentrações foram em relação a massa seca do polímero.

<i>Filmes de CMC</i>	<i>Glicerol*</i>	<i>Reticulante*</i>
CMC	-	-
CMC <sub>5%Gli</sub>	5%	-
CMC <sub>15%Gli</sub>	15%	-
CMC <sub>30%Gli</sub>	30%	-
CMC <sub>50%Gli</sub>	50%	-
CMC <sub>15%Gli+5%AC</sub>	15%	5% ácido cítrico
CMC <sub>15%Gli+15%AC</sub>	15%	15% ácido cítrico
CMC <sub>15%Gli+30%AC</sub>	15%	30% ácido cítrico
CMC <sub>15%Gli+15%AC+HPS</sub>	15%	15% ácido cítrico+HPS
CMC <sub>15%Gli+15%BTCA</sub>	15%	15% BTCA

CMC <sub>15%Gli+15%BTCA+HPS</sub>	15%	15% BTCA + HPS
<i>Filmes de caseína</i>	<i>Glicerol*</i>	<i>Reticulante*</i>
CA	-	-
CA <sub>15%Gli</sub>	15%	-
CA <sub>30%Gli</sub>	30%	-
CA <sub>50%Gli</sub>	50%	-

\*As concentrações de glicerol e reticulante são em relação a massa do polímero e a proporção de hipofosfito de sódio (HPS) utilizada foi de 1 g reticulante:0,5 g de HPS.

### 5.2.2. Soluções filmogênicas (SFs) para *casting* contínuo

Para o *casting* contínuo, as SFs tiveram suas concentrações ajustadas para que estas fossem passíveis de serem laminadas pelo sistema de laminação contínua. As SFs de CMC foram preparadas a partir de uma solução aquosa de 3% (m/v, b.u.) de CMC; em seguida, adicionaram-se BTCA/HPS (0,5 g de HPS para cada 1 g de BTCA) tendo as concentrações em relação à massa do polímero apresentadas na **TABELA 5.2**. Os mesmos foram previamente solubilizados em 5 mL de água e, após a adição, o sistema foi agitado por 30 min. Posteriormente, incorporou-se glicerol (15% m/m, base seca- b.s.) e o sistema foi mantido sob agitação por mais 30 min. Algumas formulações foram adicionadas de ácido tânico (AT), o qual é um reticulante proteico utilizado para a promoção da adesão entre as camadas de CMC e caseína possivelmente devido a formação de reticulação na interface, tendo seu efeito melhor discutido na seção dos resultados. As concentrações utilizadas estão descritas na **TABELA 5.2**. O AT foi previamente solubilizado em 5 mL de água e adicionado após 20 min da adição do BTCA, mantendo-se o sistema sob agitação por mais 30 min. Já as SFs de caseína foram obtidas a partir de uma solução aquosa contendo 20% (m/v, b.u.) da proteína, em pH > 5 (acima do *pI*). Adicionou-se o glicerol (30% m/m, b.s.) e o sistema foi agitado por 30 min. Em seguida, o pH foi ajustado para 7. Todas as SFs foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min a 30 °C para a remoção das bolhas de ar antes de serem laminadas. As concentrações de BTCA e AT adicionadas então mostradas na **TABELA 5.2**.

**TABELA 5.2.** Concentrações (m/m, base seca) de 1,2,3,4-ácido butanotetracarboxílico (BTCA) e ácido tânico (AT) utilizados nas composições dos filmes bicamadas produzidos por *casting* contínuo. As concentrações utilizadas foram em relação à massa seca de polímero.

<i>Filmes bicamadas</i>	<i>% BTCA*</i>	<i>% AT</i>
CA-CMC <sub>15/0</sub>	15	0
CA-CMC <sub>15/5</sub>	15	5
CA-CMC <sub>15/30</sub>	15	30
CA-CMC <sub>30/30</sub>	30	30
CA-CMC <sub>0/30</sub>	0	30

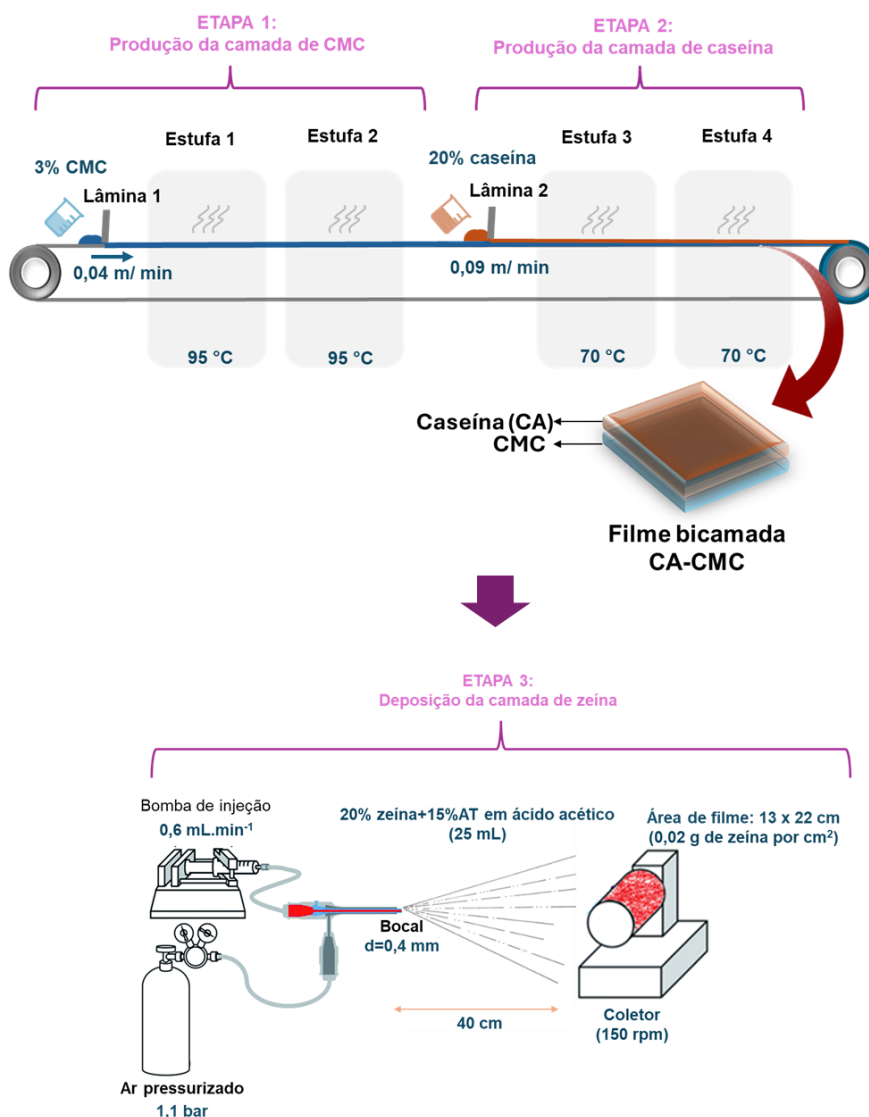
\*HPS foi adicionado juntamente com o BTCA na proporção de 1 g BTCA:0,5 g de HPS. HPS: hipofosfito de sódio.

### 5.2.3. Produção dos filmes monocamada e bicamadas CA-CMC por *casting* contínuo

Os filmes foram produzidos em uma máquina de laminação contínua (Werner Mathis AG, modelo KTF-B, Suíça). As SFs foram continuamente vertidas em substrato de poliéster (Mylar®, DuPont, Brasil), o qual movimentava-se em direção a uma lâmina com uma distância pré-estabelecida em relação ao substrato (espessura da lâmina úmida). A secagem foi feita pela passagem das SFs laminadas por duas estufas convectivas.

A produção dos filmes bicamadas de caseína e CMC (CA-CMC) é esquematizada na **FIGURA 5.1**. Inicialmente, depositou-se a SF de CMC utilizando a seguinte configuração: espessura úmida de 1,25 mm; velocidade do substrato de 0,07 m.min<sup>-1</sup>; e secagem em duas estufas com temperaturas de 95 e 80 °C, respectivamente. Em seguida, o filme de CMC foi rebobinado para o início da máquina, servindo como substrato para a laminação da SF de caseína, usando os seguintes parâmetros: espessura úmida de 0,80 mm; velocidade do substrato de 0,07 m.min<sup>-1</sup>; e secagem em duas estufas a 70 °C. Diferentes proporções de BTCA e AT foram incorporadas na camada de CMC a fim de investigar suas contribuições na adesão interfacial das bicamadas (**TABELA 5.2**). As proporções estudadas foram: 15% BTCA (CA-CMC<sub>15/0</sub>), 15% BTCA:5% AT (CA-CMC<sub>15/5</sub>), 15% BTCA:30% AT (CA-CMC<sub>15/30</sub>), 30% BTCA:30% AT (CA-CMC<sub>30/30</sub>) e 30% AT (CA-CMC<sub>0/30</sub>). Filmes

monocamadas, CMC ou caseína, também foram produzidos e utilizados como controles.



2

**FIGURA 5.1.** Esquema da produção dos filmes multicamadas por meio da combinação das técnicas de casting contínuo e deposição por sopro em solução.

Hipotetizou-se que a velocidade da laminação pudesse afetar o grau de orientação das cadeias o que causaria anisotropia das propriedades dos filmes no sentido paralelo e perpendicular à laminação. Tal efeito foi investigado a partir da laminação de uma solução aquosa de 3% (m/v, b.u.) de CMC, contendo 15% (m/m, b.s.) de glicerol, nas velocidades 0,05, 0,09 e 0,15 m.min<sup>-1</sup>. As demais condições foram mantidas conforme descritas anteriormente.

#### 5.2.4. Produção da camada de zeína por deposição por sopro em solução (DSS)

A terceira camada de zeína foi obtida por meio da técnica de DSS, já que essa proteína não possui boa capacidade de formação de matriz, o que inviabiliza sua produção pelo método de *casting* contínuo. Desta forma, para a preparação da solução polimérica de zeína, inicialmente o AT foi solubilizado em ácido acético P.A. a fim de obter uma concentração final de 15% (m/m, b.s.) em relação à massa de zeína. A incorporação do AT teve o objetivo auxiliar na resistência à umidade desta camada, uma vez que a zeína já apresenta caráter hidrofóbico, por meio da reticulação entre as cadeias proteicas. Posteriormente, uma quantidade conhecida de zeína em pó foi adicionada para obter uma concentração 20% (m/v, b.u.) em relação ao volume total da solução. O sistema foi agitado em banho de água a 60 °C até que não fora observada a presença de sólidos em dispersão, o que levou cerca de 2 h. As soluções foram preparadas em um recipiente vedado para evitar a evaporação do solvente. A aspersão da camada proteica foi feita em um sistema DSS (**FIGURA 5.1**) utilizando uma seringa de vidro e uma agulha de aço inoxidável com diâmetro externo de 1,5 mm e diâmetro do orifício interno de 0,4 mm. Os parâmetros aplicados foram distância bico-coletor de 40 cm, taxa de ejeção de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>, pressão do ar comprimido de 1,1 bar e rotação do coletor de 150 rpm. O recobrimento envolveu a deposição de 25 mL de solução de zeína sobre filmes CA-CMC<sub>15/5</sub> e CA-CMC<sub>15/30</sub>, os quais foram selecionados como as melhores formulações dentre as bicamadas, com dimensões de 13 cm x 22 cm correspondendo a 0,02 g de zeína por cm<sup>2</sup>.

Foram realizados testes iniciais para a otimização da composição e concentração das soluções poliméricas, os quais seguiram o mesmo protocolo descrito anteriormente, desconsiderando a etapa de solubilização do AT quando necessário. Os parâmetros aplicados foram os mesmos descritos anteriormente. As composições empregadas estão descritas na **TABELA 5.3**, no qual foi utilizada a nomenclatura de “aspersão” para a deposição da zeína na forma de aspersão e “fibras” para os sistemas em que foram observados a formação de fibras sobre o substrato devido ao aumento da concentração da proteína para 40% (b.u.). Para esta etapa, os filmes utilizados como substratos foram uma monocamada de caseína com dimensões 13 cm x 22 cm.

**TABELA 5.3.** Valores das concentrações das soluções de zeína, concentração do ácido acético incorporado e volume de solução depositada sobre os filmes monocamadas de caseína nos testes iniciais. As concentrações de zeína foram em relação ao volume total da solução e as concentrações do ácido tânico foi em relação à massa de proteína.

Amostras	Concentração de zeína/ %	Concentração de ácido tânico/ %	Volume de solução depositada/ mL
Aspersão 1	20	-	25
Aspersão 2	20	15	25
Aspersão 3	20	15	35
Fibras 1	40	-	25
Fibras 2	40	15	25

A taxa de cisalhamento que a agulha exerce sobre a solução polimérica durante a aspersão foi estimada a partir da equação abaixo, considerando a analogia com a reologia capilar.

$$\dot{\gamma}_w = \frac{4 T_{alim.}}{\pi R_c^3}$$

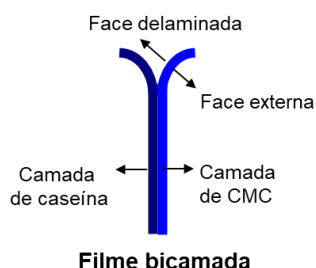
onde  $\dot{\gamma}_w$  é a taxa de cisalhamento ( $s^{-1}$ ) entre a geometria e a parede do equipamento,  $T_{alim.}$  é a taxa de alimentação ( $mL.s^{-1}$ ) e  $R_c$  é o raio do orifício interno da agulha (cm).

### 5.2.5. Potencial Zeta versus pH

Medidas de potencial Zeta foram realizadas para avaliar o comportamento das cargas superficiais em relação à variação do pH das soluções poliméricas de CMC e caseína. Utilizou-se soluções poliméricas aquosas (0,1% m/m) e um intervalo de pH 2 a 12. Os ajustes do pH foram feitos com soluções aquosas de HCl ( $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e NaOH ( $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ). As medidas foram feitas em um aparelho Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments, EUA).

### 5.2.6. Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

As mudanças estruturais dos filmes foram analisadas por FTIR em um equipamento Vertex 70 (Bruker, Alemanha) com módulo de atenuação por diamante (ATR). Os materiais estavam previamente secos e foram analisados no intervalo de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 32 *scans* por amostra. Para a observação de mudanças estruturais entre as faces externas e delaminadas dos filmes bicamadas (**FIGURA 5.2**), espectros FTIR-ATR foram obtidos e a diferença entre as intensidades de bandas específicas ( $\Delta I = I_{\text{face delaminada}} - I_{\text{face externa}}$ ) foram calculadas a fim de observar variações das intensidades de bandas típicas de cada camada. Os espectros foram normalizados pela intensidade da banda 923  $\text{cm}^{-1}$ , a qual praticamente não foi variada para todos os espectros. O torque do suporte que pressiona a amostra no cristal de diamante no módulo de ATR foi mantido constante para todas as análises. Para as análises realizadas pela passagem de radiação pelos filmes, os mesmos foram alocados no caminho óptico do instrumento. Os espectros obtidos foram normalizados pela soma das intensidades.



**FIGURA 5.2.** Esquema e nomenclatura atribuída para as faces dos filmes bicamadas.

### 5.2.7. Microbalança de cristal de quartzo com monitoramento de dissipação de energia (QCM-D)

A QCM-D foi utilizada para a investigação da estabilidade e intensidade das interações entre os componentes do sistema – caseína, zeína, AT e CMC. Os experimentos foram realizados em um instrumento Q-Sense E4 (Biolin Scientific AB, Suécia) utilizando sensores de sílica revestidos por pulverização catódica com frequência de ressonância fundamental de 5 MHz (QSX303, Biolin Scientific AB). Para os experimentos, foram utilizadas soluções aquosas poliméricas de CMC 0,05% m/v e caseína 0,1% m/v em pH 7. A zeína foi solubilizada em etanol 60% na concentração

de 0,1% m/v e o AT foi dissolvido em água em uma concentração de 0,1% m/v. As soluções designadas foram injetadas individualmente a uma vazão de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  por 30 min, seguida de enxágue com água. Foram monitorados 13 harmônicos em cada experimento e pelo menos três repetições foram realizadas. Antes do experimento, a superfície do sensor foi limpa em uma atmosfera de UV/O<sub>2</sub> em um equipamento ProCleaner (Bioforce Nanoscale, EUA) por 15 min.

### 5.2.8. Espectroscopia nas regiões do ultravioleta e do visível (UV-VIS)

A espectrofotometria dos filmes foi adquirida utilizando um espectrofotômetro UV-1601 (Shimadzu, Japão) no intervalo de comprimentos de onda entre 200 e 700 nm, em modo absorbância.

### 5.2.9. Colorimetria

Os parâmetros colorimétricos dos filmes foram medidos utilizando um colorímetro CM-5 (Konica Minolta, Japão). As medidas foram feitas por refletância utilizando uma geometria di:0°/de:0° e abertura do colorímetro de 50 mm. Foram determinadas a luminosidade ( $L^*$ ) e as coordenadas cromáticas  $a^*$  e  $b^*$  segundo as escalas CIE. A calibração foi realizada com um padrão branco ( $L^* = 97,3 \pm 0,05$ ;  $a^* = 0,05 \pm 0,01$ ;  $b^* = 2,01 \pm 0,05$ ). A diferença de cor total ( $\Delta E^*$ ) foi calculada de acordo com a equação a seguir:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

E o índice de alvura ( $IA$ ) foi calculado pela equação:

$$IA = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}}$$

### 5.2.10. Solubilidade e intumescimento em água

A solubilidade foi determinada pela imersão de filmes, com dimensões 4 cm x 4 cm, em tubos Falcon contendo 50 mL de água Mili-Q (25 °C, pH 5) por 3 h, os quais foram agitados a cada 30 min. Posteriormente, os pedaços de filmes não solubilizados foram separados com o auxílio de uma peneira e, em seguida, levados a uma estufa a 80 °C para secagem por 30 min, antes de serem pesados novamente (Pacheco et al., 2020). As medidas foram feitas em triplicata. O grau de solubilidade (GS) das amostras em água foi determinada pela seguinte equação:

$$GS (\%) = \frac{mi - mf}{mi} \times 100\%$$

onde  $mi$  é a massa inicial (g) e  $mf$  é a massa final (g).

O intumescimento foi avaliado pela alocação de filmes, com dimensões de 5 cm x 5 cm, em um dessecador contendo uma solução saturada de sulfato de cobre (UR = 90%, 25 °C), por 24 h. O grau de intumescimento (GI) foi calculado pela diferença de massa antes e após o teste, como descrito pela seguinte equação:

$$GI (\%) = \frac{mi' - mf'}{mi'} \times 100\%$$

onde  $mi'$  é a massa inicial (g) e  $mf'$  é a massa final (g).

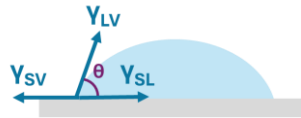
### 5.2.11. Ângulo de contato e energia livre de superfície (ELS)

Medidas de ângulo de contato foram feitas pelo método de gota sésil em um tensiômetro ótico automático Theta Lite (Biolin Scientific, Finlândia). A análise consistiu no monitoramento do ângulo entre uma gota (300 µL) de água ultrapura e as superfícies dos filmes durante 60 s. O ângulo de contato médio foi determinado pela média aritmética dos ângulos entre as extremidades da gota. Foram feitas pelo menos cinco replicadas para cada amostra.

Para a determinação das ELSs, cada filme monocamada teve os valores de ângulo de contato medidos em relação a três líquidos – a saber: água, glicerol e tolueno – com componentes de energia superficial conhecidas. As equações termodinâmicas aplicadas tiveram como base o modelo de van Oss, Chaudhury e Good (vOCCG) (Mohsin et al., 2020) utilizando as seguintes equações:

$$\begin{aligned}\gamma_L (1 + \cos \theta) &= 2\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \\ \gamma_S &= \gamma_S^{LW} + \gamma_S^{AB} \\ \gamma_S^{AB} &= 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_S^-}\end{aligned}$$

onde  $\theta$  é o valor do ângulo de contato experimental,  $\gamma$  é a tensão superficial total ( $\text{mJ.m}^{-2}$ ),  $\gamma^{LW}$  é a componente de Lifshitz-van der Waals da tensão superficial ( $\text{mJ.m}^{-2}$ ),  $\gamma^{AB}$  é a componente ácido-base de Lewis da tensão superficial ( $\text{mJ.m}^{-2}$ ),  $\gamma^+$  e  $\gamma^-$  são as componentes ácido e base de Lewis ( $\text{mJ.m}^{-2}$ ), respectivamente. Os subscritos S e L referem-se as componentes da face sólida e líquida, conforme esquematizado na **FIGURA 5.3**.



**FIGURA 5.3.** Representação das componentes da tensão superficial envolvidas em uma medida de ângulo de contato.  $\gamma_{SV}$  é a tensão entre o sólido e o ar,  $\gamma_{LV}$  é a tensão entre o líquido e o ar e  $\gamma_{SL}$  é a tensão entre o sólido e o líquido.

É possível estimar a trabalho de adesão entre dois sólidos a partir das equações (da Silva et al., 2020):

$$\begin{aligned}W_a &= \gamma_{SV} (\cos \theta + 1) \\ W_a &= W_a^{AB} + W_a^{LW} \\ W_a^{AB} &= 2\sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} + 2\sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+} \\ W_a^{LW} &= 2\sqrt{\gamma_1^{LW} \gamma_2^{LW}}\end{aligned}$$

onde  $W_a$  é o trabalho de adesão total ( $\text{J.m}^{-2}$ ),  $W_a^{AB}$  é a componente ácido-base de Lewis ( $\text{J.m}^{-2}$ ),  $W_a^{LW}$  é a componente de Lifshitz-van der Waals ( $\text{J.m}^{-2}$ ).

### 5.2.12. Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A determinação da PVA foi feita de acordo com uma modificação da norma ASTM E96-80 (McHUGH et al., 1993). Filmes (2 cm x 2 cm) pré-condicionados

(UR= 50%, 25 °C) foram selados a uma célula de Teflon contendo 2 mL de água ultrapura, os quais foram mantidos em uma câmara climatizada (Ethik, modelo 420-2TS 295L, Brasil) a 25 °C e UR = 50%. Foram feitas seis pesagens a cada hora e uma sétima após 24 h. A PVA foi determinada segundo a equação:

$$PVA = \left( \frac{\Delta m}{\Delta t} \right) \times \left( \frac{L}{A \Delta P} \right)$$

onde  $PVA$  é a permeabilidade ao vapor de água ( $\text{g.m.h}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ ),  $\Delta m/\Delta t$  é a taxa de perda de massa ( $\text{g.h}^{-1}$ ),  $L$  é a espessura dos filmes (m),  $A$  é a área do filme exposta e útil para permeação ( $\text{m}^2$ ) e  $\Delta P$  é a diferença de pressão parcial (3170 Pa).

### 5.2.13. Análise reológica

O comportamento reológico das soluções poliméricas foi estudado a partir de medidas conduzidas em um reômetro MCR 301 (Anton Paar, Áustria), operando com geometria de cilindros concêntricos (DG26.7). A taxa de cisalhamento foi variada de 0 a  $2000 \text{ s}^{-1}$  a 25 °C. Para o estudo reológico das soluções de CMC (1, 2 e 3% m/m) e caseína (2, 10 e 20% m/m), foi determinado os índices de fluxo ( $n$ ) que descrevem o quanto o fluido desvia do comportamento newtoniano segundo o modelamento da curva pela equação:

$$\tau = \tau_0 + k\gamma^n$$

onde  $\tau$  é a tensão de cisalhamento (Pa),  $\tau_0$  é a tensão limite de escoamento (Pa),  $k$  é o índice de consistência e  $\gamma$  é a taxa de cisalhamento ( $\text{s}^{-1}$ ).

Para o estudo do efeito da velocidade de laminação na anisotropia das propriedades mecânicas dos filmes, fez-se a conversão das velocidades de laminação utilizadas no sistema de laminação contínua (velocidades escalares) para suas respectivas velocidades angulares, utilizadas no reômetro, para que fosse possível a correlação com as viscosidades da solução. Tem-se que para sistemas pseudoplásticos, a viscosidade remete ao grau de alinhamento das cadeias, a qual varia em função da taxa de cisalhamento, sendo que esta última é atrelada a uma velocidade angular. A relação entre velocidade escalar e velocidade angular é descrita pela seguinte relação:

$$v = \omega.r$$

onde  $v$  é a velocidade escalar,  $\omega$  é a velocidade angular e  $r$  é o raio do cilindro utilizado na análise ( $r = 2,8 \cdot 10^{-2}$  m).

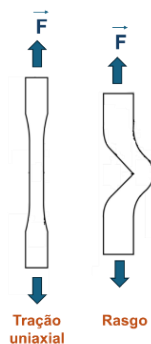
#### **5.2.14. Termogravimetria (TG)**

Cerca de 10 mg dos filmes foram aquecidos de 25 a 600 °C a 10 °C min<sup>-1</sup> em porta amostra de platina e atmosfera de ar sintético com vazão de 60 mL min<sup>-1</sup>, utilizando um analisador termogravimétrico SDT-Q600 (TA Instruments, EUA). A análise permitiu a obtenção das curvas termogravimétricas e de suas derivadas (DTG).

#### **5.2.15. Ensaios mecânicos de tração uniaxial, rasgo e delaminação quantitativo**

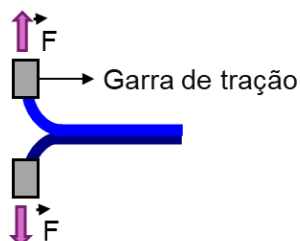
A resistência mecânica dos filmes foi avaliada pelo ensaio de tração uniaxial segundo a norma ASTM D638-14. Os ensaios foram feitos com pelo menos cinco corpos de prova de cada amostra em uma máquina universal de ensaios mecânicos DL-3000 (EMIC, Brasil). A partir das análises realizadas, obtiveram-se os valores da resistência à tração ( $\sigma$ ), da deformação na ruptura ( $\epsilon$ ) e do módulo de elasticidade ( $E$ ).

A resistência ao rasgo foi avaliada segundo a norma ASTM D1004-21, com algumas modificações. Pelo menos cinco corpos de prova, com formatos e dimensões especificados pela norma, foram alocados entre duas garras com separação de 2,54 cm em um texturômetro TA.XT plus (Extralab Brasil, Brasil). O ensaio foi conduzido tracionando-se as amostras até serem totalmente rasgadas a uma taxa de 5,1 cm. min<sup>-1</sup>. As forças de rasgo foram normalizadas pelas espessuras dos filmes. Vale mencionar que os testes de tração uniaxial e de rasgo diferem principalmente no formato do corpo de prova utilizados, como mostrado na **FIGURA 5.4**.



**FIGURA 5.4.** *Corpos de prova dos testes de tração uniaxial e de rasgo e as respectivas direções de aplicação da força.*

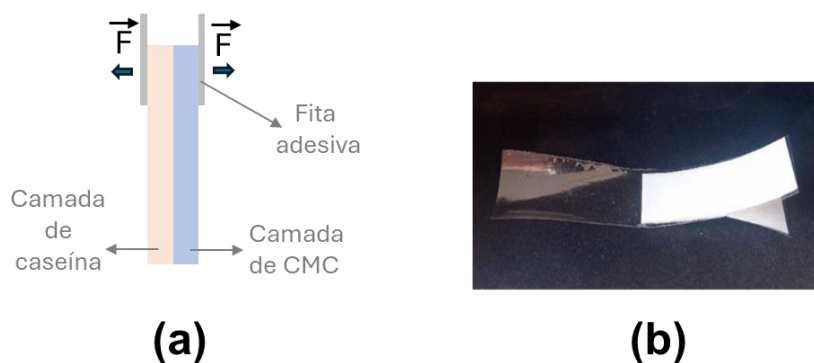
O teste de delaminação quantitativo para os filmes bicamadas foi conduzido conforme a norma ASTM F904-16, utilizando o mesmo texturômetro. Cinco corpos de prova (2,5 cm x 25 cm) tiveram uma delaminação inicial manual das camadas, com cada camada sendo fixada em uma das garras do equipamento para serem completamente separadas (**FIGURA 5.5**). A distância inicial entre as garras foi de 2,54 cm e a velocidade de teste foi de 2,8 cm.min<sup>-1</sup>. Todos os filmes analisados foram previamente condicionados (UR= 50%, 25 °C) por 24 h.



**FIGURA 5.5.** *Esquema dos testes de delaminação utilizando um texturômetro.*

### 5.2.16. Teste qualitativo de delaminação dos filmes bicamadas CA-CMC

Filmes bicamadas com dimensões de 1 cm x 5 cm tiveram uma fita de alta aderência (fita dupla face Scotch 9400- 3M®) colada em cada uma das suas faces, como esquematizado na **FIGURA 5.6**. As fitas foram manualmente tracionadas em sentidos opostos de modo a observar a ocorrência de delaminação entre as camadas.



**FIGURA 5.6.** (a) Esquema e (b) imagem do filme bicamada com fitas adesivas colocadas em ambas as superfícies dos filmes para a realização do teste qualitativo de adesão.

### 5.2.17. Espessuras dos filmes

As espessuras dos filmes foram determinadas pela média aritmética de cinco medidas em posições aleatórias de cada corpo de prova com um micrômetro digital de precisão 0,001 (Mitutoyo Manufacturing, Japão). Tais valores foram utilizados para os cálculos das propriedades mecânicas e de PVA.

### 5.2.18. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Imagens das superfícies e das seções transversais dos filmes foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG) utilizando um equipamento JSM-6701F (Jeol, Japão). As amostras foram recobertas com platina e, no caso das imagens da seção transversal, estas foram obtidas após a fratura criogênica dos filmes em nitrogênio líquido. Para as imagens MEV da sonda de AFM modificadas, utilizou-se um microscópio Crossbeam 350 (Zeiss, Alemanha) e uma cobertura condutora de ouro.

### 5.2.19. Teste antimicrobiano de disco difusão

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão em disco de acordo com a norma NCCLS (documento M2-A8, 2003). As bactérias foram inoculadas a partir de uma suspensão contendo  $10^6$  unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL<sup>-1</sup>) para *Escherichia coli* (*E. coli*; Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*; Gram-positiva). As amostras dos filmes foram cortadas em discos

de 6 mm de diâmetro e colocadas em placas, previamente preparadas com meio de cultura ágar Müller-Hinton e inoculadas. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h e os testes foram feitos em triplicata.

## 5.2.20. Medidas de força por microscopia de força atômica (AFM)

### 5.2.20.1. Soluções poliméricas para produção de substratos

Os substratos foram preparados a partir da deposição de filmes finos de caseína (CA), zeína (ZN) e CMC para as medidas de força em relação a uma sonda coloidal de AFM. Para a produção dos substratos de CMCs, o polímero foi inicialmente dissolvido em água para obter solução a 0,5% m/v. Em seguida, foi feita a adição de BTCA/HPS (1 g de BTCA: 0,5 g de HPS; % em relação à massa de CMC) e AT. Os reticulantes foram pré-dissolvidos em 1 mL de água e a solução foi agitada por 30 minutos. Já os substratos de caseína foram produzidos solubilizando a proteína em água, em pH acima de 5, a uma concentração de 3% m/v tendo o pH ajustado para 7 ao final, utilizando uma solução aquosa de NaOH. A zeína foi dissolvida em etanol 60% para obter uma solução 3% m/v e, para os substratos contendo AT, o reticulante foi adicionado diretamente na solução. As quantidades específicas adicionadas podem ser encontradas na **TABELA 5.4**.

**TABELA 5.4.** Quantidades dos polímeros e dos reticulantes utilizadas nas soluções para a produção dos substratos. A proporção foi de 1g de BTCA para 0,5 g de HPS.

Substrato	Concentração de polímero	Concentração de reticulante	Solvente
CA	3% de caseína	-	Água
ZN	3% de zeína	-	Etanol 80%
ZN <sub>15%AT</sub>	3% de zeína	15 % de AT	Etanol 80%
CMC	0,5% de CMC	15% de BTCA/HPS	Água
CMC <sub>5%AT</sub>	0,5% de CMC	15% of BTCA/HPS + 5 % de AT	Água
CMC <sub>30%AT</sub>	0,5% de CMC	15% de BTCA/HPS + 30 % de AT	Água

### 5.2.20.2. Produção dos substratos

Os *wafers* de sílica foram inicialmente limpos por imersão em solução piranha (3 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por 30 min. Em seguida, foram enxaguados com água corrente e secos com gás N<sub>2</sub>. Para os substratos de CMC, os *wafers* foram previamente deixados em solução aquosa de poli-L-lisina (PLL) (0,1% m/m) por 40 min, enxaguados e secos com gás N<sub>2</sub>. A deposição da CMC foi feita pela técnica de *spin coating* (Spin Processor, Laurell Technologies) a 5.000 rpm, 1.500 rpm/s, por 2 min. Para caseína e zeína, as soluções foram depositadas diretamente sobre os *wafers* a 1500 rpm, 500 rpm/s, por 3 min. Os substratos foram submetidos a um tratamento térmico a 80 °C durante 8 h para remover possíveis ligações frouxas (Reid et al., 2016), e um tratamento térmico adicional foi feito a 120 °C por 5 min para promoção da reticulação dos substratos de CMC (Shen et al., 2015). A estabilidade dos substratos foi avaliada por meio de testes de solubilidades. Os substratos foram imersos em uma solução aquosa contendo 10 mM de NaCl por 24 h. Posteriormente, os mesmos foram lavados com água e secos com gás N<sub>2</sub>. As espessuras foram determinadas por medidas de elipsometria antes e após o teste de solubilidade. A solubilidade do substrato foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{l_{t=24h} - l_{t=0}}{l_{t=0}} \times 100,$$

onde  $l_{t=24h}$  é a espessura após 24h de imersão (mm) e  $l_{t=0}$  é a espessura inicial antes da imersão (mm).

### 5.2.20.3. Modificação da sonda coloidal carboxilada

Uma sonda coloidal carboxilada (Novascan Technologies, EUA) com diâmetro de 10 µm, constante de mola ( $k$ ) de 0,12 N/m e frequência de ressonância de 23 kHz foi modificada com caseína para as medições de força. As sondas foram cuidadosamente submetidas a uma sequência de imersões. As etapas de imersão iniciaram em tampão MES (pH 7), seguida de uma mistura de EDC (100 g.L<sup>-1</sup>) e NHS (100 g.L<sup>-1</sup>) dissolvidas em tampão MES (pH 7), e posteriormente em caseína (3% m/v) solubilizada em tampão MES (pH 7). Cada etapa de imersão durou 20 min, exceto a

imersão em proteína, que durou 1 h. As sondas foram enxaguadas com tampão MES entre cada etapa de imersão e com água no final (Li et al., 2015).

#### 5.2.20.4. Medições de força-distância AFM

As forças de adesão foram determinadas através de medidas de força entre uma sonda coloidal modificada com caseína e um substrato polimérico utilizando a técnica de AFM. As análises foram conduzidas em solução de NaCl 10 mM para evitar a formação de uma dupla camada elétrica infinita e a ação de forças capilares. O *trigger point* foi de 500 nm em deflexão, a distância inicial entre a sonda e ao substrato foi 2  $\mu\text{m}$  e a velocidade da análise foi de 1  $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ . Foram avaliados diferentes tempos de contato – 0, 5 e 10 s – entre a sonda e o substrato antes da retração. Os cantiléveres apresentavam uma  $k$  nominal de 0,12 N/m, conforme relatado pelo fabricante, mas os valores precisos foram obtidos antes da modificação da sonda pelo método de ruído térmico, conduzido pelo próprio equipamento, apresentando uma faixa de valores entre 87 e 104  $\text{pN} \cdot \text{nm}^{-1}$ . A sensibilidade de deflexão (*Involts*) dos cantiléveres foram determinados pela função *GetReal* presente no software AR SPM versão 13, a qual exibiu valores na faixa de 60 a 75  $\text{nm} \cdot \text{V}^{-1}$ . As curvas foram coletadas em 200 regiões diferentes em dois mapas de força de 100  $\mu\text{m}^2$  em uma grade de 10 x 10 pixels. Os valores de força de *pull-off* foram normalizadas pelo raio da sonda ( $D= 5 \mu\text{m}$ ) e as energias de adesão foram obtidas pela integração da área entre a curva de retração e a linha de base (força zero).

#### 5.2.21. Análise estatística dos dados

Dados quantitativos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) a 5% de significância. Quando diferenças significativas foram identificadas ( $p < 0,05$ ), aplicou-se o teste de Tukey para comparação das médias utilizando 5% de significância.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

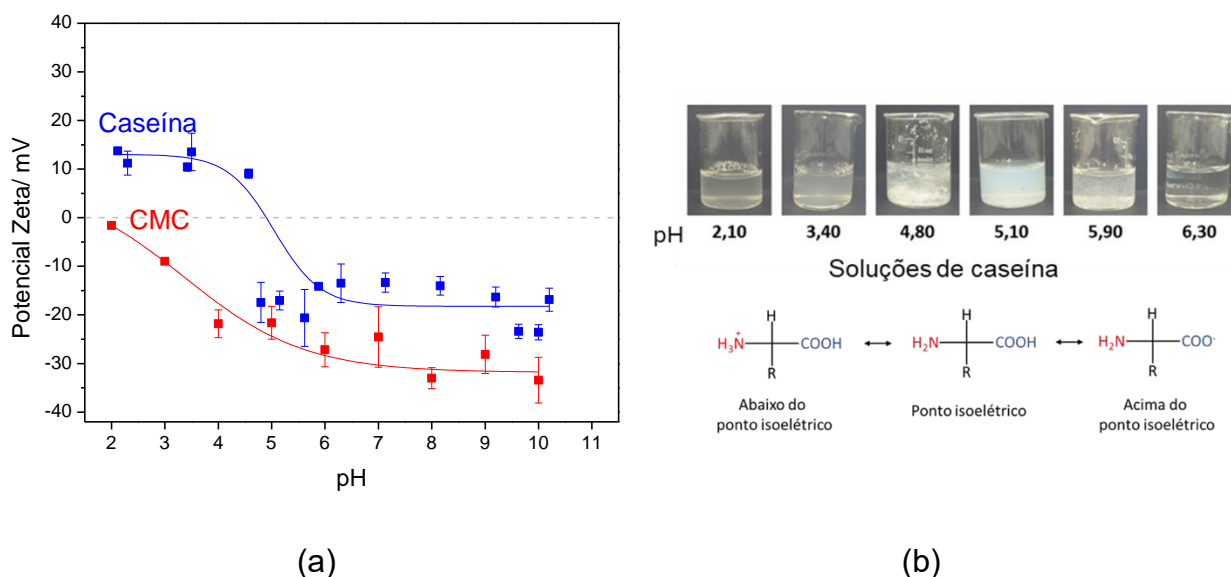
### 6.1. Produção da bicamada caseína-carboximetilcelulose por *casting* contínuo

Para a elaboração dos filmes bicamadas, foram realizados alguns testes iniciais com a finalidade de definir as melhores condições e formulações para a produção do material biestruturado. Em um primeiro momento, foram produzidos filmes monocamadas de CMC e caseína por *casting* de bancada para a otimização de suas composições. Para tal, foram avaliadas as cargas superficiais das soluções poliméricas, concentração de plastificante (glicerol) e, para o caso da CMC, o tipo (ácido cítrico ou ácido 1,2,3,4,- butanotetracarboxílico, BTCA), concentração de reticulante e o uso de catalizador (hipofosfito de sódio, HPS). Os materiais foram caracterizados principalmente por testes mecânicos e de solubilidade em água. Posteriormente, foi investigado as condições de produção dos filmes por *casting* contínuo, no qual foi conduzido um estudo reológico da solução polimérica a fim de adequar o sistema à metodologia escalonada e avaliar possíveis efeitos de orientação das cadeias poliméricas durante o processo de laminação. Por fim, filmes bicamadas de caseína-CMC (CA-CMC) foram obtidos e foi observado uma baixa aderência entre as camadas poliméricas. Desta forma, fez-se a incorporação do reticulante proteico ácido tânico (AT) na camada de CMC, o qual proporcionou um aumento significativo da adesão interfacial. A hipótese é que o polifenol induz a formação de reticulação interfacial e interações secundárias que possibilitam a compatibilidade entre as matrizes. Tal discussão foi mais bem elaborada na **seção 6.1.4**, onde foi avaliado a influência da composição de reticulantes (AT e BTCA) e a contribuição das interações secundárias na adesão interfacial do sistema. Esta última foi feita por meio de cálculos teóricos utilizando o modelo VOGG.

#### 6.1.1. Otimização das composições dos filmes monocamadas de CMC e caseína

Dado que a CMC é um polieletrólito aniônico e a caseína pode apresentar cargas negativas e positivas dependendo do pH, as cargas líquidas

superficiais foram estimadas em função do pH por medidas do potencial Zeta, como mostrado na **FIGURA 6.1**.



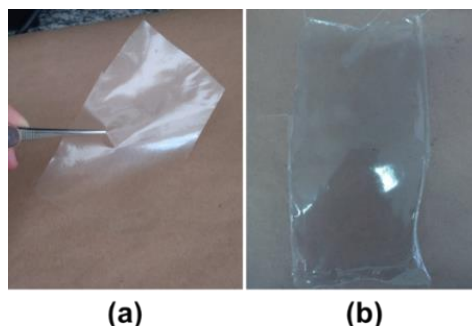
**FIGURA 6.1.** (a) Curvas do potencial Zeta em função do pH das soluções aquosas de caseína e CMC e (b) imagens das soluções de caseína em água nos diferentes pH e representação esquemática da protonação e desprotonação das proteínas quando abaixo, acima e no ponto isoelétrico.

Os valores de potenciais da CMC se mantiveram negativos por todo o intervalo investigado devido aos grupamentos hidroxilas e carboxilas presente na estrutura do polissacarídeo (**FIGURA 6.1a**) (He et al., 2015). As soluções poliméricas de CMC utilizadas para a produção de filmes foram feitas no pH natural de solubilização, em torno de 3. A caseína, por ser uma proteína, apresenta grupos carboxilas e aminas que são protonados e desprotonados dependendo do pH do meio (**FIGURA 6.1b**), apresentando seu ponto isoelétrico ( $pI$ ) próximo a 4,7. Entretanto, observou-se que as soluções de caseína são instáveis em pH abaixo do  $pI$ , isto porque as interações de van der Waals são mais significativas que as repulsões eletrostáticas, resultando na agregação das cadeias (Ding et al., 2019). Desta forma, optou-se por utilizar soluções de caseína em pH 7 para a produção dos filmes, uma vez que atinge um *plateau* com a maior magnitude das cargas elétricas o que mantém o sistema estável. Considerando que a proposta de trabalho visa a deposição de uma camada sobre a outra e que ambas as soluções poliméricas apresentam cargas negativas, acredita-se que a repulsão eletrostática não afete significativamente a adesão entre

as camadas uma vez que a formação de ligação de hidrogênio e incorporação de reticulantes tenha uma contribuição mais significativa na interface do sistema.

Para a determinação das melhores composições dos filmes, produziu-se filmes de caseína 2% (m/v, b.u.) contendo diferentes concentrações do plastificante glicerol (0, 15, 30 e 50 %m/m b.s.). Para os filmes de CMC 2% (m/v, b.u.), testou-se diferentes concentrações de glicerol (0, 5, 15, 30 e 50 %m/m b.s.), diferentes reticulantes (ácido cítrico ou BTCA) e concentrações (5, 15, 30 % m/m b.s.) e o uso de catalizador (HPS) para a promoção da reticulação. O uso de reticulante na composição dos filmes polissacarídeos teve com intuito aumentar a resistência do filme a umidade, visto que a CMC é bastante solúvel em água. Os critérios considerados para a determinação das melhores composições dos filmes foram os aspectos subjetivos, os atributos mecânicos de tração uniaxial e a solubilidade em água.

Todos os filmes obtidos foram transparentes, contínuos e autossuportáveis (**FIGURA 6.2**), sendo que aqueles contendo glicerol foram mais maleáveis e manuseáveis em comparação aos sem o plastificante. Para os filmes de caseína adicionados com 50% de glicerol, observou-se um aspecto “gorduroso” do material causado pela exsudação do plastificante, característica indesejável.



**FIGURA 6.2.** *Imagens dos filmes de (a) carboximetilcelulose e (b) caseína produzidos por casting de bancada.*

Os valores das propriedades mecânicas e a solubilidade dos filmes estão apresentados na **TABELA 6.1**. Os filmes de CMC apresentaram uma diminuição da resistência e rigidez mecânica com o aumento da concentração de glicerol. Tal efeito se deve ao alojamento das moléculas de plastificante entre as cadeias poliméricas, o que resulta no enfraquecimento das interações intermoleculares (Brzoska et al., 2018), corroborado com o aumento da elongação na ruptura.

**TABELA 6.1.** Valores dos atributos mecânicos – resistência à tração ( $\sigma$ ), alongação na ruptura ( $\epsilon$ ) e módulo de elasticidade ( $E$ ) – e da solubilidade em água dos filmes de carboximetilcelulose (CMC) e caseína (CA). Diferentes índices indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dentro da mesma coluna.

Filmes de CMC	$\sigma$ / MPa	$\epsilon$ / %	$E$ / GPa	Solubilidade/ %
CMC	55 ± 4 <sup>a</sup>	6 ± 1 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>
CMC <sub>5%Gli</sub>	41 ± 7 <sup>b</sup>	7 ± 3 <sup>ab</sup>	1,5 ± 0,2 <sup>b</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>
CMC <sub>15%Gli</sub>	47 ± 6 <sup>ab</sup>	17 ± 2 <sup>c</sup>	1,3 ± 0,3 <sup>bc</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>
CMC <sub>30%Gli</sub>	19 ± 1 <sup>c</sup>	14 ± 1 <sup>c</sup>	0,80 ± 0,04 <sup>d</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>
CMC <sub>50%Gli</sub>	13 ± 2 <sup>d</sup>	25 ± 2 <sup>d</sup>	0,411 ± 0,006 <sup>e</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>
CMC <sub>15%Gli+5%AC</sub>	27 ± 2 <sup>e</sup>	3 ± 1 <sup>e</sup>	1,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>
CMC <sub>15%Gli+15%AC</sub>	27 ± 2 <sup>e</sup>	3 ± 1 <sup>e</sup>	1,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>
CMC <sub>15%Gli+30%AC</sub>	18 ± 6 <sup>cd</sup>	2 ± 1 <sup>ae</sup>	1,12 ± 0,06 <sup>c</sup>	45 ± 2 <sup>b</sup>
CMC <sub>15%Gli+15%AC+HPS</sub>	15 ± 4 <sup>cd</sup>	4 ± 1 <sup>e</sup>	0,90 ± 0,04 <sup>df</sup>	49 ± 2 <sup>b</sup>
CMC <sub>15%Gli+15%BTCA</sub>	22 ± 7 <sup>cde</sup>	2,0 ± 0,5 <sup>e</sup>	1,6 ± 0,3 <sup>ab</sup>	45 ± 1 <sup>b</sup>
CMC <sub>15%Gli+15%BTCA+HPS</sub>	14 ± 2 <sup>d</sup>	2,1 ± 0,2 <sup>e</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>cf</sup>	22 ± 9 <sup>c</sup>
CA	3,1 ± 0,2 <sup>f</sup>	15 ± 8 <sup>bcd</sup>	0,13 ± 0,03 <sup>gi</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>
CA <sub>15%Gli</sub>	8 ± 1 <sup>g</sup>	2,3 ± 0,5 <sup>e</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>h</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>
CA <sub>30%Gli</sub>	3,0 ± 0,4 <sup>f</sup>	40 ± 11 <sup>f</sup>	0,22 ± 0,05 <sup>g</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>
CA <sub>50%Gli</sub>	0,7 ± 0,1 <sup>h</sup>	37 ± 10 <sup>f</sup>	0,020 ± 0,002 <sup>i</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>

*Gli- glicerol, AC- ácido cítrico, BTCA- ácido 1,2,3,4-butanotetracarboxílico, HPS- hipofosfito de sódio.*

A incorporação de reticulante na matriz de CMC aumentou a resistência mecânica e diminuiu a extensibilidade dos filmes, provocando um efeito contrário do observado para o plastificante. Em relação ao uso do ácido cítrico e o BTCA, o desempenho mecânico foi similar para ambos os reticulantes. Entretanto, no que se refere à solubilidade do material em água, o BTCA mostrou ser mais eficiente uma vez que diminuiu significativamente a solubilidade dos filmes com apenas 15% de aditivo. Isto é justificado pelo maior número de carboxilas disponíveis na estrutura do

BTCA, as quais sofrem esterificação e formação de ligações covalentes com as hidroxilas da estrutura polissacarídica (Demitri et al., 2008). O HPS é utilizado como catalisador para a reação de esterificação que, segundo a literatura, atua na aceleração da formação do anidrido intermediário (Alavarse et al., 2022). Alguns trabalhos apontam que a presença do sal não afeta o rendimento da reação (Azeredo et al., 2015); no entanto, observou-se que o HPS apresentou influência apenas para os filmes reticulados com BTCA, reduzindo a solubilidade do material em cerca de 80%. Para os filmes de caseína, o efeito do glicerol mostrou a mesma tendência observada para os filmes de CMC. Os valores da resistência à tração e do módulo de elasticidade foram, em geral, inferiores aos dos filmes polissacarídeos; entretanto, os valores de alongação na ruptura são similares ou maiores, o que sugere maior mobilidade entre as estruturas poliméricas.

Para as etapas subsequentes, optou-se por utilizar filmes de caseína contendo 30% de glicerol e filmes de CMC contendo 15% de glicerol e o uso de BTCA como reticulante, tendo sua concentração variada de 5 a 30%, na presença do catalisador HPS.

### **6.1.2. Otimização dos parâmetros para obtenção de filmes por *casting* contínuo**

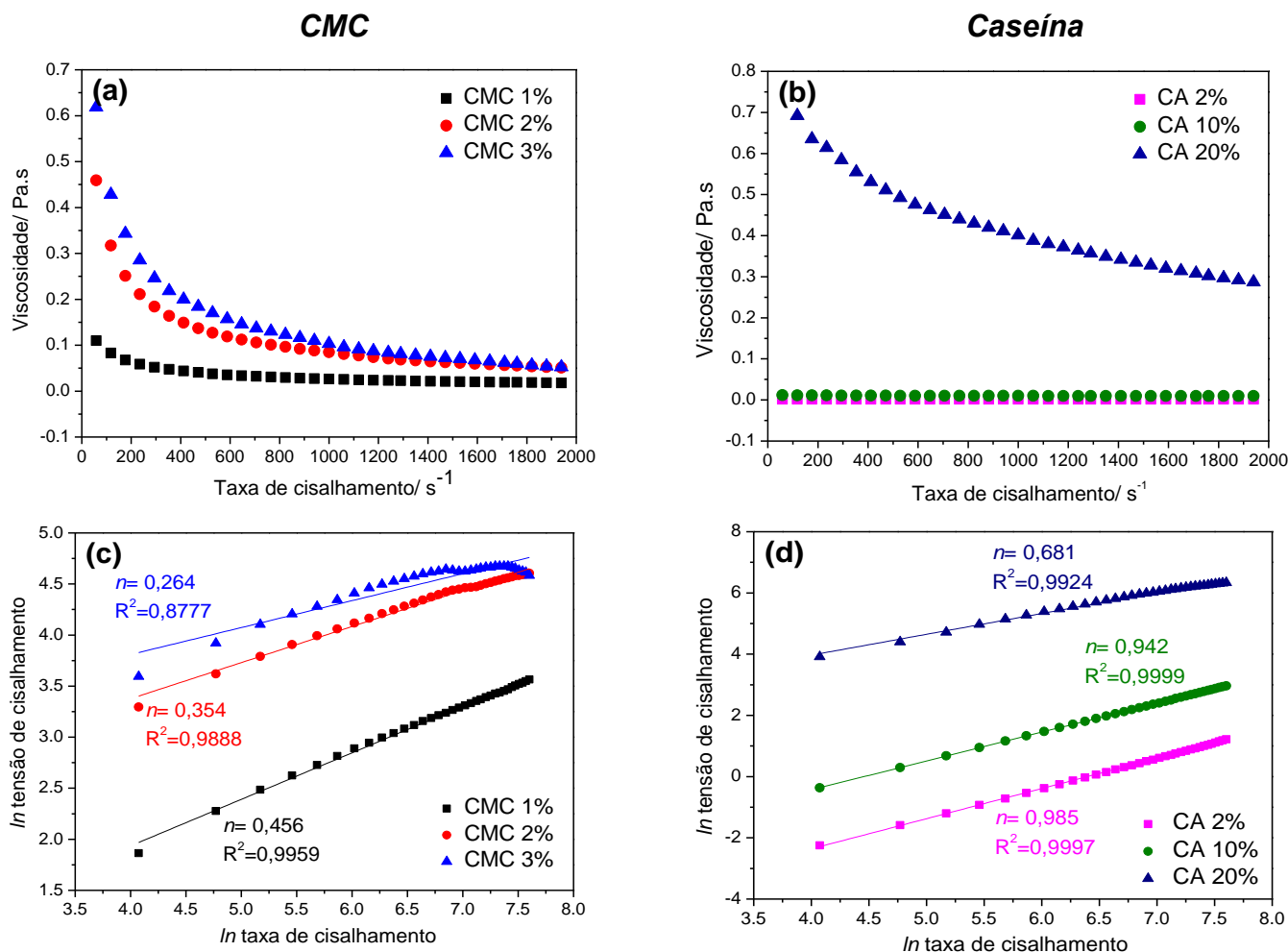
O uso do *casting* contínuo para a produção de filmes é um processo escalonável que proporciona a obtenção de filmes homogêneos, com espessuras uniformes e a minimização da influência do operador e das condições ambientais durante a secagem dos filmes (Otoni et al., 2021). Outro ponto favorável em relação ao *casting* em batelada é que a alimentação contínua reduz o tempo ocioso aumentando a produtividade, além de menor espaço físico necessário para a produção. Nesta sessão foi abordado os parâmetros necessários para a produção dos filmes biopoliméricos no sistema de *casting* contínuo, produção dos filmes bicamadas CA-CMC, a avaliação da adesão entre as camadas de caseína e CMC e a caracterização dos filmes. As espessuras dos filmes produzidos por *casting* contínuo variaram entre 0,01 e 0,09 mm para os monocamadas e entre 0,05 e 0,11 mm para os bicamadas.

Um dos principais desafios do *casting* contínuo é a otimização dos parâmetros de produção, uma vez que estes alteram-se de acordo com o sistema polimérico envolvido. Parâmetros como espessura úmida de laminação, temperatura de secagem e intensidade da convecção do ar foram inicialmente determinadas de forma empírica. O efeito da concentração e da velocidade do substrato foram estudados mais detalhadamente uma vez que influenciam diretamente a laminação das soluções poliméricas.

A concentração da solução filmogênica e, conseqüentemente, sua viscosidade, são fatores cruciais para que ocorra a laminação. Soluções pouco viscosas tendem a escoar por debaixo da lâmina, enquanto soluções muito viscosas levam a um filme laminado descontínuo e com defeitos. Foram realizadas análises reológicas para diferentes concentrações de soluções de CMC (1, 2 e 3% m/v) e caseína (2, 10 e 20% m/v), como apresentado na **FIGURA 6.3**. O índice de fluxo ( $n$ ) (**FIGURA 6.3 c-d**) descreve o quanto o fluido desvia do comportamento Newtoniano ( $n = 1$ ), o qual indicou um comportamento pseudoplástico ( $n < 1$ ) para as soluções de CMC. Para soluções de caseína, o comportamento reológico foi próximo ao Newtoniano ( $n = 1$ ) para CA 1% e CA 10%, o qual passou a ser pseudoplástico ( $n < 1$ ) com o aumento da concentração para 20% (CA 20%).

De acordo com as observações empíricas, as soluções de CMC podem ser laminadas em todas as concentrações avaliadas; no entanto, as soluções contendo 1 e 2% (m/v) escorriam pelo substrato e não resultaram em filmes com aparência uniforme. Soluções de caseína abaixo de 10% não puderam ser laminadas. Assim, foi estipulado que a faixa de viscosidade das soluções poliméricas para que fossem passíveis de serem laminadas deve estar entre 1,5 e 2,9 Pa.s, e as concentrações escolhidas foram 3% (m/v) para CMC e 20% (m/v) para caseína.

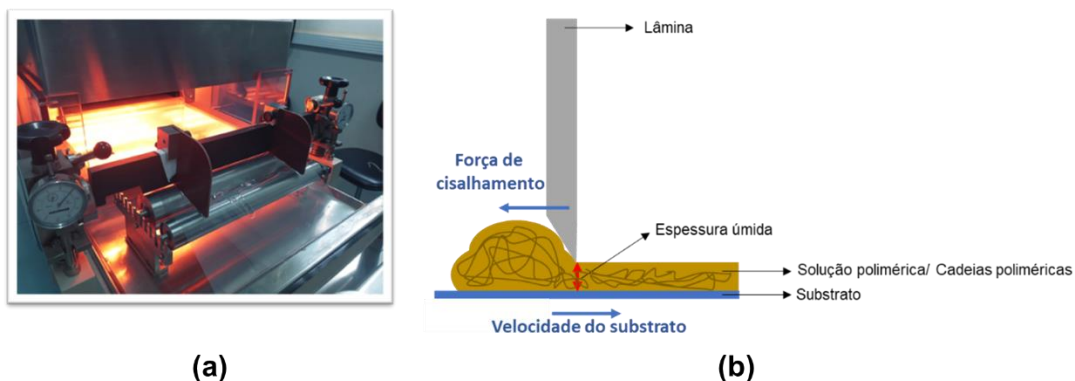
O comportamento pseudoplástico remete a variação da viscosidade de um fluido em função da taxa de tensão de cisalhamento que é aplicada e, a viscosidade por sua vez, refere-se à resistência das cadeias em se alinharem ao fluxo (Canevaloro, 2006).



**FIGURA 6.3.** (a-b) Curvas da viscosidade em função da taxa de cisalhamento e (c-d) curvas logarítmicas da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para soluções de CMC e caseína em diferentes concentrações. Os valores de índice de fluxo ( $n$ ) correspondem ao coeficiente linear das curvas logarítmicas.

Desta forma, é válido considerar que na etapa de laminação do *casting* contínuo há a aplicação de uma força cisalhante sobre a solução polimérica, e esta sendo um fluido pseudoplástico, varia sua viscosidade e, conseqüentemente, o alinhamento das cadeias dependendo da taxa de cisalhamento aplicado. Desta forma, o processo de laminação pode afetar a organização das cadeias quando as soluções poliméricas são forçadas contra uma lâmina, como esquematizado na **FIGURA 6.4**.

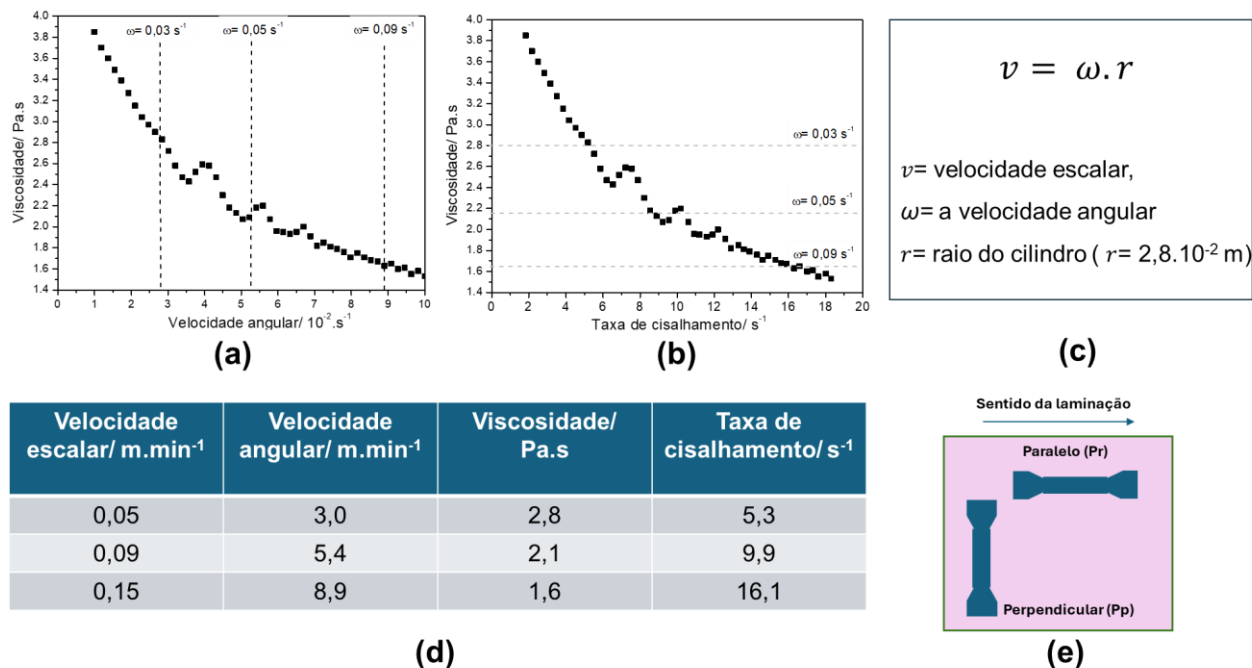
A hipótese de que os materiais secos pudessem apresentar certa anisotropia nas propriedades, resultado da orientação das cadeias, foi investigada pela produção de filmes a partir de uma solução polimérica de 3% (m/v, b.u.) de CMC contendo 15% (m/m, b.s.) de glicerol em diferentes velocidades de laminação.



**FIGURA 6.4.** (a) Sistema de laminação da máquina de casting contínuo e (b) representação do alinhamento das cadeias poliméricas devido ao cisalhamento promovido pela etapa de laminação.

Para tal, foi escolhido velocidades de laminação que correspondessem a viscosidades distintas, ou seja, diferentes graus de orientação das cadeias poliméricas. Assim, foi necessário fazer uma correspondência entre as velocidades de laminação (velocidades escalares) e as velocidades aplicadas em um equipamento reômetro (velocidades angulares), sendo que as velocidades escalares avaliadas foram  $0,05$ ,  $0,09$  e  $0,15 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ , as quais correspondem às velocidades angulares  $0,03$ ,  $0,05$  e  $0,09 \text{ s}^{-1}$ , respectivamente. A possível anisotropia dos filmes foi avaliada por testes de tração uniaxial utilizado corpos de prova cortados nas direções perpendicular e paralelo à direção do cisalhamento para cada filme obtido em cada uma das três velocidades. O estudo realizado está esquematizado na **FIGURA 6.5**.

A viscosidade variou aproximadamente  $1,19 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  entre as velocidades  $0,05$  e  $0,15 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ , o que corresponde a um aumento de  $12,2 \text{ Pa}$  na tensão de cisalhamento aplicado ao sistema, o que afetaria a orientação das cadeias poliméricas. No entanto, as análises mecânicas dos filmes (**TABELA 6.2**) não mostraram variação significativa no desempenho do material em relação à direção e velocidade de laminação. Isso indica que houve relaxação das cadeias poliméricas antes que os filmes fossem completamente secos, o qual leva em torno de  $40 \text{ min}$ . Este estudo mostrou que a viscosidade e a velocidade de laminação podem ser ajustadas a fim de otimizar o processo de laminação sem que afete as propriedades finais dos filmes.



**FIGURA 6.5.** (a-b) Curvas reológicas da solução polimérica de CMC com destaques das velocidades angulares avaliadas que correspondem diferentes viscosidade e taxa de cisalhamento. (c) A equação descrita relaciona a velocidade angular com a velocidade escalar utilizada durante a laminação dos filmes. (d) A tabela mostrada apresenta os valores das propriedades reológicas atreladas às velocidades mencionadas. (e) O esquema representa a obtenção dos corpos de prova nas direções paralela e perpendicular à direção de laminação.

**TABELA 6.2.** Valores dos atributos mecânicos –resistência a tração ( $\sigma$ ), alongação na ruptura ( $\mathcal{E}$ ) e módulo de elasticidade ( $E$ )– dos corpos de prova do filme de CMC no sentido paralelo e perpendicular à laminação e em diferentes velocidades de laminação. Diferentes índices indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dentro da mesma coluna.

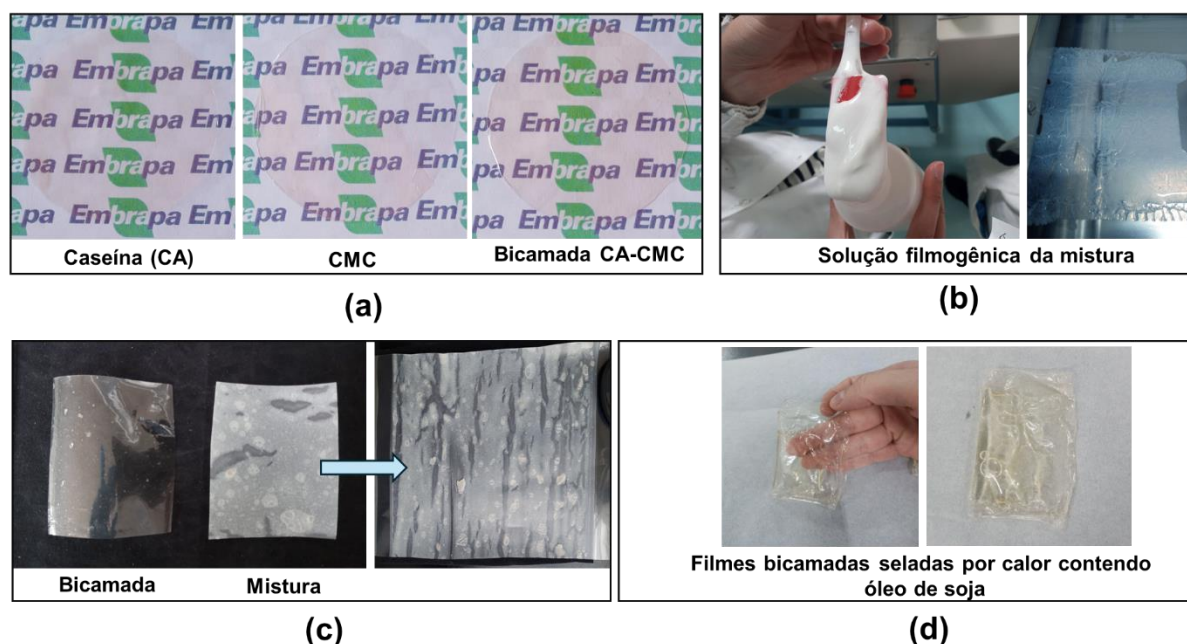
Parâmetros dos filmes	$\sigma$ / MPa	$\mathcal{E}$ / %	$E$ / GPa
<b>Sentido paralelo à laminação</b>			
Velocidade 0,05 $\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$	$25 \pm 4^a$	$4,0 \pm 0,2^a$	$1,5 \pm 0,1^a$
Velocidade 0,09 $\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$	$18 \pm 1^b$	$5 \pm 1^a$	$1,1 \pm 0,1^b$
Velocidade 0,15 $\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$	$25 \pm 2^a$	$4,1 \pm 0,4^a$	$1,5 \pm 0,1^a$
<b>Sentido perpendicular à laminação</b>			
Velocidade 0,05 $\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$	$23 \pm 3^a$	$4,3 \pm 0,4^a$	$1,4 \pm 2,0^a$
Velocidade 0,09 $\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$	$14 \pm 3^b$	$4 \pm 2^a$	$0,8 \pm 0,2^b$
Velocidade 0,15 $\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$	$24 \pm 2^a$	$4 \pm 1^a$	$1,5 \pm 0,1^a$

### 6.1.3. Produção de filmes bicamadas de caseína e CMC (CA-CMC) por *casting* contínuo

Filmes bicamadas foram desenvolvidos utilizando uma camada de CMC como suporte, sobre a qual foi depositada uma camada de caseína (**FIGURA.5.1**). A reticulação da CMC com BTCA teve como intuito aumentar a resistência à umidade e contribuir para a integridade do material em ambientes úmidos, uma vez que a CMC é solúvel em água. A caseína apresenta um caráter anfifílico o qual vislumbra-se que possa auxiliar na compatibilidade entre a camada base de CMC (hidrofílica) e a camada de impermeabilizante de zeína (hidrofóbica), que será depositada nas próximas etapas do trabalho.

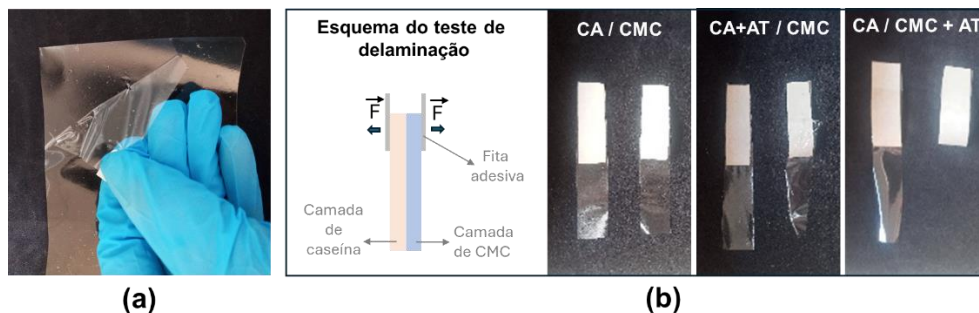
Os filmes biestruturados obtidos foram transparentes, contínuos e autossuportáveis, assim como os respectivos monocamadas (**FIGURA 6.6 a**). Considerando que o material bicamada requer uma etapa adicional de laminação que um filme monocamada, que resulta em maior consumo energético e tempo de produção, testou-se a obtenção um filme a partir da mistura de ambos os polímeros em uma única camada. Durante a preparação, houve a formação de uma mistura esbranquiçada causada pela complexação dos polímeros e/ou coagulação da caseína devido ao abaixamento do pH quando misturada com a CMC (**FIGURA 6.6 b**) (Chen et al., 2019; Li et al., 2022). O filme obtido foi descontínuo, com precipitados e não autossuportável (**FIGURA 6.6 c**).

Portanto, os filmes bicamadas mostraram-se uma estratégia para a combinação das matrizes de proteína e polissacarídeo mantendo sua continuidade, além de promover uma área interfacial que abrange toda a extensão bidimensional do material, favorecendo fenômenos como transferência de tensão e compatibilidade entre os componentes (Chen et al., 2019). Foi realizado um teste em que as bicamadas foram configuradas em pacotes, com a face de caseína voltada para o interior, em que foi armazenado óleo de soja (**FIGURA 6.6 d**). Os filmes bicamadas foram passíveis de serem selados à quente e apresentaram resistência ao óleo, sendo que os mesmos ficaram estáveis por mais de quatro semanas.



**FIGURA 6.6.** (a) Imagens dos filmes monocamadas e bicamadas produzidos a partir da combinação de CMC e caseína. (b) A mistura de ambos os polímeros resultou em uma solução esbranquiçada a qual apresentou um aspecto não homogêneo durante a laminação no processo de casting contínuo. (c) Os filmes obtidos a partir da mistura foram opacos e com defeitos. (d) Pacotes selados à quente utilizando os filmes bicamadas, com a face de caseína voltada para o interior, permitiram a contenção de óleo de soja por mais de 4 semanas.

Os filmes bicamadas contendo a matriz de CMC reticulada com BTCA eram facilmente delaminados quando manipulados, devido à baixa adesão entre as camadas (**FIGURA 6.7a**). A interação entre ambos os polímeros em meio aquoso ocorre principalmente através das interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio entre as carboxilas do polissacarídeo e as aminas proteicas (Souza et al., 2024). No entanto, tais interações não se mostraram suficientes para manter as camadas aderidas após a secagem dos filmes. Desta forma, fez-se necessário a introdução de um agente compatibilizante que atuasse no aumento da energia de superfície e na formação de ligações covalentes na região interfacial (Ajitha. & Thomas, 2020; Sarath et al., 2014). O ácido tânico (AT) é um polifenol comumente utilizado na reticulação proteica, além de apresentar uma alta disposição de hidroxilas que podem interagir por interações secundárias com as proteínas e os polissacarídeos (Picchio et al., 2018).



**FIGURA 6.7.** (a) Imagem do filme bicamada delaminado e o (b) esquema do teste qualitativo de delaminação em que uma fita adesiva foi colada em cada face. As imagens mostram os filmes bicamadas de caseína e carboximetilcelulose sem adição do ácido tânico (CA/CMC), com a adição do ácido tânico na camada de caseína (CA+AT/CMC) e com a adição de ácido tânico na camada de CMC (CA/CMC+AT) após a delaminação.

A literatura aponta que o mecanismo de reação ocorre a partir da oxidação do AT resultando na formação de uma quinona, a qual reage com a proteína via reação de Michael ou por meio da formação de uma base de Schiff (Alavarse et al., 2022). No entanto, o mecanismo de reação ainda não foi totalmente elucidado, mas há um consenso acerca da necessidade da presença de oxigênio para o processo oxidativo (Chen et al., 2022). O uso do AT teve o intuito de aumentar a adesão entre as camadas de CMC e caseína. Hipotetiza-se que o AT interage por meio de ligações secundárias com o polissacarídeo e ligações covalentes com a proteína na interface.

Inicialmente, testou-se adicionar o AT na camada de caseína, no entanto, os filmes ainda apresentaram baixa adesão sugerindo a ocorrência de reticulação entre as cadeias da proteína ao invés da reticulação CMC-caseína, mostrando baixa interação com a matriz de CMC. No entanto, a incorporação do AT na camada de CMC resultou no aumento considerável da adesão entre as camadas, as quais não foram passíveis de serem delaminadas manualmente. Tais observações foram feitas com base em um teste simples e qualitativo de delaminação, no qual uma fita adesiva foi colada em cada face e, posteriormente, manualmente delaminada (**FIGURA 6.7 b**). O BTCA é um ácido policarboxílico presente na composição da camada de CMC; desta forma, este também pode influenciar na promoção de interações secundárias (e.g. ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e interações eletrostáticas) e na ação do AT na adesão do sistema. Assim, diferentes proporções de BTCA a AT foram incorporadas na camada de CMC a fim de avaliar o efeito de ambos os reticulantes e a contribuição de cada um nas interações interfaciais entre as camadas poliméricas.

### 6.1.4. Avaliação dos efeitos dos reticulantes nas interações interfaciais e nas propriedades dos filmes

Considerando o efeito do AT na promoção da adesão interfacial, diferentes proporções entre AT e BTCA foram investigadas para avaliar o impacto e a combinação desses reticulantes. Os filmes bicamadas foram nomeados segundo as concentrações de BTCA e AT incorporados na camada de CMC, o qual seguiu a estrutura CA-CMC<sub>BTCA/AT</sub>. Foram investigadas cinco diferentes composições, a saber: CA-CMC<sub>15/0</sub>, CA-CMC<sub>15/5</sub>, CA-CMC<sub>15/30</sub>, CA-CMC<sub>30/30</sub> e CA-CMC<sub>0/30</sub>. Inicialmente, foram produzidos filmes controles monocamadas de CMC, nas diferentes composições, e de caseína. Estes foram caracterizados segundo suas propriedades mecânicas e de afinidade com a água, como mostrado na **TABELA 6.3**.

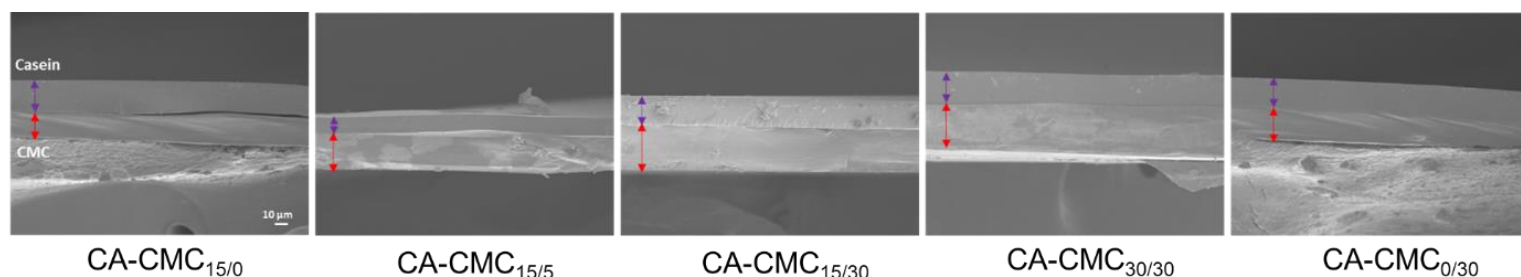
**TABELA 6.3.** Valores dos atributos mecânicos e afinidade com a água- permeabilidade ao vapor de água (PVA), ângulo de contato (AC) grau de intumescimento (GI) e grau de solubilidade (GS). Os valores de GI e GS foram obtidos após 24 h e o AC após 30 s de análise. Diferentes índices indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dentro da mesma coluna.

Filmes	$\sigma$ / MPa	$\epsilon$ / %	E/ GPa	PVA/			
				$10^{-6}.m.h^{-1}.Pa^{-1}$	AC/ °	GI/ %	GS/ %
CA	$9 \pm 1^a$	$25 \pm 9^a$	$2 \pm 1^a$	$0,6 \pm 0,04^a$	$81 \pm 4^a$	$3,0 \pm 0,4^a$	$100 \pm 0^a$
CMC	$39 \pm 4^b$	$2,7 \pm 0,4^b$	$16 \pm 6^{bc}$	$0,4 \pm 0,004^b$	$40 \pm 3^b$	$50 \pm 1^b$	$100 \pm 0^a$
CMC <sub>15/0</sub>	$25 \pm 4^c$	$1,2 \pm 0,5^c$	$16 \pm 2^b$	$0,4 \pm 0,02^b$	$75 \pm 6^a$	$32 \pm 2^c$	$49 \pm 2^b$
CMC <sub>15/5</sub>	$20 \pm 1^c$	$7 \pm 3^d$	$16 \pm 3^b$	$0,1 \pm 0,005^d$	$75 \pm 5^a$	$6,1 \pm 0,3^d$	$55 \pm 5^c$
CMC <sub>15/30</sub>	$20 \pm 1^c$	$3 \pm 1^{bc}$	$9,5 \pm 0,3^c$	$0,1 \pm 0,001^d$	$48 \pm 14^b$	$6,2 \pm 0,3^d$	$62 \pm 7^d$
CMC <sub>30/30</sub>	$24 \pm 6^c$	$4 \pm 1^b$	$10,3 \pm 0,1^d$	$0,3 \pm 0,003^e$	$78 \pm 14^a$	$3,0 \pm 0,2^a$	$59 \pm 2^d$
CMC <sub>0/30</sub>	$19 \pm 1^c$	$2,5 \pm 0,4^b$	$16 \pm 3^b$	$0,1 \pm 0,001^d$	$37 \pm 7^b$	$32 \pm 1^c$	$100 \pm 0^a$

Os filmes de caseína mostraram-se menos resistentes e rígidos que os filmes de CMC, mas apresentaram maior alongação na ruptura. Além disso, os filmes proteicos foram menos suscetíveis à molhabilidade e exibiram menor capacidade de intumescimento. Em relação aos filmes de CMC, observou-se que suas propriedades

são moduladas pelas proporções dos reticulantes BTCA e AT. A introdução do BTCA tornou os filmes mais rígidos e menos extensíveis, além reduzir significativamente seus graus de intumescimento e de solubilidade. A introdução do AT causou um efeito mais pronunciado no aumento dos valores de alongação, contribuindo também para a diminuição da permeabilidade à água e do intumescimento dos mesmos. No entanto, essas características foram variadas de acordo com as proporções dos reticulantes utilizadas, sugerindo um balanço entre os efeitos de ambos os aditivos. O BTCA atua na formação de ligações cruzadas entre as cadeias polissacarídicas, resultando na restrição da mobilidade das cadeias e promovendo maior resistência à água (Demitri et al., 2008). A adição do AT, também pode cooperar para tais efeitos visto sua alta disponibilidade de hidroxilas propicia a interações secundárias do tipo polares e ligações de hidrogênio (Missio et al., 2020). No entanto, o polifenol é uma macromolécula volumosa que se aloja entre as cadeias poliméricas, enfraquecendo as forças intermoleculares e favorecendo a acomodação de umidade (Eliasson et al., 2023). Assim, sugere-se que ambos os fenômenos cooperam para as propriedades finais dos filmes poliméricos.

A **FIGURA 6.8** contém as imagens de MEV-FEG das secções transversais dos materiais biestruturados.

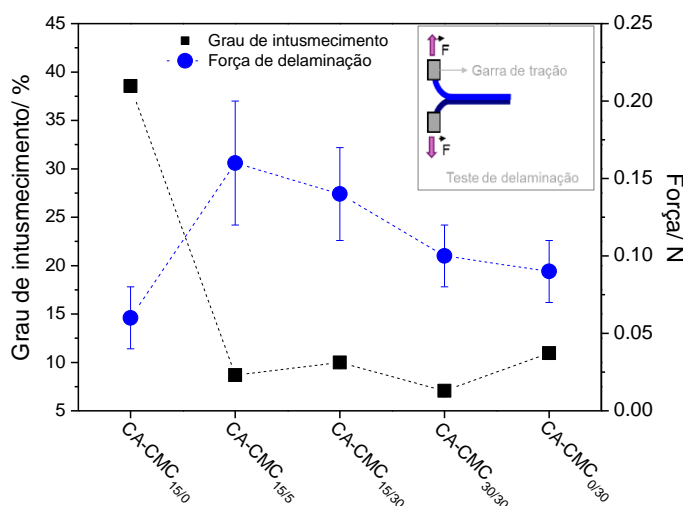


**FIGURA 6.8.** *Imagens MEV-FEG da secção transversal dos filmes bicamadas de CA-CMC nas diferentes composições.*

As superfícies transversais de cada camada exibiram morfologias homogêneas e ausência de defeitos na espessura dos filmes. O contraste das imagens permitiu a identificação das camadas proteicas e polissacarídicas, assim como delimitar uma interface. Não foi observado separação entre as camadas, exceto para o filme CA-CMC<sub>15/0</sub> que apresentou baixa adesão como já discutido.

A **FIGURA 6.9** correlaciona o grau de intumescimento dos filmes com a força necessária para delaminar as camadas. Os filmes CA-CMC<sub>15/0</sub> apresentaram

grau de intumescimento de 40%, o que decaiu consideravelmente para 10% com a incorporação do AT na camada de CMC. Tal comportamento sugere que o polifenol introduzido na matriz de CMC reticulou com a caseína na região interfacial do sistema, o que desfavoreceu a acomodação de umidade entre as camadas, assim como, indisponibilizou os grupamentos polares capazes de interagir com a água. Isto é suportado se considerarmos que a introdução de compostos ricos em hidroxilas resultaria em maior afinidade com as moléculas de água que, conseqüentemente, contribuiria para uma maior absorção de umidade (Xie et al., 2021); entretanto, o contrário foi observado. Em relação às diferentes proporções entre BTCA e AT, notou-se mudanças sutis no intumescimento dos filmes, sugerindo que o BTCA tende a aumentar a afinidade com água, enquanto o AT desfavorece tal fenômeno.

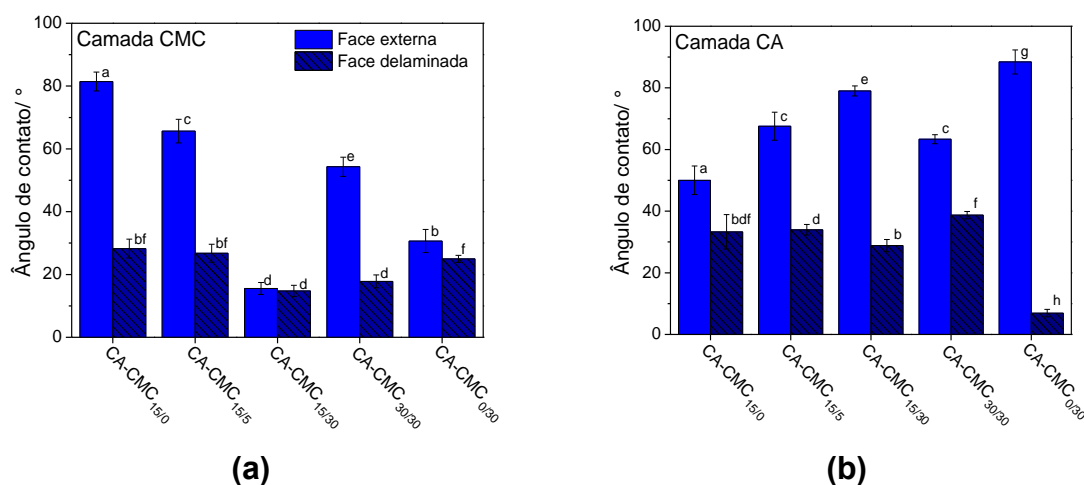


**FIGURA 6.9.** Relação entre os valores do grau de intumescimento e força de delaminação dos filmes bicamadas CA-CMC nas diferentes composições. O teste de delaminação foi feito segundo esquematizado na figura.

O teste de delaminação mecânica mediu a força necessária para separar as camadas. Vale ressaltar que os altos valores de desvios são causados pela não uniformidade de aderência interfacial, ou seja, visualmente foi possível observar regiões mais fáceis de separar que outras. Os filmes CA-CMC<sub>15/5</sub> tiveram um aumento de 106% na força em relação àquele sem a presença de AT (CA-CMC<sub>15/0</sub>), indicando que a presença do polifenol afeta a adesão entre as camadas. Porém, o aumento das concentrações de BTCA e AT provocaram o decaimento das forças de delaminação. Vale ressaltar que o filme CA-CMC<sub>0/30</sub>, contendo apenas o polifenol como reticulante, demonstrou uma adesão 30% superior daquele contando apenas BTCA, suportando a

atuação do AT na interface do sistema. Os comportamentos opostos entre o grau de intumescimento e a força de delaminação salientou que o AT age na promoção de pontos de ancoragem para a camada de caseína, diminuindo os espaçamentos livres na região interfacial e aumentando a interação entre as matrizes poliméricas por meio de ligações covalentes e interações polares.

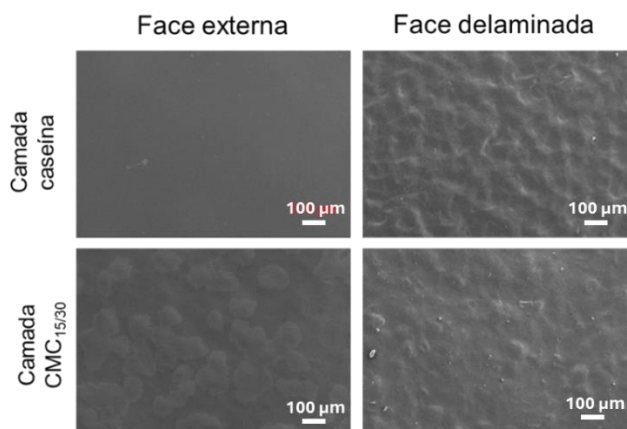
Mudanças na conformação, exposição de grupos funcionais e interações que ocorrem na interface foram investigadas segundo a susceptibilidade à molhabilidade e a mudanças estruturais por espectroscopia FTIR-ATR nas face externa e delaminada de ambas as camadas. A afinidade das superfícies com água pode ser avaliada por medidas do ângulo de contato, como apresentado na **FIGURA 6.10**. As faces delaminadas, em geral, apresentaram menores valores de ângulo de contrato que as faces externas, sugerindo uma maior exposição de grupos polares/hidrofílicos que resulta em uma maior molhabilidade da superfície (Chen et al., 2019). Desta forma, a afinidade com a água das superfícies pode ter contribuição de outros aspectos como a morfologia e rugosidade das superfícies (Faibish et al., 2002), como salientado na **FIGURA 6.11**.



**FIGURA 6.10.** Valores do ângulo de contato para as faces externas e delaminadas de ambas as camadas do filme bicamada CA-CMC. Os valores correspondem a 30 s de análise. Diferentes índices indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) no mesmo gráfico.

Para a camada de CMC, a molhabilidade das faces externas foi afetada pela composição de reticulantes no sistema. O aumento da concentração de BTCA reduziu o valor do ângulo de contato de 65° para 15°, como demonstrado pelos filmes CA-CMC<sub>15/5</sub> e CA-CMC<sub>15/30</sub>. Ostrowska-Czubenko et al., (2013) atribuíram tal

comportamento à redução do número de grupamentos hidrofílicos capazes de interagir com a água, os quais foram esterificados na presença do reticulante.



**FIGURA 6.11.** (a) Esquema das faces externas e delaminada utilizadas nas análises e (b) imagens MEV das superfícies das faces externas e delaminadas de ambas as camadas após a delaminação do filme CA-CMC<sub>15/30</sub>.

A introdução de AT também desfavoreceu a molhabilidade dos filmes CA-CMC<sub>15/5</sub>. Além disso, os valores do ângulo dos filmes CA-CMC<sub>15/0</sub> e CA-CMC<sub>0/30</sub> mostraram que o polifenol proporciona uma maior resistência à molhabilidade que o BTCA. Missio et al., (2018) constataram o mesmo efeito causado pela incorporação de taninos em filmes de nanofibras de celulose. Os autores argumentaram que o tanino é uma molécula volumosa com domínios hidrofílicos e hidrofóbicos, sendo que os sítios hidrofílicos deste interage com os sítios hidrofílicos da celulose resultando na exposição dos sítios hidrofóbicos que, conseqüentemente, diminui a afinidade superficial com a água.

No entanto, os filmes CA-CMC<sub>30/30</sub> mostraram que o aumento da concentração do AT estimulou o caráter hidrofílico da superfície. Isto pode ser atribuído às altas concentrações de BTCA e AT, que após a saturação dos sítios hidrofílicos da matriz, deixam grupos polares disponíveis para interagirem com a água. Este fenômeno é frequentemente observado em filmes incorporados com nanocelulose, no qual as nanoestruturas reduzem o caráter hidrofílico até alcançar uma certa concentração de saturação (Popescu, 2017).

As faces delaminadas da camada de caseína exibiram baixa influência da composição das bicamadas exceto para os filmes CA-CMC<sub>0/30</sub>; em contraposição, as faces externas apresentaram variações significativas nos valores dos ângulos. Considerando que as camadas proteicas tiveram a mesma formulação para todos os

sistemas, a camada de CMC pode ter influenciado na absorção de água durante as análises.

Medidas de FTIR-ATR das superfícies (**FIGURA B1**) foram feitas a fim de investigar mudanças nas exposições de grupos funcionais entre as faces externas e delaminadas. A **TABELA 6.4** mostra a variação das intensidades da transmitância entre as faces ( $\Delta I = I_{\text{face delaminada}} - I_{\text{face externa}}$ ) das bandas características de cada biopolímero. Vale ressaltar que os espectros foram normalizados pela intensidade da banda em  $923 \text{ cm}^{-1}$  que não apresentou variação significativa da intensidade de transmitância dentre as análises.

**TABELA 6.4.** Valores da diferença das intensidades de transmitância ( $\Delta I$ ) entre a face delaminada e a face externa das camadas de caseína e carboximetilcelulose (CMC). Os números de ondas selecionadas referem-se à vibração de ligações típicas de cada matriz polimérica.

	$\Delta I / \%$ (camada de CMC)			$\Delta I / \%$ (camada de caseína)		
	-OH	-COOH	-COO <sup>-</sup>	-OH	-C-NH <sub>2</sub>	-N-C=N
Filmes	$3300 \text{ cm}^{-1}$	$1740 \text{ cm}^{-1}$	$1587 \text{ cm}^{-1}$	$3278 \text{ cm}^{-1}$	$1636 \text{ cm}^{-1}$	$1537 \text{ cm}^{-1}$
CA-CMC <sub>15/0</sub>	30	0	40	-22	-7	21
CA-CMC <sub>15/5</sub>	43	-1	49	-49	-106	-74
CA-CMC <sub>15/30</sub>	-32	-6	-13	-44	-97	-58
CA-CMC <sub>30/30</sub>	-38	3	-61	10	-18	26
CA-CMC <sub>0/30</sub>	-32	-19	-43	42	77	70

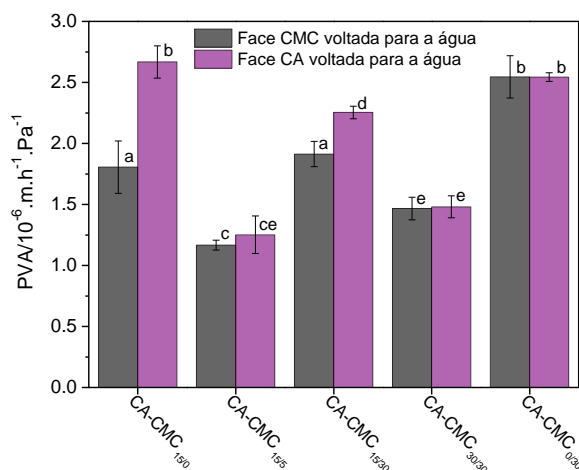
As bandas examinadas da CMC referem-se aos grupos funcionais hidroxilas (-OH,  $\nu = 3300 \text{ cm}^{-1}$ ), carboxilas (-COOH,  $\nu = 1740 \text{ cm}^{-1}$ ) e íons carboxilatos (-COO<sup>-</sup>,  $\nu = 1587 \text{ cm}^{-1}$ ) (Capanema et al., 2018). Sobre a caseína, as bandas investigadas foram as hidroxilas (-OH,  $\nu = 3278 \text{ cm}^{-1}$ ), amidas I (-C-NH<sub>2</sub>,  $\nu = 1636 \text{ cm}^{-1}$ ) e amidas II (-N-C=N,  $\nu = 1537 \text{ cm}^{-1}$ ) (Picchio et al., 2018). A variação das intensidades de transmitância ( $\Delta I \neq 0$ ) pode sugerir a ocorrência de reorganização. Assim como apontado por Chen et al., (2019), o processo de laminação da segunda camada provoca a transferência de umidade da solução filmogênica de caseína para a camada seca de CMC, o que estimula o aumento da mobilidade das cadeias poliméricas e o rearranjo estrutural na interface. Para os filmes contendo AT na

composição, foi observada a diminuição nas intensidades das bandas associadas aos grupos polares da face delaminada, o que ocorreu tanto para a CMC quanto para caseína.

As camadas de CMC apresentaram uma diminuição considerável nas intensidades das bandas referentes aos grupos -OH e -COO<sup>-</sup>. Tal comportamento não foi observado para o filme CA-CMC<sub>15/0</sub>, o que sugere que a aderência entre as camadas não é regida por interações eletrostáticas entre grupos polares. No que se refere às camadas de caseína, houve a diminuição das intensidades das bandas associadas a amina I e II, exceto para o filme CA-CMC<sub>0/30</sub>. Conforme discutido por Huang et al., (2023) e Guo et al., (2021), a associação entre proteína e AT, além das ligações covalentes, também pode ser estabilizada por interações hidrofóbicas entre os anéis aromáticos do polifenol e porções hidrofóbicas das proteínas. Também foram observadas alterações nas posições das bandas referentes ao estiramento das ligações -C-NH<sub>2</sub> (amina I) para menores comprimentos de onda (**FIGURA A1**), sugerindo a participação destes grupos nas interações interfaciais. Assim, a diminuição das intensidades de transmitância das bandas associadas a grupos/ligações polares nas faces delaminadas dos filmes pode indicar certa reorganização estrutural e possíveis quebras de ligações durante a delaminação. Tais observações sugerem que as faces delaminadas apresentaram uma maior disposição de grupos/ligações apolares. Vale lembrar que a caseína é uma proteína rica em resíduos de valina, leucina e fenilalanina, que possuem cadeias laterais apolares, o que justifica tais interações (Holt, 2016). Esta afirmação pode ser corroborada com o trabalho de Chen et al., (2019) que realizou uma simulação computacional para demonstrar as interações que ocorrem na interface de um filme de bicamada de amido e zeína. Os autores constataram a ocorrência de alterações na conformação, orientação e exposição de grupos funcionais na interface entre os biopolímeros. Jia et al., (2020) evidenciaram, pela técnica de dicroísmo circular, alterações significativas na conformação da caseína quando utilizado o AT para reticular a proteína com eugenol.

A propriedade de barreira dos filmes foi avaliada por medidas de PVA. O processo de permeação de umidade através dos filmes envolve três principais etapas. Inicialmente, ocorre a adsorção, onde as moléculas de água são adsorvidas na superfície do material; em seguida, há a difusão dessas moléculas pelo filme induzida pela diferença de pressão entre uma região de maior concentração para uma

de menor concentração de umidade. Posteriormente, as moléculas são desorvidas e liberadas para o ambiente (Otoni, 2024). Desta forma, supôs-se que, dependendo da face, caseína ou CMC, voltada para o interior das células contendo o ambiente saturado de umidade, pusesse afetar a permeabilidade dos sistemas. Medidas de PVA das bicamadas foram feitas comparando as diferentes composições para ambas as faces voltadas para o interior da célula, como apresentado na **FIGURA 6.12**.

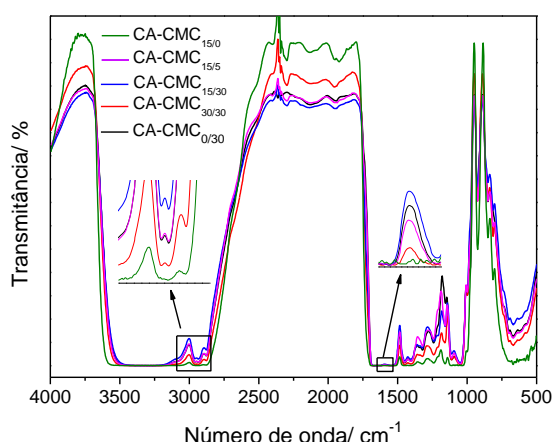


**FIGURA 6.12.** Permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes bicamadas para as diferentes composições entre caseína (CA) e carboximetilcelulose (CMC). Diferentes índices indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) no mesmo gráfico.

A etapa inicial de adsorção não mostrou ter contribuição no processo de permeação, já que apenas os filmes CA-CMC<sub>15/0</sub> e CA-CMC<sub>15/30</sub> apresentaram valores distintos de PVA entre as faces. Entretanto, a etapa difusional parece ter o maior efeito, uma vez que esta é ditada principalmente pela composição dos materiais. As medidas de PVA exibiram o mesmo perfil observado no intumescimento. Os filmes CA-CMC<sub>15/5</sub> mostraram que a introdução de AT desfavoreceu a difusão da água, segundo discussões prévias, já que tal composto promove a adesão entre as camadas de forma a reduzir os espaços livres para o acúmulo de umidade. Em contrapartida, o aumento da concentração de BTCA conferiu uma maior permeabilidade ao sistema, comportamento oposto ao esperado. A PVA dos filmes voltou a decrescer com o aumento do conteúdo de AT, demonstrado pelos filmes CA-CMC<sub>30/30</sub>. É interessante notar que os menores valores de permeabilidade são dados quando ambos os reticulantes estão presentes, visto que os filmes CA-CMC<sub>15/0</sub> e CA-CMC<sub>0/30</sub> tiveram baixa resistência à permeação de água. A baixa contribuição da etapa de adsorção é

evidenciada ao se verificar que os filmes que apresentaram baixa molhabilidade na camada de CMC não foram os mesmos que exibiram as menores permeabilidades.

Os espectros de FTIR medidos pela alocação dos filmes no caminho óptico do instrumento estão mostrados na **FIGURA 6.13**. Devido à presença de caseína e CMC na composição, os filmes apresentam perfis semelhantes, além da sobreposição das bandas características da proteína e do polissacarídeo. Não foi constatado o aparecimento de novas de bandas ou mesmo deslocamentos significativos com a introdução do BTCA ou AT, as quais podem ter sido suprimidas pelas bandas dos biopolímeros.



**FIGURA 6.13.** Espectros no infravermelho dos filmes bicamadas. Espectros normalizados pela soma das intensidades.

Jia et al., (2020) relataram o deslocamento da banda em  $1627\text{ cm}^{-1}$  devido à reticulação da caseína e do eugenol com AT, o que não foi visualizado no sistema aqui estudado. Mudanças de intensidade das bandas entre  $2960\text{-}2930\text{ cm}^{-1}$  e  $1650\text{-}1540\text{ cm}^{-1}$  (regiões destacadas) sugerem interações envolvendo os grupos -CH alifáticos e amidas da proteína, respectivamente (Capanema et al., 2018; Mozaffarzogh et al., 2020). Este comportamento também foi relatado por Muhoza et al., (2019), que observaram alterações nas bandas de vibração referentes às amidas I e II após reticulação de coacervados de gelatina e pectina com AT. Bandas situadas entre  $1500\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$  referem-se às vibrações dos grupos -CH<sub>3</sub>. Variações nos perfis das bandas na região entre  $1450\text{-}1403\text{ cm}^{-1}$  estão associadas às interações com os grupos -CH<sub>2</sub> adjacentes ao grupo carboxila. Bandas entre  $1100\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$  descreve o estiramento das ligações -OH atribuído aos álcoois primários e secundários (Mozaffarzogh et al., 2020). Com base na análise dos espectros de infravermelho, supõe-se que a interação entre caseína e CMC nos filmes secos é dado

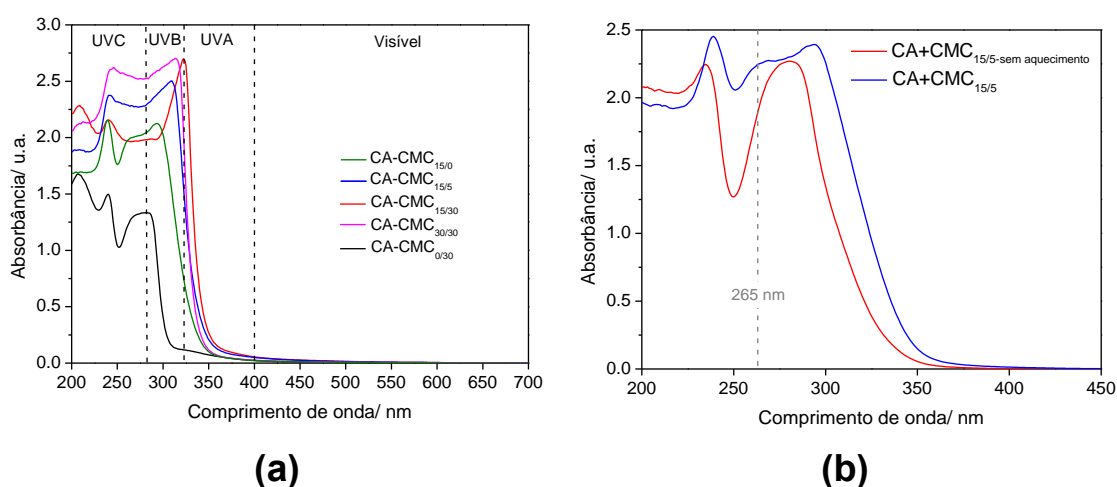
principalmente pela participação de grupos apolares da CMC e das amins da proteína.

Outro aspecto a se considerar é a possível ocorrência da reação de Maillard na interface. A reação de Maillard é estabelecida entre açúcares redutores e aminoácido quando aquecidos ( $\sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), levando à formação de intermediários melanoidinas, que acarretam a formação de ligações covalentes  $\text{N}=\text{C}$  entre o polissacarídeo e a proteína (Su et al., 2010). Tais ligações podem contribuir de forma sutil na reticulação interfacial entre a caseína e a CMC, auxiliando na adesão entre as camadas. Mohsin et al., (2020) estudaram a formação de melanoidinas produzidas pela reação de Maillard entre D-glicose e L-alanina. Os autores notaram mudanças na forma das bandas na região entre  $1700$  e  $1720\text{ cm}^{-1}$  atribuídas ao estiramento das ligações  $-\text{COO}^-$  ou  $-\text{C}=\text{O}$ , além de variações nas intensidades das bandas associadas a vibração das ligações  $\text{N}-\text{H}$  de amidas ( $1575\text{-}1590\text{ cm}^{-1}$ ),  $\text{C}-\text{H}$  dos grupos  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{CH}_3$  ( $1415\text{-}1460\text{ cm}^{-1}$ ) e  $\text{C}-\text{O}$  ( $1050\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ ). Considerando o sistema biestruturado em questão, tais reações deveriam ocorrer apenas na região interfacial estimulado durante a secagem do material; no entanto, as análises FTIR não apresentaram indícios da reação, provavelmente devido à baixa eficiência ou ausência de açúcares redutores oriundos da CMC. Segundo a literatura, bandas associadas à vibração das ligações  $\text{C}=\text{N}$  advindas da reação de Maillard deveriam ser observadas em  $1647\text{ cm}^{-1}$  (Su et al., 2010); no entanto, diversos autores mencionam que tais bandas são dificilmente observadas em espectros FTIR (Jia et al., 2020; Mohsin et al., 2020).

A **FIGURA 6.14a** mostra os espectros na região do UV-Vis para os filmes bicamadas. Os picos de absorção em  $209$ ,  $240$  e  $283\text{ nm}$  são atribuídos à matriz de caseína (Tian et al., 2019). Os filmes  $\text{CA-CMC}_{15/0}$  e  $\text{CA-CMC}_{0/30}$ , os quais continham apenas um dos reticulantes, apresentaram absorbância na região entre  $200\text{-}300\text{ nm}$ . A combinação do BTCA e do AT, no entanto, provocou mudanças na forma e intensidade dos picos de absorção, além de induzir um efeito batocrômico deslocando os picos em  $240\text{ nm}$  e  $283\text{ nm}$  para comprimentos de ondas maiores. Desta forma, os filmes contendo ambos os aditivos ampliaram a faixa de absorção para a região do UVB ( $280\text{-}315\text{ nm}$ ), implicando em uma maior proteção contra a radiação ultravioleta, propriedade requerida na prevenção de processo oxidativos em alimentos (Silva et al., 2024).

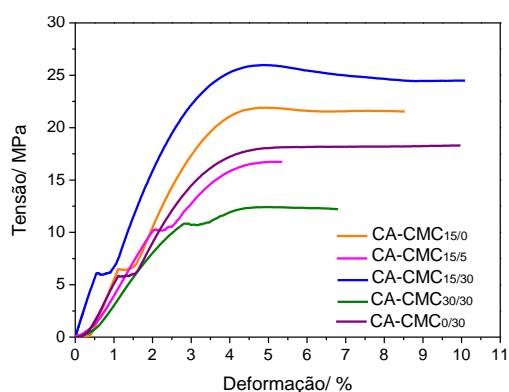
Com o intuito de observar alguma evidência da reação de Maillard citada anteriormente, compararam-se os espectros UV-VIS (**FIGURA 6.14b**) de dois filmes

CA-CMC<sub>15/5</sub>, sendo que um deles teve a segunda camada seca à temperatura ambiente (CA-CMC<sub>15/5</sub>-sem aquecimento) e o outro (CA-CMC<sub>15/5</sub>) seco nas condições estipuladas no sistema de *casting* contínuo (70 °C). O filme CA-CMC<sub>15/5</sub> apresentou sobreposição de picos em 265 nm, os quais foram ausentes no espectro do filme CA-CMC<sub>15/5</sub>-sem aquecimento. Mohsin et al., (2020) relataram a absorção de melanoidinas na mesma região, entre 240-300 nm, após a reação entre D-glicose e L-alanina. Não foi possível certificar a ocorrência da reação de Maillard na interface dos filmes biestruturados; entretanto, segundo as condições de processamento, é possível que haja certa contribuição deste fenômeno.



**FIGURA 6.14.** Espectros de absorção de luz na região do ultravioleta e visível dos filmes bicamadas.

As curvas tensão-deformação dos filmes de bicamada estão apresentadas na **FIGURA 6.15a**. Vale mencionar que durante os ensaios de tração, observou-se que a camada de caseína era rompida antes da camada de CMC, como apresentado na **FIGURA 6.15b**. Este comportamento mostra que as camadas proteicas possuem resistência mecânica inferior à da CMC, suportando a atuação da camada suporte de CMC para o sistema multiestruturado. Portanto, o desempenho mecânico dos materiais é predominantemente associado à camada de CMC.

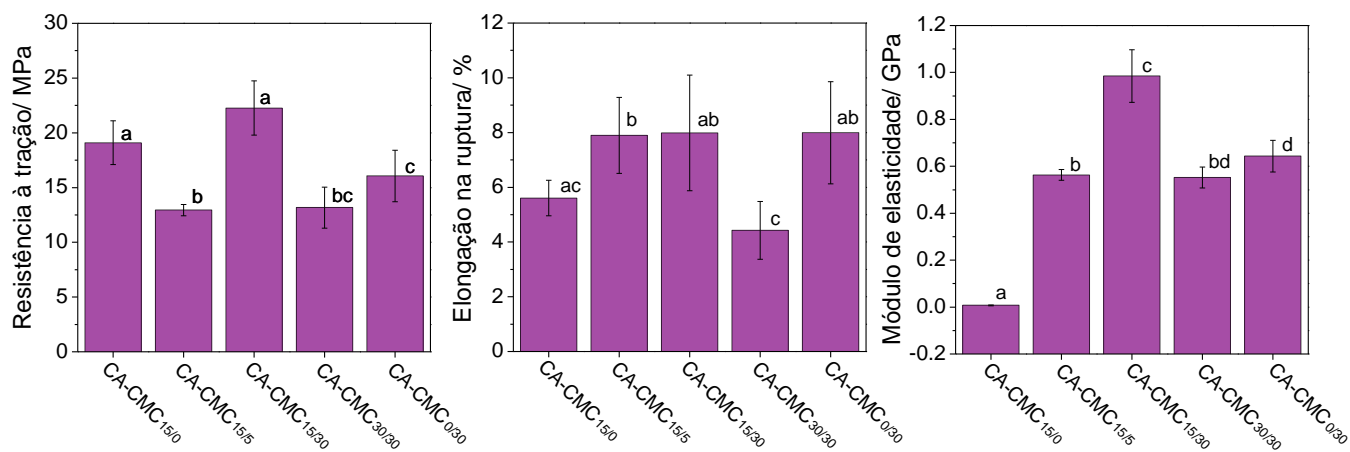


(a)

(b)

**FIGURA 6.15.** (a) Curvas tensão-deformação representativas dos filmes bicamadas e (b) imagem da quebra antecipada da camada de caseína observada durante os testes mecânicos de tração uniaxial.

Os atributos mecânicos (**FIGURA 6.16**) exibiram uma correlação entre a composição dos sistemas e o as propriedades mecânicas. Observa-se que a incorporação e o aumento da concentração de AT nos filmes CA-CMC<sub>15/30</sub> e CA-CMC<sub>0/30</sub> provocaram a diminuição da resistência mecânica.



**FIGURA 6.16.** Atributos mecânicos – resistência à tração ( $\sigma$ ), elongação na ruptura ( $\epsilon$ ) e módulo de elasticidade ( $E$ ) – dos filmes bicamadas. Diferentes índices indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) no mesmo gráfico.

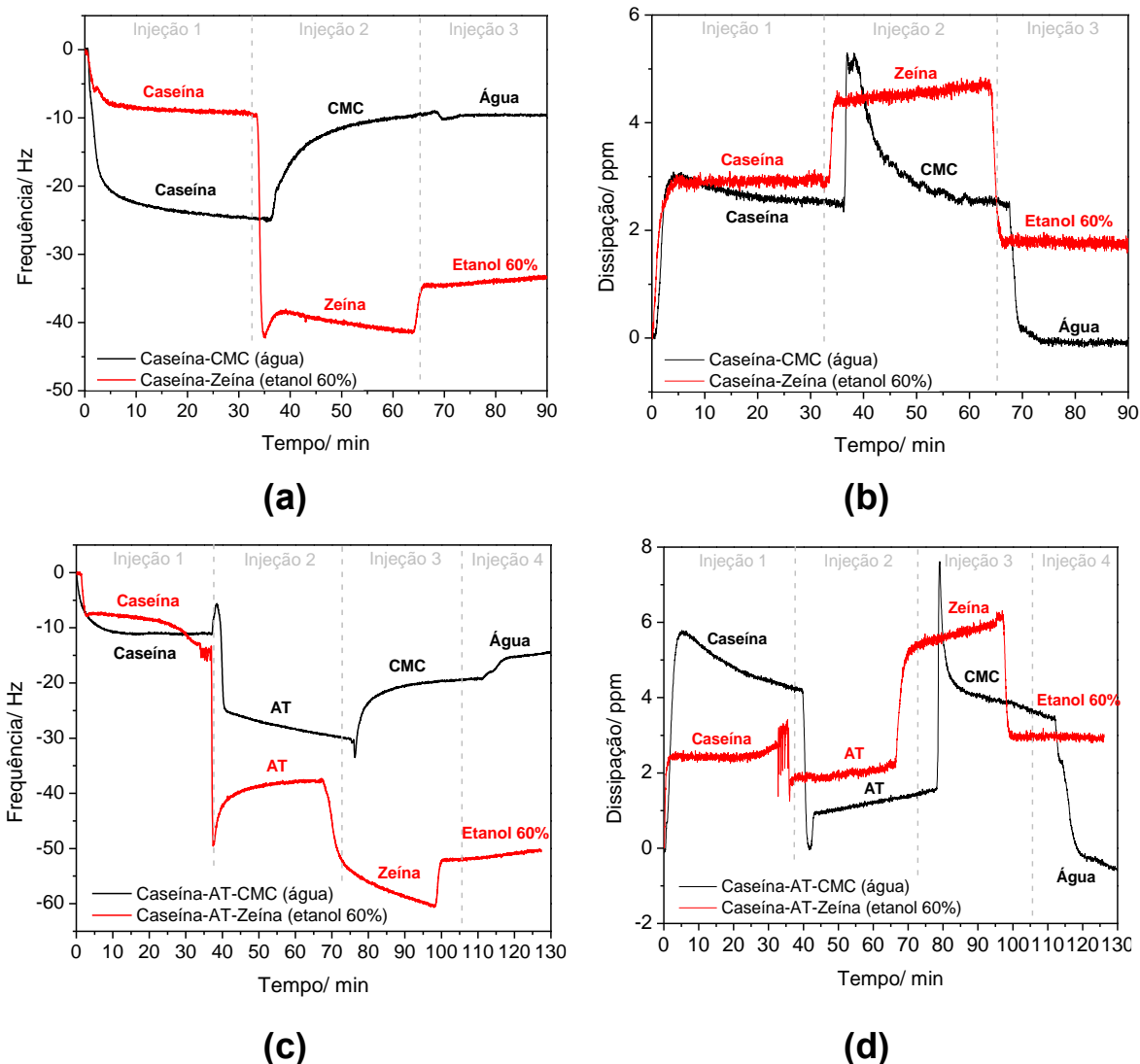
Os mesmos comportamentos foram observados por Missio et al., (2020), os quais discutem que a alocação do AT entre as cadeias poliméricas induz um efeito estérico que acarreta uma maior mobilidade entre as cadeias devido ao enfraquecimento das interações intermoleculares. Vale ressaltar que o AT é um reticulante proteico e, dessa forma, o polifenol interage com a CMC principalmente por interações secundárias não acarretando da reticulação da matriz.

Os filmes CA-CMC<sub>15/30</sub> tiveram um maior desempenho mecânico associado à maior concentração de BTCA, indicando a formação de uma matriz mais coesa e rígida causada pelo maior grau de reticulação (Alavarse et al., 2022). Os filmes CA-CMC<sub>30/30</sub> exibiram um decaimento da resistência à tração, alongação na ruptura e módulo de elasticidade, o que pode estar associado ao balanço entre o efeito estérico causado pelo AT e o aumento do grau de reticulação promovido pelo BTCA. Vale ressaltar que este sistema se mostrou favorável à adsorção de água, como já demonstrado pelas análises de ângulo de contato, a qual contribui para plastificação da matriz polimérica (Eliasson et al., 2023).

As análises discutidas nesta seção mostraram que a combinação de BTCA e AT afetou diretamente as propriedades finais do material biestruturado, principalmente no que diz respeito à interação com a água. Para as próximas etapas, escolheu-se trabalhar com as formulações CA-CMC<sub>15/5</sub> e CA-CMC<sub>15/30</sub>, pois apresentaram desempenhos mecânicos e resistência à umidade satisfatórios. Além disso, essas formulações mostraram um melhor equilíbrio entre os efeitos provocados por ambos os reticulantes. Adicionalmente, essas formulações demonstraram uma melhor manuseabilidade, o que também contribuiu para sua escolha.

### **6.1.5. Estudo da compatibilidade entre os biopolímeros por QCM-D**

A afinidade dos biopolímeros que compõem as interfaces CMC-caseína e caseína-zeína e o efeito do AT no aumento de tal interação foi avaliado por meio de experimentos conduzidos em QCM-D, conforme mostrado na **FIGURA 6.17**.



**FIGURA 6.17.** Análises em QCM-D referentes a deposições subsequentes de soluções poliméricas sobre um sensor recoberto com sílica. As curvas representam (a e c) as variações das frequências do terceiro harmônico e (b e d) os dados de dissipação em função do tempo. Os experimentos associados às curvas pretas foram realizados em água, e as curvas vermelhas foram realizadas em etanol 60%.

A QCM-D é uma técnica gravimétrica que detecta variações sutis de massa adsorvida ou dessorvida ( $\sim 1 \text{ ng.cm}^{-2}$ ) sobre a superfície de um sensor piezoelétrico. Além disso, há o monitoramento simultâneo da variação da frequência de oscilação e da energia dissipada do sensor. Alterações na frequência podem ser correlacionadas com a quantidade de massa depositada/removida, enquanto a dissipação de energia fornece informações sobre as propriedades viscoelásticas do recobrimento (Chen et al., 2016). Para a deposição de camadas poliméricas, é

esperado que a frequência de oscilação do sensor diminua e a dissipação de energia aumente, já que os polímeros geralmente formam uma estrutura não compacta e altamente hidratada (Raudino et al., 2017).

É importante ressaltar que a caseína e o CMC são solúveis em água, mas a zeína é solúvel em etanol, portanto foi necessário utilizar solventes diferentes para cada sistema. Os filmes finos poliméricos formados sobre o sensor apresentam características viscoelásticas, portanto, não é possível aplicar o modelo de Sauerbrey para a determinação da massa depositada, o qual é viável apenas para filmes rígidos (Chen et al., 2016). Desta forma, a massa depositada e a afinidade entre os materiais foram avaliadas de acordo com a magnitude da variação da frequência e da dissipação, o que contribui para minimizar o efeito da natureza do solvente. A caseína apresentou maior afinidade pela zeína ( $\Delta f \sim 32$  Hz) do que pela CMC ( $\Delta f \sim 14$  Hz) (**FIGURA 6.17a-b**), o que pode ser atribuído à maior disponibilidade de grupos funcionais na estrutura proteica e sua energia superficial (Chandrasekaran et al., 2013). A interação entre caseína e zeína foi considerada estável, uma vez que a etapa de enxágue resultou em um aumento relativamente pequeno da frequência ( $\Delta f \sim 7$  Hz). O aumento da magnitude da dissipação referente à injeção da zeína ( $\Delta D \sim 1,2$  ppm) indica o aumento da viscoelasticidade do sistema, sugerindo a deposição de polímero sobre a camada de caseína. No entanto, a injeção de solução de CMC promoveu a desestabilização do sistema, pois o aumento da frequência próximo à frequência inicial indica a remoção da camada de caseína previamente depositada. Além disso, a diminuição da dissipação na etapa de injeção 2 ( $\Delta D \sim 3$  ppm) sugere a formação de uma camada mais rígida sobre o sensor devido à remoção do material previamente depositado.

O efeito do AT (**FIGURA 6.17b-c**) foi pela injeção do reticulante entre os fluxos das soluções poliméricas. A adsorção do AT na caseína foi influenciada pelo solvente, apresentando uma maior deposição quando em meio etanólico. Esse comportamento pode ser associado com a substituição das moléculas de água pelas de etanol, que altera a massa e o volume hidrodinâmico das cadeias poliméricas e, conseqüentemente, suas características viscoelásticas (Tan et al., 2020). Também foi observado o decaimento da dissipação o que sugere que o AT aumenta a rigidez do sistema ao ser adsorvido sobre a caseína, possivelmente devido à reticulação entre as cadeias proteicas ou formação de interações secundárias (Leite et al., 2021).

Para a interação caseína/zeína, a presença do AT favoreceu a deposição de zeína ( $\Delta f \sim 50$  Hz), causada pela promoção de reticulação e/ou interações secundárias entre as proteínas. O aumento na dissipação ( $\Delta D \sim 3$  ppm) indicou a formação de uma camada viscoelástica, típica de polímeros. A interação não foi reversível, como observado pela baixa variação na frequência durante a etapa de enxágue. No sistema caseína/CMC, a injeção da solução polissacarídica causou um aumento na frequência ( $\Delta f \sim 9$  Hz) e uma diminuição na dissipação ( $\Delta D \sim 1$  ppm); no entanto, a diferença foi menor que o experimento sem a injeção do AT. As observações corroboram o trabalho de Leite et al., (2021), no qual a adsorção do AT sobre uma camada de gelatina favoreceu a afinidade com os nanocristais de celulose. Os autores atribuíram tal comportamento à promoção de interações físicas e à reticulação química. Outros estudos na literatura indicam que o uso de AT aumenta o número de pontos de ancoragem, visto que o polifenol é rico em hidroxilas, o que também contribui para a interação dos polímeros (Xu et al., 2019).

#### **6.1.6. Cálculo das energias livre de superfície (ELS) e dos trabalhos de adesão pelo modelo teórico de vOCG**

Como já mencionado, as interações secundárias também colaboram para as interações interfaciais e, conseqüentemente, para a adesão entre os biopolímeros. A contribuição de tais forças podem ser estimadas por meio de modelos teóricos, como a abordagem vOCG, que determina a energia livre superficial e o trabalho de adesão entre duas superfícies a partir de medidas experimentais de ângulo de contato. Nesta seção, foi avaliado a influência das diferentes proporções de AT e BTCA na energia de superfície do filme de CMC e como tais composições modulam o trabalho de adesão entre os biopolímeros. É importante ressaltar que o modelo prevê apenas a atuação das forças eletrostáticas e apolares, desconsiderando o efeito da reticulação interfacial entre CMC e caseína promovida pelo polifenol. Também foram estudados as interações secundárias entre caseína e zeína.

A ELS ou tensão superficial ( $\gamma_s$ ) é definida como o trabalho necessário para aumentar a superfície em uma unidade de área. Este é um importante parâmetro que permite prever fenômenos de superfície como molhabilidade, adsorção e adesão, os quais são influenciados pela composição química e sua coesão entre as

moléculas das superfícies (Velásquez et al., 2011). O modelo teórico vOCG descreve a ELS de um sólido como uma somatória das contribuições das forças de van der Waals (componente Liftshitz-van der Waals,  $\gamma_S^{LW}$ ) e as forças eletrostáticas ácido-base de Lewis (componente ácido-base de Lewis,  $\gamma_S^{AB}$ ). A componente  $\gamma_S^{AB}$  pode ser subdividida em uma componente básica ( $\gamma_S^-$ ), associado a capacidade de doação de elétrons, e a ácida ( $\gamma_S^+$ ), referente a capacidade de recepção de elétrons (el Omari et al., 2019). Para sólidos de baixa energia superficial, como a maioria dos polímeros, a ELS pode ser estimada a partir de medidas de ângulo de contato, já que este parâmetro não pode ser determinado diretamente (Velásquez et al., 2011). A combinação da teoria vOCG com o modelo LWAB permite o cálculo do trabalho de adesão ( $W_a$ ) entre duas superfícies sólidas (Velásquez et al., 2011). Desta forma, as ELS e o  $W_a$  teóricos foram determinados com o intuito de investigar a contribuição das forças secundárias nos fenômenos de superfície, assim como, a influência da composição do sistema.

Os valores do ângulo de contato para os três solventes estão apresentados na **TABELA 6.5**.

**TABELA 6.5.** Valores dos ângulos de contato dos filmes monocamadas de caseína (CA), carboximetilcelulose (CMC) e zeína (ZN) nas diferentes composições em relação aos solventes água, glicerol e tolueno. Os valores correspondem a 30 s de análise.

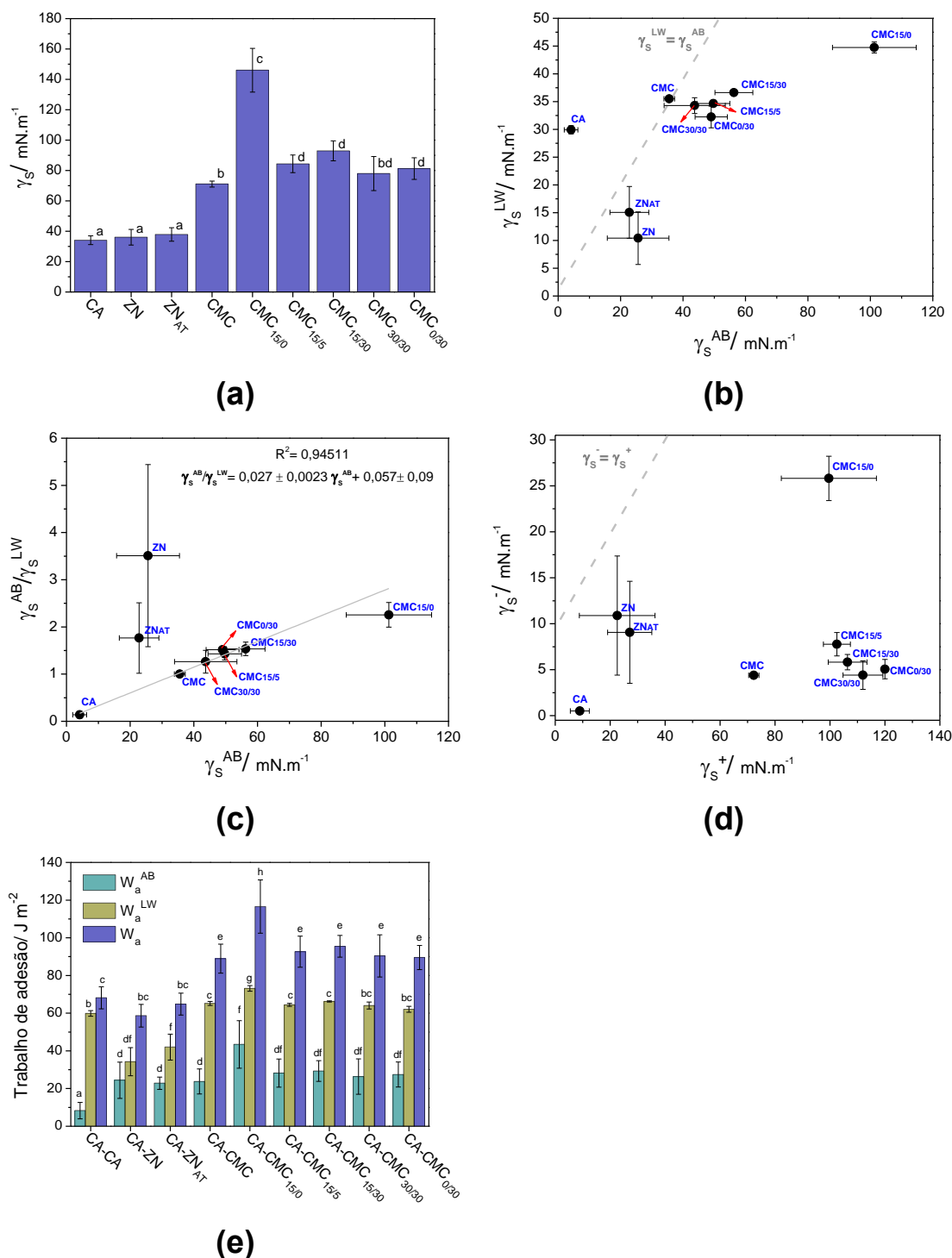
	$\theta_{\text{água}}$	$\theta_{\text{glicerol}}$	$\theta_{\text{tolueno}}$
Caseína (CA)	81 ± 4	69 ± 5	10 ± 2
Zeína (ZN)	63 ± 6	58 ± 8	60 ± 8
Zeína+15%AT (ZN <sub>AT</sub> )	61 ± 10	54 ± 15	37 ± 7
CMC	47 ± 2	83 ± 3	3 ± 1
CMC <sub>15/0</sub>	64 ± 7	112 ± 1	15 ± 4
CMC <sub>15/5</sub>	23 ± 5	76 ± 2	17 ± 1
CMC <sub>15/30</sub>	16 ± 1	74 ± 2	15 ± 3
CMC <sub>30/30</sub>	18 ± 3	73 ± 4	13 ± 1
CMC <sub>0/30</sub>	23 ± 3	73 ± 3	20 ± 2

AT: ácido tânico

Em geral, os ângulos apresentaram uma ordem de comportamento  $\theta_{\text{glicerol}} < \theta_{\text{água}} < \theta_{\text{tolueno}}$ , demonstrando que os filmes tiveram maior afinidade por líquidos polares. A diferença considerável entre os valores do ângulo de contato para os diferentes solventes ( $\sim 40^\circ$ ) constitui uma boa base para cálculos de ELS (Della Volpe et al., 2004). As relações entre as componentes  $\gamma_S^{LW}$ ,  $\gamma_S^{AB}$ ,  $\gamma_S^+$  e  $\gamma_S^-$  e o  $W_a$  entre as interfaces caseína-CMC e caseína-zeína (**TABELA B1**) são mostrados na **FIGURA 6.18**.

Os sistemas estudados (**FIGURA 6.18a**), exceto CMC<sub>15/0</sub>, exibiram baixa energia superficial ( $\gamma_S < 100 \text{ mN.m}^{-1}$ ) (van Oss, 2006). As  $\gamma_S$  dos filmes proteicos foram em torno de  $37 \text{ mN.m}^{-1}$ , e para o caso da zeína, não houve influência da natureza e da presença do AT. Os filmes de CMC demonstraram as maiores energias de superfícies, as quais aparentemente são moduladas pela concentração de BTCA e AT, uma vez que a introdução do BTCA (CMC<sub>15/0</sub>) aumentou a energia de  $70 \text{ mN.m}^{-1}$  para  $145 \text{ mN.m}^{-1}$ , enquanto a introdução do AT reduziu a energia do sistema para em torno de  $83 \text{ mN.m}^{-1}$ , não apresentando variação em relação ao teor do polifenol. Supõe-se que as  $\gamma_S$  são o resultado da combinação dos efeitos de ambos os aditivos, visto que a reticulação aumenta a coesão e modifica as características das superfícies dos filmes (Guo et al., 2022).

A contribuição das interações polares e apolares foram avaliadas pelo gráfico de  $\gamma_S^{LW}$  em função de  $\gamma_S^{AB}$  (**FIGURA 6.18b**). Para os sistemas proteicos, a caseína exibiu uma maior contribuição das interações polares, quanto a zeína mostrou um maior equilíbrio entre as formas, os quais tenderam ligeiramente para as interações polares, não apresentando efeito do AT. Tal observação pode ser relacionada com as forças de van der Waals e empilhamento  $\pi$ - $\pi$  que ocorrem quando há maior exposição de grupos apolares como consequência da conformação proteica em determinados ambientes (Guo et al., 2022). Os filmes de CMC apresentaram uma magnitude superior dos valores de ambas as componentes e observou-se que a incorporação dos reticulantes estimulou as forças eletrostáticas do sistema. Isso porque a introdução de compostos ricos em grupos polares tende a promover uma maior coesão da matriz polimérica por meio de ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e dipolo-dipolo (Shen et al., 2015). Este comportamento foi mais pronunciado para os filmes CMC<sub>15/0</sub>, já que os demais tiveram variações mais sutis de comportamento.



**FIGURA 6.18.** (a) Valores da tensão superficial total ( $\gamma_s$ ) para as diferentes composições dos filmes, (b) componentes Lifshitz-van der Waals ( $\gamma_{sV}^{LW}$ ) plotado em função das componentes ácido-base de Lewis ( $\gamma_{sV}^{AB}$ ), (c) razão entre as componentes polares e apolares ( $\gamma_{sV}^{AB}/\gamma_{sV}^{LW}$ ) versus as componentes polares ( $\gamma_{sV}^{AB}$ ), (d) componente base de Lewis ( $\gamma_s^-$ ) plotado em função da componente ácido de Lewis ( $\gamma_s^+$ ) e (e) valores calculados do trabalho total de adesão ( $W_a$ ) e de suas componentes apolares ( $W_a^{LW}$ ) e polares ( $W_a^{AB}$ ) para os filmes de bicamada (d). As linhas pontilhadas representam a curva onde os valores das componentes são iguais ( $\gamma_x = \gamma_y$ ).

De forma geral, os filmes apresentaram um certo equilíbrio entre as componentes polares e apolares, já que a distribuição dos valores ficou relativamente próxima da reta de equilíbrio ( $\gamma_S^{LW} = \gamma_S^{AB}$ ). Apesar da aparente desconexão entre as duas componentes, a curva  $\gamma_S^{AB}/\gamma_S^{LW}$  em função de  $\gamma_S^{AB}$  (**FIGURA 6.18c**) apresenta uma relação de dependência linear descrito pela mostrada a seguir.

$$\gamma_{SV}^{AB}/\gamma_{SV}^{LW} = 0,027 \pm 0.0023 \gamma_{SV}^{AB} + 0,057 \pm 0.09$$

A equação permite obter uma aproximação de ambos os parâmetros medindo apenas um componente, ou seja, é possível obter valores de  $\gamma_S^{AB}$  e  $\gamma_S^{LW}$  utilizando medidas de ângulo de contato de apenas um solvente.

As relações entre  $\gamma_S^+$  e  $\gamma_S^-$  (**FIGURA 6.18d**) fornecem informações sobre a acidez e basicidade das superfícies e sua capacidade de interagir eletrostaticamente. Todos os filmes mostraram uma maior influência da componente ácida ( $\gamma_S^+ > \gamma_S^-$ ) devido à alta disponibilidade de grupos que podem ser protonados, como as hidroxilas e carboxilas, presentes nas cadeias poliméricas (Vogl et al., 2014). Os filmes de proteínas exibiram um caráter próximo à neutralidade, referente às extremidades amina e carboxila que podem ser protonados/desprotonados em função do pH do meio (Blanco et al., 2022). Diferenças nos valores, em magnitude, entre as componentes ácida e básica dos filmes de caseína e CMC indicam a ocorrência de interações eletrostáticas atrativas na interface, o que auxilia a adesão entre as camadas de biopolímero. É interessante notar que a incorporação de AT na camada de CMC induz um maior caráter básico devido à elevada quantidade de grupos hidroxila desprotonáveis (Picchio et al., 2018).

A estimativa do  $W_a$ , e suas componentes  $W_a^{LW}$  e  $W_a^{AB}$  (**TABELA B2**), representa a capacidade das superfícies de interagirem entre si por meio de interações eletrostáticas, apolares e de ligações de hidrogênio (da Silva et al., 2020). Os valores calculados de  $W_a$  (**FIGURA 6.18d**) mostraram que a interação entre caseína e CMC é governada por interações apolares ( $W_a^{LW} > W_a^{AB}$ ) que podem ser explicadas pela baixa exposição de grupos polares na interface da camada de caseína. As cadeias de caseína são organizadas na forma de micelas dinâmicas, e a exposição de grupos polares/apolares é determinada pelas condições em que as mesmas se encontram (Tian et al., 2019). Observa-se que a presença de AT na camada de CMC desfavoreceu o trabalho de adesão. O filme sistema CA/CMC<sub>15/0</sub>

teve o maior valor de  $W_a$  sugerindo que a adesão entre as camadas é impulsionada por forças eletrostáticas, já que o CMC<sub>15/0</sub> possui a maior contribuição eletrostática em sua ELS. Porém, o conjunto CA/CMC<sub>15/0</sub> é facilmente delaminado durante o manuseio, enquanto os filmes contendo AT incorporados à CMC requerem mais esforço para separação das camadas. Assim como relatado por Velásquez et al., (2011), os cálculos partem de medidas de ângulo de contato, os quais são facilmente influenciados pela morfologia e porosidade da superfície da amostra, pela evaporação do solvente durante as medidas e pelo estado metaestável do formato da gota examinada.

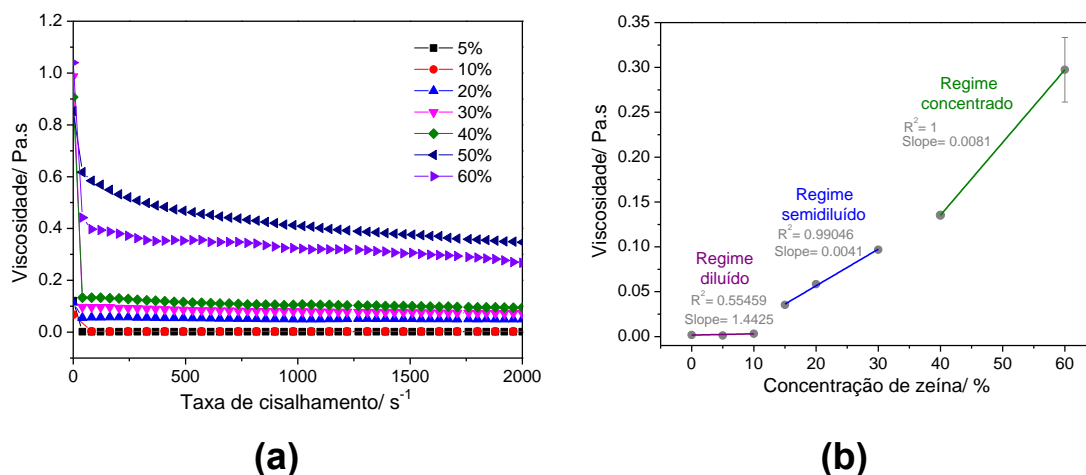
## **6.2. Produção da camada de zeína (ZN) por deposição por sopro em solução (DSS)**

Esta seção teve como foco a otimização e a produção da terceira camada de zeína. Inicialmente foi realizado um estudo a fim de determinar as melhores condições de composição e parâmetros para a deposição do recobrimento proteica. Posteriormente, foi realizado a aspersão da camada de zeína sobre os filmes CA-CMC<sub>15/5</sub> e CA-CMC<sub>15/30</sub>, os quais foram selecionados como as melhores opções para esta etapa, como já salientado no final da **seção 6.1.4**.

### **6.2.1. Otimização das condições de obtenção da camada de ZN por DSS**

A camada de zeína foi produzida por DSS (**FIGURA 5.1**), no qual os filmes sobre o qual a proteína seria depositada foram alocados sobre o coletor. O sistema utilizado tem como força motriz o arraste das cadeias poliméricas, em solução, em direção ao coletor, fenômeno influenciado diretamente pela viscosidade dos sistemas, por sua vez fortemente afetado pela concentração da solução (Medeiros et al., 2009).

O comportamento das soluções de zeína em diferentes concentrações – 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60% (m/v) – foi investigado por medidas viscosimétricas, as quais estão apresentados na **FIGURA 6.19**.



**FIGURA 6.19.** (a) Curvas da viscosidade em função da taxa de cisalhamento para soluções de zeína em diferentes concentrações e os respectivos (b) regimes de comportamento de viscosidade das soluções quando submetidas a uma taxa de cisalhamento de  $200 \text{ s}^{-1}$  a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A viscosidade em função da taxa de cisalhamento (**FIGURA 6.19a**) das soluções nas concentrações entre 5 e 40% exibiram valores entre 0,01 e 0,11 Pa.s, os quais foram próximos à viscosidade do solvente puro. A elevação das concentrações para 50 e 60% provocaram um aumento considerável das viscosidades dos sistemas, elevando para em torno de 0,4 Pa.s. Observou-se que para uma taxa de cisalhamento acima de  $30 \text{ s}^{-1}$ , as soluções poliméricas apresentaram um comportamento próximo do Newtoniano, ou seja, alterações da viscosidade são praticamente desprezíveis (Canevaloro, 2006). Desta forma, as medidas de viscosidade foram realizadas a uma taxa de cisalhamento de  $200 \text{ s}^{-1}$  para a determinação do efeito de diluição em função das concentrações de zeína (**FIGURA 6.19b**). Foram identificados três regimes comportamentais associados às concentrações poliméricas. No regime diluído, entre 0 e 10%, considera-se que as interações intermoleculares são fracas e o emaranhamento entre as cadeias é desprezível, exibindo uma viscosidade consideravelmente baixa. O regime semidiluído foi estabelecido para as concentrações entre 15 e 30%, onde as interações entre as cadeias são significativas. Segundo Oliveira et al., (2011), a partir deste regime, o sistema polimérico apresenta baixa tensão superficial e alta evaporação do solvente que possibilita a formação de aglomerados denominados *beads*. A deposição da camada de zeína na forma de aspensão foi alcançada utilizando uma solução de 20%, a qual se encontra no regime em questão. Para concentrações entre 40% e 60%, o regime concentrado foi atingido, caracterizado pelo

alto grau de interações intermoleculares e a formação de uma rede interconectada entre as cadeias poliméricas. Tais fatores permitem a obtenção de fibras, como demonstrado por Oliveira et al., (2013).

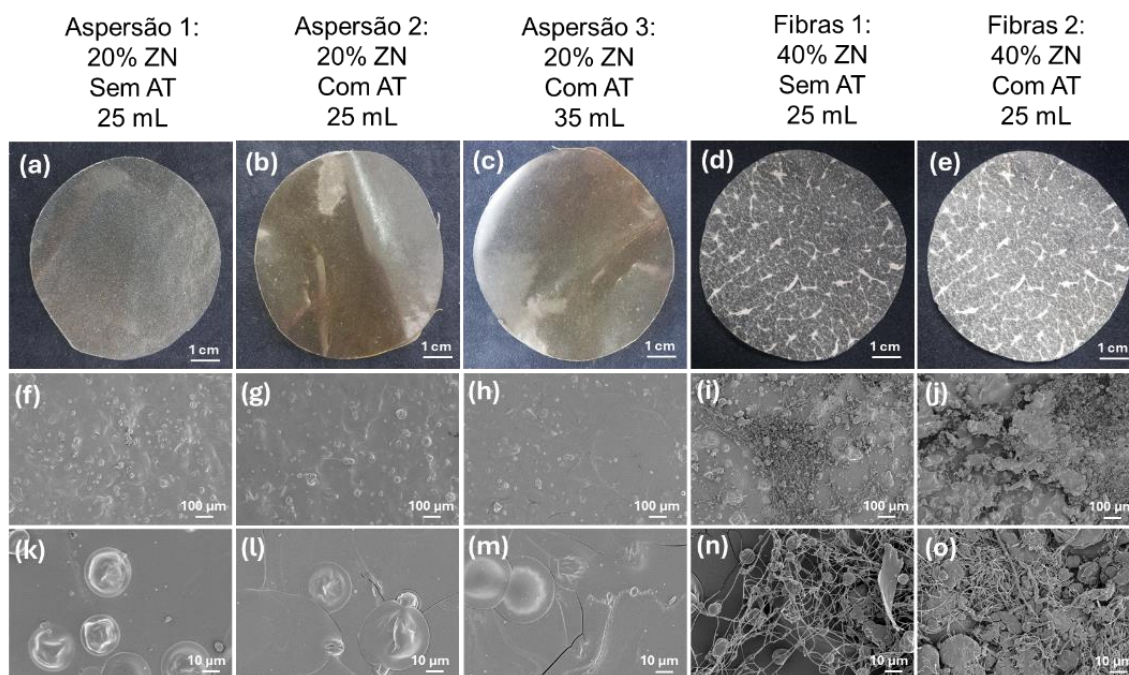
A taxa de cisalhamento que o DSS exerce sobre as soluções poliméricas foi estimada pela equação aplicada em reologia capilar, visto que o a região da ponta da agulha apresenta um fluxo análogo a um reômetro capilar. O cálculo é apresentado a seguir.

$$\dot{\gamma}_w = \frac{4 T_{alim.}}{\pi R_c^3} = \frac{4 \cdot (0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1})}{\pi (0,2 \text{ mm})^3} \times \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ s}} \times \frac{10^{-6} \text{ m}^3}{1 \text{ mL}} = 1600 \text{ s}^{-1}$$

O valor obtido foi de  $1600 \text{ s}^{-1}$ , o qual se encontra dentro da região do perfil Newtoniano das soluções (**FIGURA 6.19a**), de forma que a correlação entre os regimes de viscosidade e as concentrações poliméricas sejam válidas para esta taxa de cisalhamento.

Testes iniciais referentes à formulação da terceira camada foram feitos a partir de soluções ácidas contendo 20 e 40% de zeína, além do uso do AT (15% em relação à massa do polímero) na composição do sistema. Assim como já discutido, as soluções proteicas de 20% encontram-se no regime semidiluído, enquanto as de 40%, estão em regime concentrado. A mudança de regime corrobora as características do material depositado na forma de aglomerados ou fibras. Os parâmetros do DSS como pressão do ar, distância bocal-coletor, taxa de alimentação e rotação do coletor foram baseados em trabalhos prévios do grupo (Piccinin et al., 2024).

A **FIGURA 6.20** mostra as imagens e as respectivas microscopias dos testes iniciais da deposição da zeína sobre uma monocamada de caseína. Os filmes sobre os quais a camada de zeína foi aspergida (Aspersão 1, 2 e 3) (**FIGURA 6.20a-c**) apresentaram uma coloração amarelada e o recobrimento foi macroscopicamente homogêneo. As microscopias (**FIGURA 6.20f-h e k-m**) mostraram que a zeína foi depositada na forma de aglomerados e foi observado a presença de trincas na camada de caseína. O aparecimento de defeitos pode estar relacionado com o uso do ácido acético, solvente utilizado, o qual provoca na desestabilização das micelas de caseína devido ao pH ácido, assim como já observado nas análises de potencial Zeta em função do pH. Foi realizado um teste rápido com o intuito de investigar possíveis mudanças nas características da camada de caseína.



**FIGURA 6.20.** (a-e) Imagens de filmes monocamadas de caseína depositadas com aspersão ou fibras de zeína (ZN), com ou sem a incorporação de ácido tânico (AT), e (f-o) imagens MEV das superfícies dos filmes. A descrição acima remete a concentração da solução de zeína, a presença do ácido tânico na formulação e o volume de solução depositada sobre um filme monocamada de caseína com dimensões de 13 cm x 22 cm.

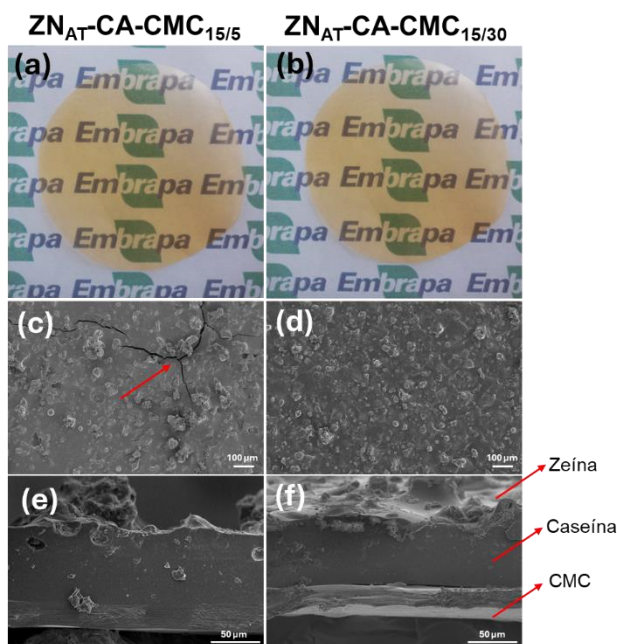
Ácido acético foi borrifado sobre filmes de caseína e, após a secagem, o procedimento foi repetido por mais duas vezes. Os valores de ângulo de contato foram  $45 \pm 2^\circ$ ,  $37 \pm 4^\circ$  e  $31 \pm 7^\circ$  para os filmes que tiveram o solvente borrifado uma, duas e três vezes, respectivamente. Comparando com o valor do ângulo do filme de caseína ( $81 \pm 4^\circ$ ), infere-se que o ácido acético favoreceu a molhabilidade da superfície proteica devido à desorganização das micelas, o que pode ter provocado a exposição de grupos hidrofílicos, além da promoção de trincas pela qual a água é infiltrada na matriz. Visualmente, a presença do AT e a deposição de uma maior quantidade de zeína (**FIGURA 6.20c, h e m**) não afetaram a dispersão dos aglomerados sobre a superfície do filme. Os valores de ângulo de contato para 30 s de análise foram  $44 \pm 7^\circ$ ,  $40 \pm 5^\circ$  e  $47 \pm 3^\circ$  para as aspersões 1, 2 e 3, respectivamente. Não foram constatadas variações significativas em relação à molhabilidade da cobertura contendo ou não AT. No entanto, foi observado que para as coberturas sem o polifenol, as superfícies absorveram mais rapidamente a água e apresentaram mudança de coloração, enquanto as contendo AT ficaram intactas durante o ensaio e não mostram sinais de umedecimento.

As monocamadas que tiveram a deposição de fibras (fibras 1 e 2) (**FIGURA 6.20d-e**) exibiram um recobrimento não uniforme, além das fibras serem facilmente removidas com o manuseio do material. As microscopias (**FIGURA 6.20i,j,n,o**) constataram a obtenção de fibras com aglomerados micrométricos. Assim como as aspersões, a presença do AT não alterou a aparência do material final. Considerando que o objetivo da camada de zeína é a promoção do aumento da resistência à umidade do material multiestruturado, pressupõe-se que a deposição da proteína na forma de fibras não seja compatível com a proposta inicial. Portanto, foi designado que a terceira camada fosse produzida pela aspersão de 25 mL de uma solução de zeína (20% m/m), contendo 15% (m/m) de AT, sobre os filmes bicamada com dimensões 13 cm x 22 cm que remete um recobrimento de  $0,02 \text{ g.cm}^{-2}$ .

### 6.2.2. Caracterização dos filmes multicamadas (ZN-CA-CMC)

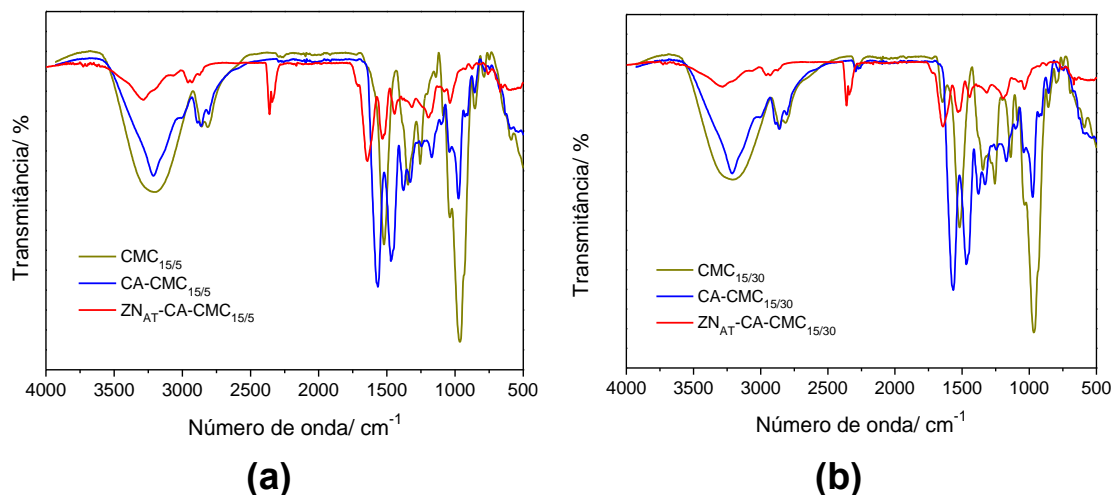
A terceira camada do sistema multiestruturado foi produzida pela aspersão de uma solução de zeína sobre os filmes bicamadas CA-CMC<sub>15/5</sub> e CA-CMC<sub>15/30</sub>. Os filmes multicamadas foram denominados como ZN<sub>AT</sub>-CA-CMC<sub>15/5</sub> e ZN<sub>AT</sub>-CA-CMC<sub>15/30</sub>, sendo que o subscrito AT junto ao ZN indica a presença do polifenol na composição da camada. As espessuras dos filmes multicamadas variaram entre 0,12 e 0,2 mm.

Os filmes multicamadas obtidos apresentaram-se autossuportáveis, contínuos e com uma cobertura homogênea de zeína (**FIGURA 6.21a-b**). No entanto, foi percebido que após a deposição da terceira camada, os mesmos tornaram-se mais rígidos e quebradiços ao serem manuseados. As imagens de MEV (**FIGURA 6.21c-d**) indicaram uma dispersão homogênea da zeína sobre a superfície de caseína, mostrando a viabilidade da técnica. Nas imagens da seção transversal (**FIGURA 6.21e-f**), foram visualizadas as três camadas poliméricas, sendo possível a delimitação das interfaces apenas para as duas primeiras camadas. É importante ressaltar que a aspersão da proteína promoveu a formação de uma cobertura rugosa que não recobre totalmente a superfícies da camada caseína, aspectos importantes a serem considerados nas características superficiais.



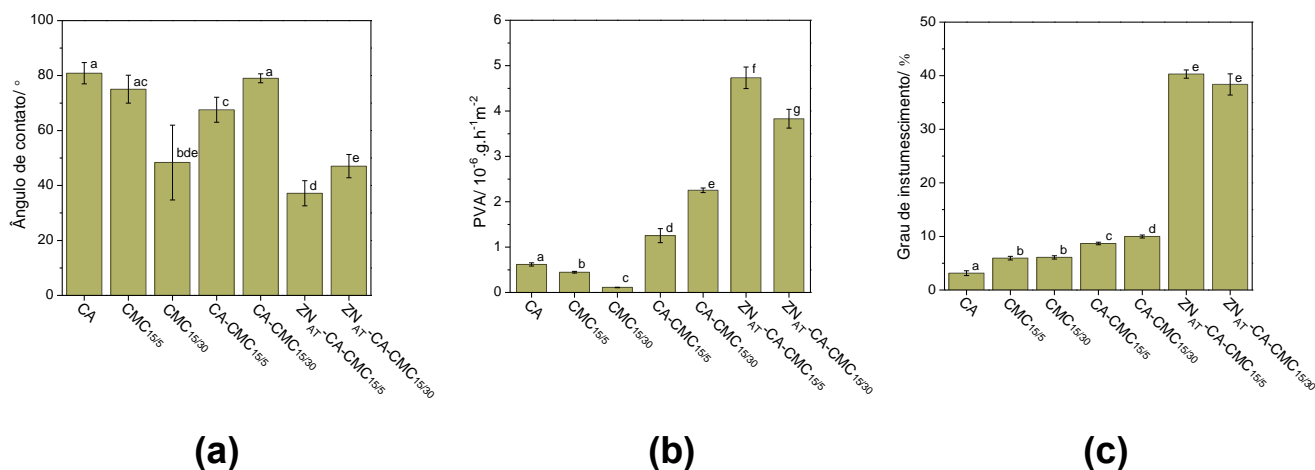
**FIGURA 6.21.** (a-b) Imagens dos filmes multicamadas e de suas respectivas (c-d) imagens MEV da seção transversal.

Para verificar diferenças estruturais nas superfícies dos filmes referentes a deposições das camadas, são apresentados na **FIGURA 6.22** os espectros de FTIR-ATR da última camada dos filmes controles (mono e bicamadas) e multicamadas. Os perfis apontaram diferenças consideráveis, mostrando que a cada inserção de camada as características estruturais da face são alteradas, o que remete a uma anisotropia para filmes bi e tricamadas em relação as faces inferior e superior expostas. Os espectros da tricamada sugere a hidrofobização do material devido à redução significativa das intensidades de vibração das bandas associadas ao estiramento dos grupos hidrofílicos -OH ( $3215\text{ cm}^{-1}$ ), C-H de aromático ( $2937\text{ cm}^{-1}$ ) e ao dobramento das ligações -NH das amidas I ( $1600\text{ cm}^{-1}$ ) e II ( $1500\text{ cm}^{-1}$ ) (Aytac et al., 2020; Zaleska et al., 2002). O aparecimento de uma banda em  $2370\text{ cm}^{-1}$  está associado ao  $\text{CO}_2$  atmosférico. Não houve variações consideráveis em relação aos filmes multicamadas, visto que ambos diferem apenas na composição da camada base de CMC.



**FIGURA 6.22.** Espectros FTIR dos filmes controles e multicamadas (a)  $ZN_{AT}\text{-CA-CMC}_{15/5}$  e (b)  $ZN_{AT}\text{-CA-CMC}_{15/30}$ . Espectros normalizados pela soma das intensidades.

Na **FIGURA 6.23** está apresentada as análises referentes a afinidade com a água para os filmes controles (mono e bicamadas) e os multicamadas. Mudanças na molhabilidade dos filmes foram investigadas por medidas do ângulo de contato (**FIGURA 6.23a**) da face referente à última camada depositada.



**FIGURA 6.23.** (a) Gráficos referentes às medidas de ângulo de contato após 30 s de análise referente a face da última camada depositada, (b) permeabilidade ao vapor de água (PVA) tendo a última camada depositada voltada para o interior da cela contendo água e (c) grau de intumescimento após 24 h em UR= 50 % a 25 °C. Diferentes índices indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) no mesmo gráfico

A molhabilidade dos filmes bicamadas foi semelhante à do filme controle de caseína, dado que a face analisada é composta por uma camada de caseína. Já as multicamadas exibiram valores significativamente inferiores aos sistemas

bicamadas e aos filmes monocamadas controles, contrapondo a característica hidrofóbica esperada para a zeína. Comportamento análogo foi observado por Chen et al., (2019) em filmes bicamadas de zeína e amido, nos quais a camada proteica apresentou uma melhor molhabilidade que a do amido. Os autores argumentaram que a zeína forma uma superfície microporosa que favorece e acelera a migração de água, além da exposição de grupos hidrofílicos na superfície após a evaporação do solvente. Outro aspecto a ser considerado é a presença de trincas na superfície de caseína, que deve contribuir para infiltração da água no filme. Tais observações podem ser corroborados com as análises de PVA (**FIGURA 6.23b**), nas quais os filmes multiestruturados demonstraram ser mais permeáveis à umidade quando comparados com os filmes controles. Como discutido anteriormente, o caráter hidrofílico/hidrofóbico da superfície não afeta consideravelmente a transmissão da água para estes sistemas; desta forma, a presença de defeitos pode explicar tal comportamento. O grau de intumescimento das multicamadas foi cerca de 30% superior aos dos filmes controles, o que suporta a discussão anterior. É interessante notar que os comportamentos entre os filmes ZN<sub>AT</sub>-CA-CMC<sub>15/5</sub> e ZN<sub>AT</sub>-CA-CMC<sub>15/30</sub> são semelhantes indicando que a camada de zeína determina as propriedades de barreira e afinidade com água ou que a presença dos defeitos mascarou a contribuição de cada componente.

As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas segundo testes de tração uniaxial e teste de resistência ao rasgo, os quais são apresentados na **TABELA 6.6**. A resistência à tração está associada a capacidade dos filmes em resistir ao estiramento até seu ponto de ruptura. Já a resistência ao rasgo refere-se à resistência do material à iniciação de uma trinca e sua respectiva propagação. Para aplicações como embalagens de alimentos, tais propriedades afetam a funcionalidade, integridade e facilidade de uso do material (Briassoulis & Giannoulis, 2018).

Os valores das forças de rasgo mostraram que os filmes monocamadas de CMC são mais resistentes devido uma maior coesão entre as cadeias poliméricas. Entretanto, observou-se que as monocamadas requerem uma maior força para iniciar o rasgo que os filmes bicamadas.

**TABELA 6.6.** Valores dos atributos mecânicos resistência à tração ( $\sigma$ ), alongação na ruptura ( $\epsilon$ ), módulo de elasticidade ( $E$ ) e força máxima de rasgo ( $F_{\text{rasgo}}$ ). Os valores de  $F_{\text{rasgo}}$  foram normalizados pelas espessuras dos filmes. Diferentes índices indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dentro da mesma coluna.

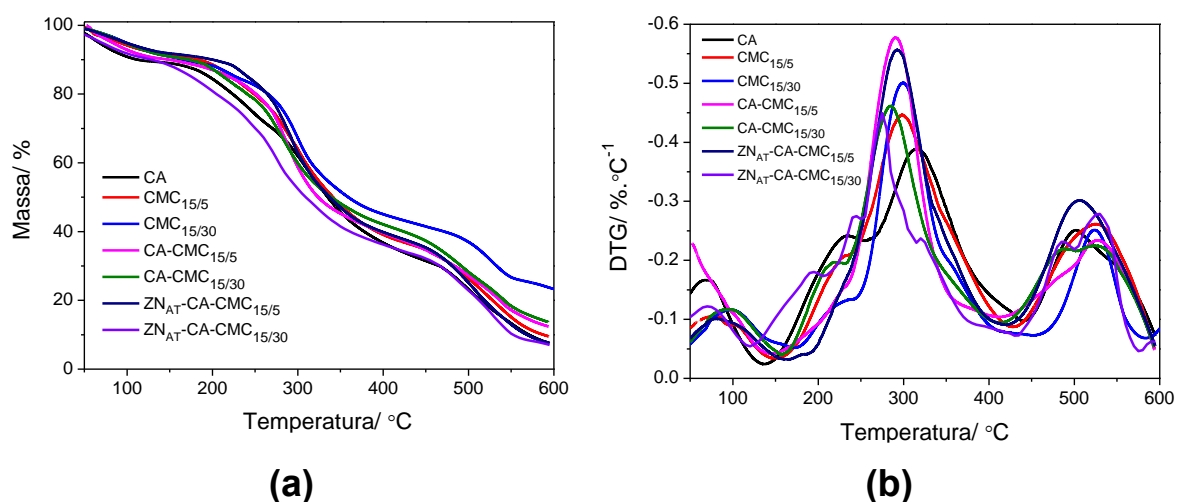
Filmes	$F_{\text{rasgo}}/ \text{N.mm}^{-1}$	$\sigma/ \text{MPa}$	$\epsilon/ \%$	$E/ \text{GPa}$
CA	$6 \pm 2^{\text{ac}}$	$9 \pm 1^{\text{a}}$	$25 \pm 9^{\text{a}}$	$2 \pm 1^{\text{a}}$
CMC <sub>15/5</sub>	$17 \pm 1^{\text{b}}$	$20 \pm 1^{\text{b}}$	$7 \pm 3^{\text{b}}$	$16 \pm 3^{\text{b}}$
CMC <sub>15/30</sub>	$6 \pm 3^{\text{ac}}$	$20 \pm 1^{\text{b}}$	$3 \pm 1^{\text{c}}$	$10 \pm 0,3^{\text{c}}$
CA-CMC <sub>15/5</sub>	$4 \pm 1^{\text{c}}$	$12, \pm 5^{\text{ac}}$	$8 \pm 2^{\text{b}}$	$5 \pm 2^{\text{d}}$
CA-CMC <sub>15/30</sub>	$7 \pm 1^{\text{a}}$	$19 \pm 4^{\text{c}}$	$2,3 \pm 0,3^{\text{c}}$	$9 \pm 2^{\text{c}}$
ZN <sub>AT</sub> -CA-CMC <sub>15/5</sub>	$2 \pm 1^{\text{d}}$	$1,9 \pm 0,4^{\text{d}}$	$2 \pm 1^{\text{c}}$	$13 \pm 2^{\text{b}}$
ZN <sub>AT</sub> -CA-CMC <sub>15/30</sub>	$3 \pm 0,5^{\text{d}}$	$1,2 \pm 0,2^{\text{d}}$	$4 \pm 1^{\text{bc}}$	$6 \pm 1^{\text{d}}$

Tal comportamento pode estar relacionado com a delaminação observada para as bicamadas nos testes de tração (**FIGURA 6.15b**), o que podem atuar ponto de início da trinca. Em relação aos filmes multicamadas, a resistência aos rasgos foi significativamente inferior aos demais sistemas. Foi observado que a resistência à tração seguiu a mesma tendência observada para a resistência ao rasgo.

O comportamento mecânico dos filmes multicamadas em relação aos controles mostraram que a deposição da camada de zeína prejudicou o desempenho mecânicos do sistema. Como discutido anteriormente, o uso do ácido acético como solvente desestabiliza as micelas de caseína que viabiliza o aparecimento de trincas (Li & Zhong, 2020). Desta forma, supõe-se que a presença de defeitos e a infiltração dos solventes nos filmes deve aumentar a rigidez do material, seja por meio da desidratação ou formação de defeitos, corroboradas com os valores da alongação na ruptura e do módulo de elasticidade. Em relação aos filmes ZN<sub>AT</sub>-CA-CMC<sub>15/5</sub> e ZN<sub>AT</sub>-CA-CMC<sub>15/30</sub>, a composição da camada base de CMC promoveu algum efeito em relação de alongação na ruptura e módulo de elasticidade, no entanto, estes não são coerentes com o comportamento dos filmes mono e bicamadas.

Os valores de todas as análises referentes às propriedades mecânicas e de afinidade com água para os filmes mono, bi e multicamadas estão listados nas **TABELAS C1 e C2**, respectivamente.

O comportamento térmico foi avaliado por TGA, conforme mostrado pela **FIGURA 6.24** e **TABELA 6.7**. Foi constatado quatro principais estágios de decomposição (**FIGURA 6.24a**). A perda de massa inicial entre 25-130 °C está relacionada à evaporação da água livre e adsorvida nos filmes (Salem et al., 2022). O segundo e o terceiro estágio, encontrados entre 150-260 e 260-430 °C, respectivamente, estão associados à degradação do glicerol e da água estrutural, além da quebra de ligações peptídicas e glicosídicas das matrizes poliméricas (Picchio et al., 2018; Seki et al., 2014).



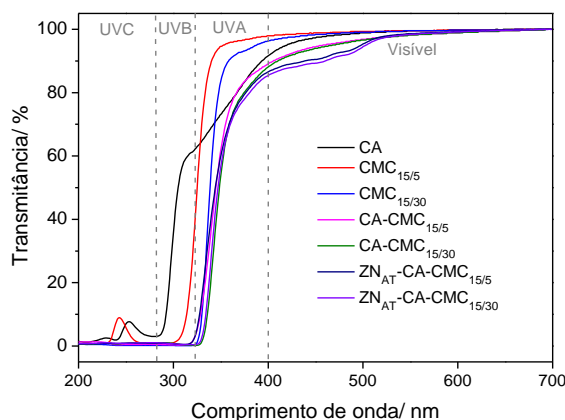
**FIGURA 6.24.** Curvas termogravimétricas e suas respectivas derivadas para os filmes mono, bi e multicamadas.

**TABELA 6.7.** Valores das temperaturas de onset ( $T_{onset}$ ) para os filmes mono, bi e multicamadas.

Filmes	$T_{onset}/ ^\circ\text{C}$
CA	316
CMC <sub>15/5</sub>	298
CMC <sub>15/30</sub>	300
CA-CMC <sub>15/5</sub>	290
CA-CMC <sub>15/30</sub>	284
ZN <sub>AT</sub> -CA-CMC <sub>15/5</sub>	292
ZN <sub>AT</sub> -CA-CMC <sub>15/30</sub>	279

As temperaturas de degradação dos polissacarídeos e das proteínas são relativamente diferentes, o que causa o alargamento da faixa referente à decomposição poliméricos, observado principalmente para os filmes bi- e multicamadas (Abdullah et al., 2022). Os valores das  $T_{onset}$  (**TABELA 6.7**) mostraram que os filmes bi e multiestrurados são menos estáveis termicamente que os filmes monocamadas controles, assim como observado por Zhou et al., (2021). O quarto estágio, entre 440-600 °C, remete à formação de compostos carbonáceos (Picchio et al., 2018).

Os espectros no UV-VIS (**FIGURA 6.25**) exibiram alterações nas transmitâncias na região do UV em função da adição de camadas.



**FIGURA 6.25.** Espectros de transmitância de luz na região do ultravioleta e visível dos filmes bicamadas.

Os filmes monocamadas exibiram transmitância praticamente nula da radiação na região do UVC e, no caso do CMC<sub>15/30</sub>, também na região do UVB. Não foi observada variação significativa da transmitância entre os filmes bicamadas e os multicamadas na região do UV, sendo que ambos apresentaram um bloqueio de cerca de 15% da UVA em relação às monocamadas. No entanto, os filmes contendo a camada de zeína demonstraram uma diminuição de 10% na transmitância na região entre 400-520 nm do visível devido à sua coloração amarelada, mantendo a transparência do sistema. Tais características são relevantes considerando aplicações em embalagens alimentícias, visto que a proteção UV desfavorece processos oxidativos, enquanto a transparência possibilita a observação dos alimentos e a coloração torna o produto mais atraente ao consumidor (Guzman-Puyol et al., 2022).

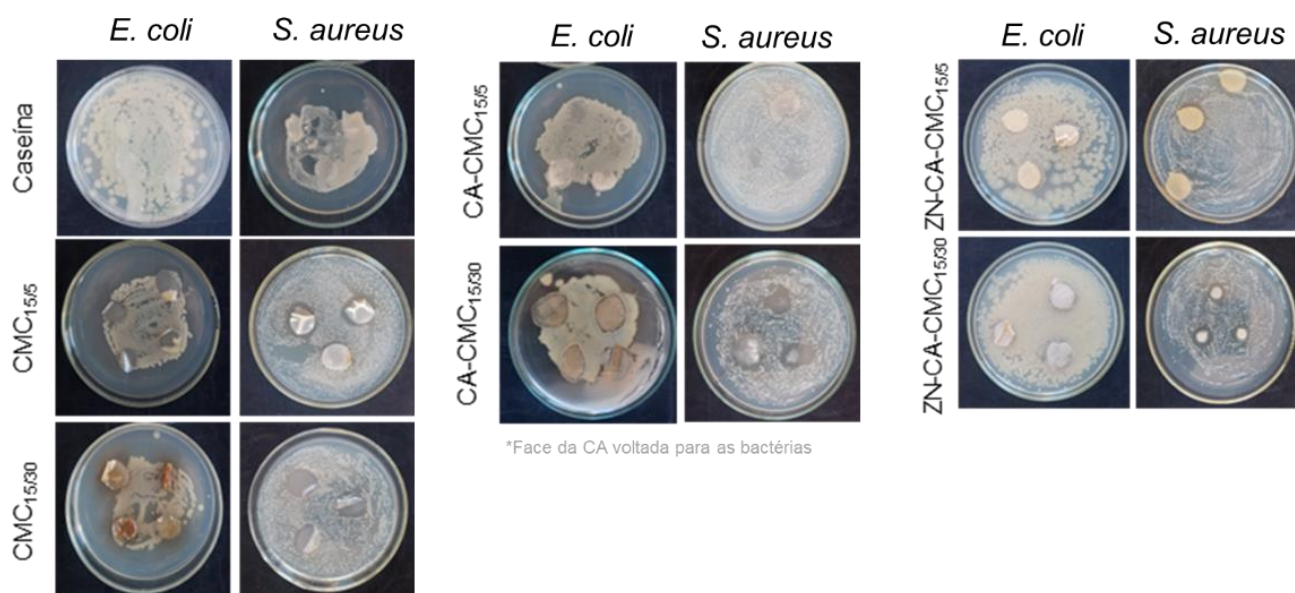
A **TABELA 6.8** contém os valores dos parâmetros colorimétricos e dos índices de alvura dos filmes controles e multicamadas. Os filmes mono e bicamadas

apresentam valores semelhantes. A deposição da camada de zeína alterou a coloração dos filmes para uma região do verde e amarelo, além de torná-los mais escuros, como observado pelas mudanças nos valores de  $a^*$ ,  $b^*$  e  $L^*$ , respectivamente. O aumento significativo do parâmetro  $\Delta E^*$  mostra que houve mudança da cor dos filmes de forma a torná-los menos alvos, indicado pela diminuição dos valores de  $IA$ .

**TABELA 6.8.** Valores dos parâmetros colorimétricos ( $a^*$ ,  $b^*$  e  $L^*$ ), da diferença de cor total ( $\Delta E$ ) e do índice de alvura ( $IA$ ).

Filmes	$a^*$	$b^*$	$L^*$	$\Delta E^*$	$IA/\%$
CA	$1 \pm 0,02^a$	$-2 \pm 0,05^a$	$90 \pm 0,5^a$	$2 \pm 0,2^a$	$90 \pm 0,5^a$
CMC <sub>15/5</sub>	$2 \pm 0,02^b$	$-3 \pm 0,1^a$	$90 \pm 0,2^a$	$1,6 \pm 0,2^a$	$89 \pm 0,2^a$
CMC <sub>15/30</sub>	$1 \pm 0,01^a$	$-0,9 \pm 0,1^b$	$90 \pm 0,5^a$	$4 \pm 0,2^b$	$89 \pm 0,5^a$
CA-CMC <sub>15/5</sub>	$2 \pm 0,02^b$	$-0,7 \pm 0,1^b$	$88 \pm 0,3^b$	$4 \pm 0,1^b$	$88 \pm 0,3^a$
CA-CMC <sub>15/30</sub>	$1 \pm 0,02^a$	$1 \pm 0,2^c$	$87 \pm 0,1^c$	$7 \pm 0,2^c$	$87 \pm 0,1^a$
ZN <sub>AT</sub> -CA-CMC <sub>15/5</sub>	$-2 \pm 0,3^c$	$17 \pm 2^d$	$86 \pm 0,4^c$	$22 \pm 2^d$	$78 \pm 2^b$
ZN <sub>AT</sub> -CA-CMC <sub>15/30</sub>	$-2 \pm 0,05^c$	$37 \pm 2^e$	$82 \pm 0,6^d$	$42 \pm 2^e$	$59 \pm 2^c$

A atividade antimicrobiana dos filmes foi avaliada pelo teste de difusão em disco contra *E. coli* e *S. aureus*, como visualizado na **FIGURA 6.26**. Não foi detectada atividade antimicrobiana dos filmes contra *E. coli*, possivelmente por se tratar de uma bactéria Gram-negativa, que contém uma parede celular lipopolissacarídica complexa e mais resistente à permeação de componentes externos (Bouchelaghem, 2022, Ruhai & Kataria, 2021). Em relação à *S. aureus*, os filmes CMC<sub>15/5</sub>, CMC<sub>15/30</sub>, ZN<sub>AT</sub>-CA-CMC<sub>15/5</sub> e ZN<sub>AT</sub>-CA-CMC<sub>15/30</sub>, os quais continham AT incorporado na face em contato com a cepa, foram capazes de inibir o crescimento dos micro-organismos. A literatura mostra que a atividade antimicrobiana do AT está relacionada com a supressão de genes associados à adesão intercelular das bactérias, exibindo um efeito mais potente contra *S. aureus* (Zhang et al., 2020).



**FIGURA 6.26.** Imagens dos testes de disco difusão para as bactérias *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*) dos filmes mono, bi e multicamadas.

A técnica escolhida para investigar a atividade antimicrobiana do material não foi considerada adequada para os materiais estudados, visto que o AT adicionado nos filmes não difunde para o meio externo, o que não acarreta a formação de halos de inibição. Entretanto, a metodologia permitiu observar qualitativamente a capacidade de inibição antimicrobiana pela região em que os filmes estavam em contato com as bactérias. É considerada a realização de testes adicionais para uma melhor avaliação da atuação dos filmes como material antimicrobiano.

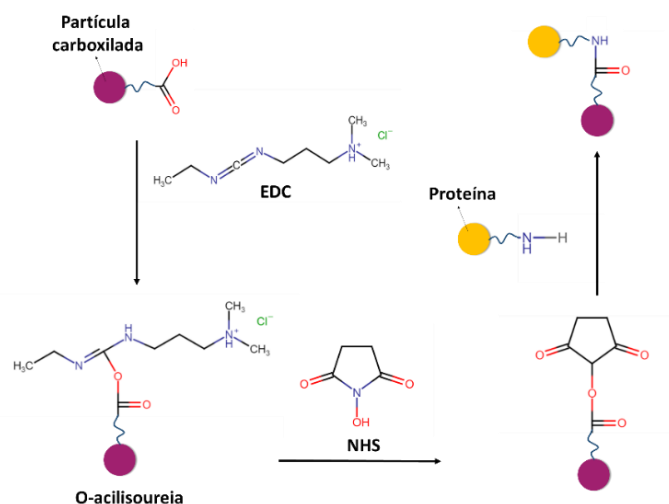
### 6.3. Medidas das forças de interação entre os biopolímeros por microscopia de força atômica (AFM)

Nesta seção, medidas de força de interação utilizando AFM foram realizadas a fim de investigar as forças de adesão entre os biopolímeros que compõem o filme multicamada. O intuito do experimento foi quantificar as forças que atuam entre uma sonda modificada com caseína ( $CA_{\text{sonda}}$ ) e substratos de caseína (CA), zeína (ZN) e CMC como uma tentativa de mimetizar as interfaces dos sistemas CA-CA, CA-CMC e CA-ZN. Vale ressaltar que as sondas de AFM foram modificadas apenas com caseína, o polímero da camada intermediária, a fim de realizar as medidas de força com substratos produzidos com os polímeros das camadas

adjacentes, tornando as medições mais reprodutíveis e comparáveis. Adicionalmente, foi feita medidas de força dos sistemas  $CA_{\text{sonda}}-CA$  de forma a comparar as forças de coesão entre as cadeias de caseína e as forças de adesão entre caseína e os demais biopolímeros. Os substratos foram obtidas a partir da deposição de um filme fino dos biopolímeros sobre um *wafer* de sílica. Para tal, foi necessário a elucidação de uma metodologia para a funcionalização da sonda com a proteína e a adequação da obtenção de substratos adequados e estáveis em meio salino, o qual está descrito no **APÊNDICE D**. Os experimentos foram conduzidos em meio salino (10 mM NaCl) a fim de evitar a influência de forças capilares e a formação de uma dupla camada elétrica infinita, além de tornar as medidas mais reprodutíveis. Foi avaliado a afinidade entre os biopolímeros constituintes do sistema multiestruturado, a contribuição do AT em diferentes concentrações (0, 5 e 30% b.s.) para a promoção da adesão interfacial e o efeito do tempo de contato (0, 5 e 10 s) entre a sonda e o substrato na magnitude das interações.

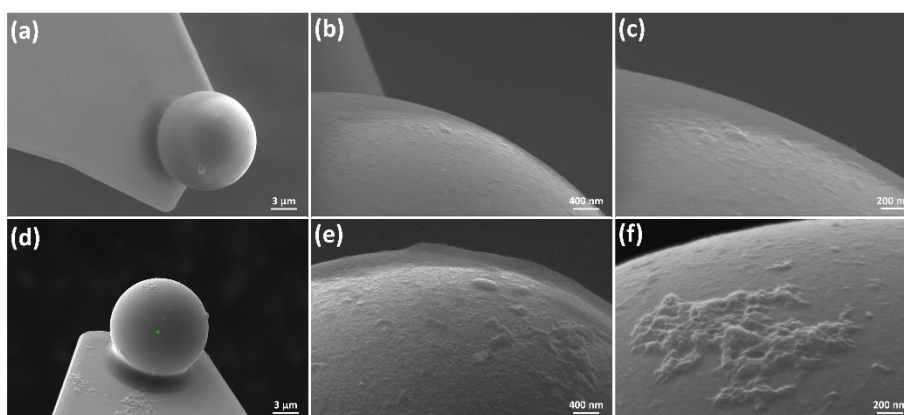
### **6.3.1. Modificação da sonda coloidal carboxilada de AFM com caseína**

As sondas de AFM foram adquiridas com um pré-recobrimento, o qual continha grupos carboxilas superficiais expostos. Assim, foi possível promover o acoplamento da caseína na superfície da sonda a partir de uma reação mediada por EDC/NHS, como previsto pelo protocolo desenvolvido, cujo mecanismo está representado na **FIGURA 6.27**. O EDC reage com um grupo carboxila para formar o intermediário O-acilisourea, o qual se liga prontamente a um grupo amina da proteína. Esta etapa resulta na formação de uma ligação amida e na liberação de um subproduto isourea. Em soluções aquosas, o intermediário é instável e pode sofrer hidrólise, regenerando o grupo carboxila e liberando ureia N-substituída caso não reaja com uma amina. A presença da NHS na reação promove a conversão da O-acilisourea em um éster mais estável, minimizando reações colaterais indesejadas e aumentando a reatividade das aminas. O EDC é um agente de reticulação de comprimento zero, pois durante a reação os átomos são eliminados dos reagentes, formando uma ligação curta que conecta os grupos carboxilas e aminas (Biranje et al., 2022; Kim et al., 2004).



**FIGURA 6.27.** Mecanismo de reação de acoplamento entre uma partícula carboxilada e uma proteína utilizando os reagentes EDC/NHS via acoplamento mediado por carbodiimida (modificado de Xu et al., (2022)). EDC: cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida; NHS: N-hidroxisuccinimida.

A **FIGURA 6.28** mostra as imagens MEV das sondas coloidais antes e depois de medidas de força. A funcionalização com a caseína promoveu uma cobertura uniforme e contínua na superfície coloidal (**FIGURA 6.28a-c**), o que influencia diretamente na reprodutibilidade e sensibilidade das análises. Após dez mapas força-distância, a cobertura da sonda permaneceu estável, já que não foram visualizadas falhas ou a remoção da cobertura proteica da superfície do coloide (**FIGURA 6.28d-e**). Observa-se que, em algumas regiões (**FIGURA 6.28f**), houve a deposição de polímero residual retirado do substrato.



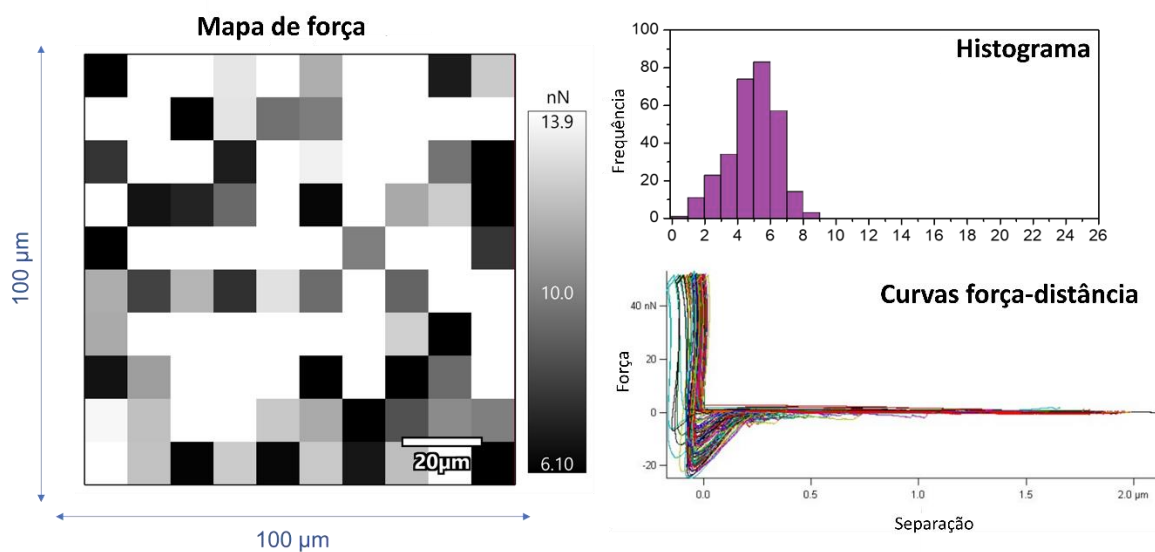
**FIGURA 6.28.** Imagens MEV da sonda modificada com caseína (a-c) antes e (d-f) após as medidas de força.

A eficiência da modificação foi verificada comparando os valores das forças de *pull-off* de medidas realizadas com sondas não modificadas e modificadas com caseína, os quais apresentaram valores médios diferentes. Os resultados são discutidos na **sessão 6.3.2**.

### **6.3.2. Medidas de força por AFM**

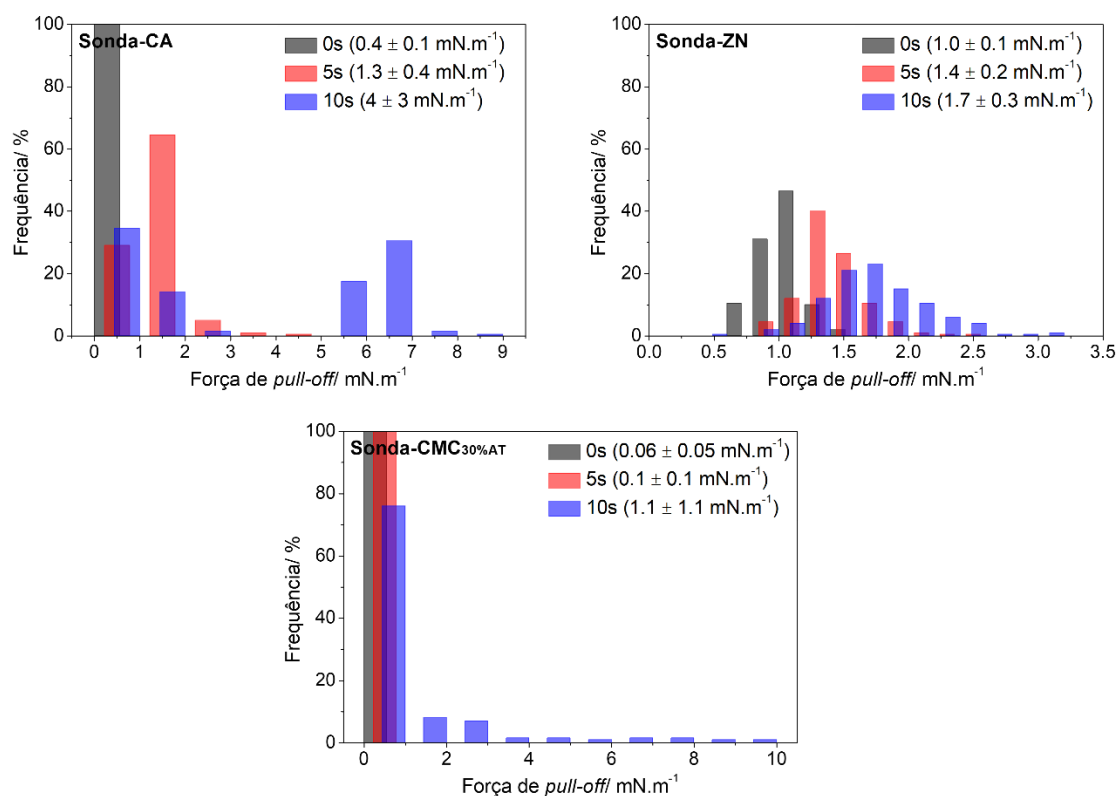
As forças de interação dos sistemas CA<sub>sonda</sub>-CMCs e CA<sub>sonda</sub>-ZNs foram investigadas por medidas das forças de *pull-off* utilizando a técnica de AFM. O perfil típico de uma curva força-distância (**FIGURA 2.9**) descreve as forças que ocorrem durante a aproximação da sonda ao substrato (curva de aproximação), frequentemente relacionadas às forças atrativas de van der Waals. Após atingir o *trigger point*, a sonda é muda a direção do movimento e o equipamento registra as forças resistivas para a separação da sonda do substrato (curva de retração), as quais estão associadas a uma somatória de interações adesivas (Kaftan et al., 2011). A força de *pull-off* representa o valor mínimo da curva força-distância de retração, ou seja, a maior força de interação, em magnitude, que o equipamento registou durante a separação entre a sonda e o substrato. A aquisição dos dados foi feita por meio de mapas de força de 100 x 100  $\mu\text{m}$  (10 pixels x 10 pixels), o qual teve como intuito avaliar regiões distintas da amostra evitando medidas em pontos repetidos já que cada pixel correspondeu a uma curva distância-força, conforme ilustrado na **FIGURA 6.29**.

Assim, as propriedades inerentes dos biopolímeros que compõem o substrato podem impactar os resultados de adesão entre eles. Além das interações químicas, as características físicas também afetam a forma como o contato é feito (Poggemann et al., 2023). Considerando que o *trigger point* foi o mesmo para todas as análises, infere-se que a área de contato foi semelhante para todas as medições, mitigando a influência da natureza do substrato.

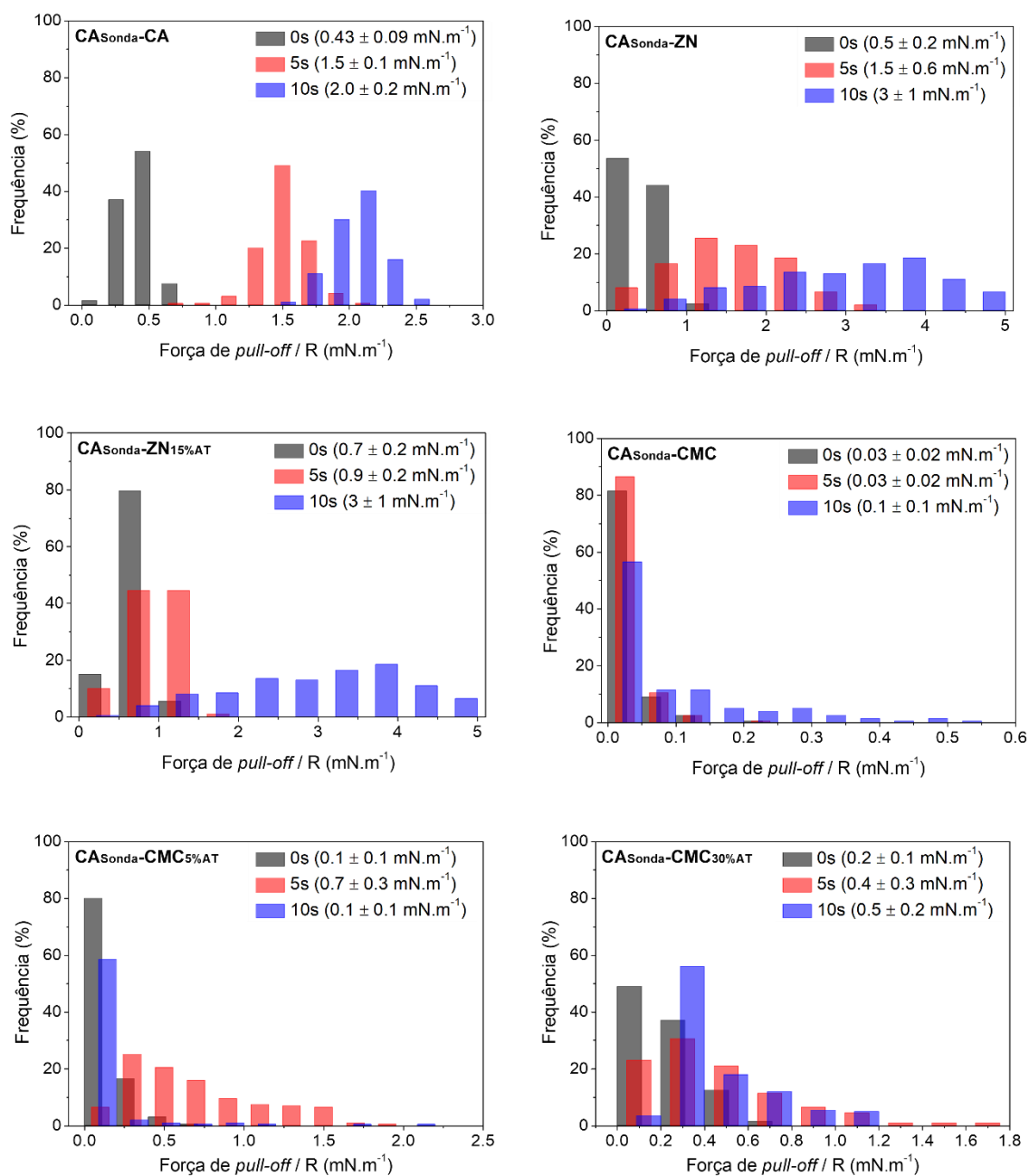


**FIGURA 6.29.** Representação do mapa de força de pull-off, histograma e curvas força-distância adquiridas através de medidas de força por AFM. Cada pixel no mapa corresponde a uma curva força-distância, no qual as forças de pull-off são avaliadas na forma de um histograma.

As **FIGURA 6.30** e **6.31** apresentam os histogramas e os valores médios das forças de pull-off dos sistemas sem o probe modificado e modificado com caseína, respectivamente. O tempo de contato da sonda com o substrato antes da separação também foi estudado, pois este afeta a magnitude das interações intermoleculares (Nugroho et al., 2019).



**FIGURA 6.30.** Histogramas das distribuições de forças de pull-off entre sondas não modificadas e os e substratos de caseína (CA), zeína (ZN) e carboximetilcelulose contendo 30% de ácido tânico (CMC<sub>30%AT</sub>). As distribuições de força correspondem aos tempos de contato de 0, 5 e 10 s. Os valores entre parênteses são a média aritmética e os desvios padrões das forças de pull-off.



**FIGURA 6.31.** Histogramas das distribuições de forças de pull-off entre sondas modificadas com caseína (CA<sub>Sonda</sub>) e os e substratos de caseína (CA), zeína sem (ZN) e com a incorporação de ácido tânico (ZN<sub>15%AT</sub>) e carboximetilcelulose sem (CMC), contendo 5% (CMC<sub>5%AT</sub>) e 30% de ácido tânico (CMC<sub>30%AT</sub>). As distribuições de força correspondem aos tempos de contato de 0, 5 e 10 s. Os valores entre parênteses são a média aritmética e os desvios padrões das forças de pull-off.

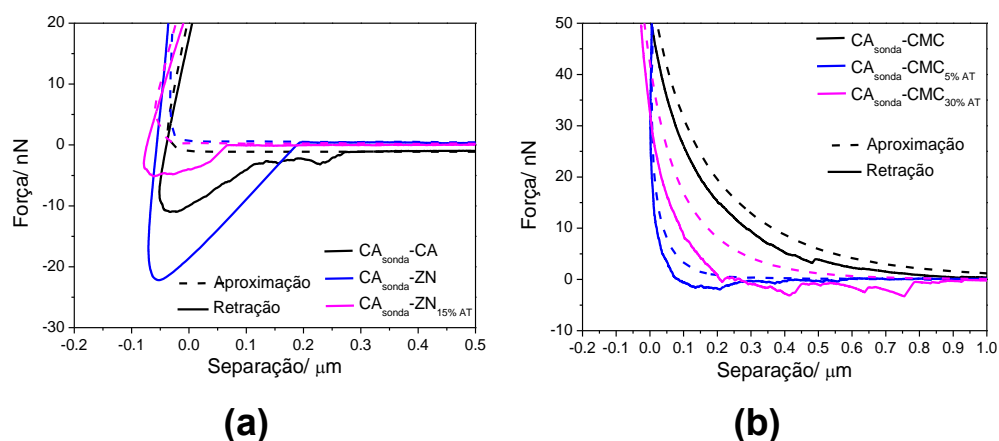
A modificação da sonda foi avaliada e confirmada pela comparação da distribuição dos histogramas das medidas realizadas com sondas não modificadas (**FIGURA 6.30**) e modificadas com caseína (**FIGURA 6.31**) em relação aos substratos CA, ZN e CMC<sub>30%AT</sub>. Para as sondas não modificadas, a distribuição das forças foi mais concentrada e os valores médios foram menores do que para as sondas modificadas, indicando dinâmicas de interação distintas e uma menor adesão. Além disso, o efeito do tempo de contato pareceu ter pouca influência na magnitude das forças de interação para as sondas não modificadas. Esse comportamento é uma forte evidência do sucesso da reação de acoplamento proteico, garantindo que as medições foram realizadas entre os biopolímeros investigados. É importante ressaltar que os valores médios apresentaram erros relativamente elevados devido à amplitude das distribuições. Assim, os histogramas podem ser melhor avaliados observando os deslocamentos das curvas de distribuição.

O sistema CA<sub>sonda</sub>-CA apresentou distribuições dos valores bem definidas, demonstrando um aumento evidente na magnitude das forças à medida que o tempo de contato aumentou. Para o sistema CA<sub>sonda</sub>-ZN, a distribuição foi mais alargada apresentando valores médios na mesma faixa que o sistema CA<sub>sonda</sub>-CA. Isto sugere que as forças de interação entre as cadeias de caseína e zeína são comparáveis às forças coesivas da caseína. A adição de AT à matriz de zeína (CA<sub>sonda</sub>-ZN<sub>15%AT</sub>) não causou alterações significativas nos valores da força de *pull-off*, provavelmente porque o polifenol atuou na reticulação entre as cadeias de zeína em vez de estabelecer ligações entre as cadeias de caseína e zeína na interface. Também foi verificado que o aumento do tempo de contato estimulou a adesão interfacial, mostrando que há uma cinética envolvida no estabelecimento de interações (Nugroho et al., 2019).

Em contraste com a magnitude das forças de *pull-off* entre as proteínas, em torno de 10 nN, as interações entre caseína e CMC ficaram em cerca de 3 nN. A diferença de afinidade pode ser atribuída a maior energia superficial das proteínas referente à sua estrutura de aminoácidos capazes de interagir entre si por meio de interações hidrofóbicas, eletrostáticas e ligações de hidrogênio (Khalifa et al., 2022). Tais observações corroboram com a discussão de Nugroho et al., (2019), os quais apontam que os domínios N-terminais e C-terminais das cadeias proteicas apresentam alta tendência a interagem entre si. O sistema CA<sub>sonda</sub>-CMC exibiu forças em torno de 0,2 nN, sem impacto significativo em relação ao tempo de contato.

Tal comportamento indica que a caseína e a CMC apresentam baixa afinidade, como já observado nos filmes bicamadas que eram facilmente delaminados. No entanto, as forças de interação de  $CA_{sonda}-CMC_{5\%AT}$  foram consideravelmente mais pronunciadas, principalmente um contato de 5s. A maior eficiência na adesão pode ser atribuída à formação de ligações covalentes e ligações de hidrogênio entre AT e a caseína (Alavarse et al., 2022). Para  $CA_{sonda}-CMC_{30\%AT}$ , a magnitude das forças foi similar ao sistema contendo 5% de AT, e o tempo de contato não promoveu mudanças significativas na adesão entre os biopolímeros. Isto sugere que houve uma saturação das interações interfaciais ou que as interações foram desfavorecidas pelo efeito estérico causados pela alta concentração do polifenol no substrato (Takemoto et al., 2015; Zhang et al., 2023).

A **FIGURA 6.32** ilustra curvas força-distância representativas de cada sistema estudado. As curvas de aproximação não apresentam variações nas forças devido a atração ou repulsão da sonda, conforme descrito pelas curvas teóricas. As curvas de retração, por sua vez, contêm informações referentes à adesão do sistema, apresentando perfis diferentes para as medidas realizados em substrato de proteína e de CMC. As maiores forças de *pull-off* foram obtidas entre  $CA_{sonda}$ -proteínas, enquanto as maiores extensões de adesão ocorreram para  $CA_{sonda}$ -CMCs, indicando mecanismo de descolamento distintos.

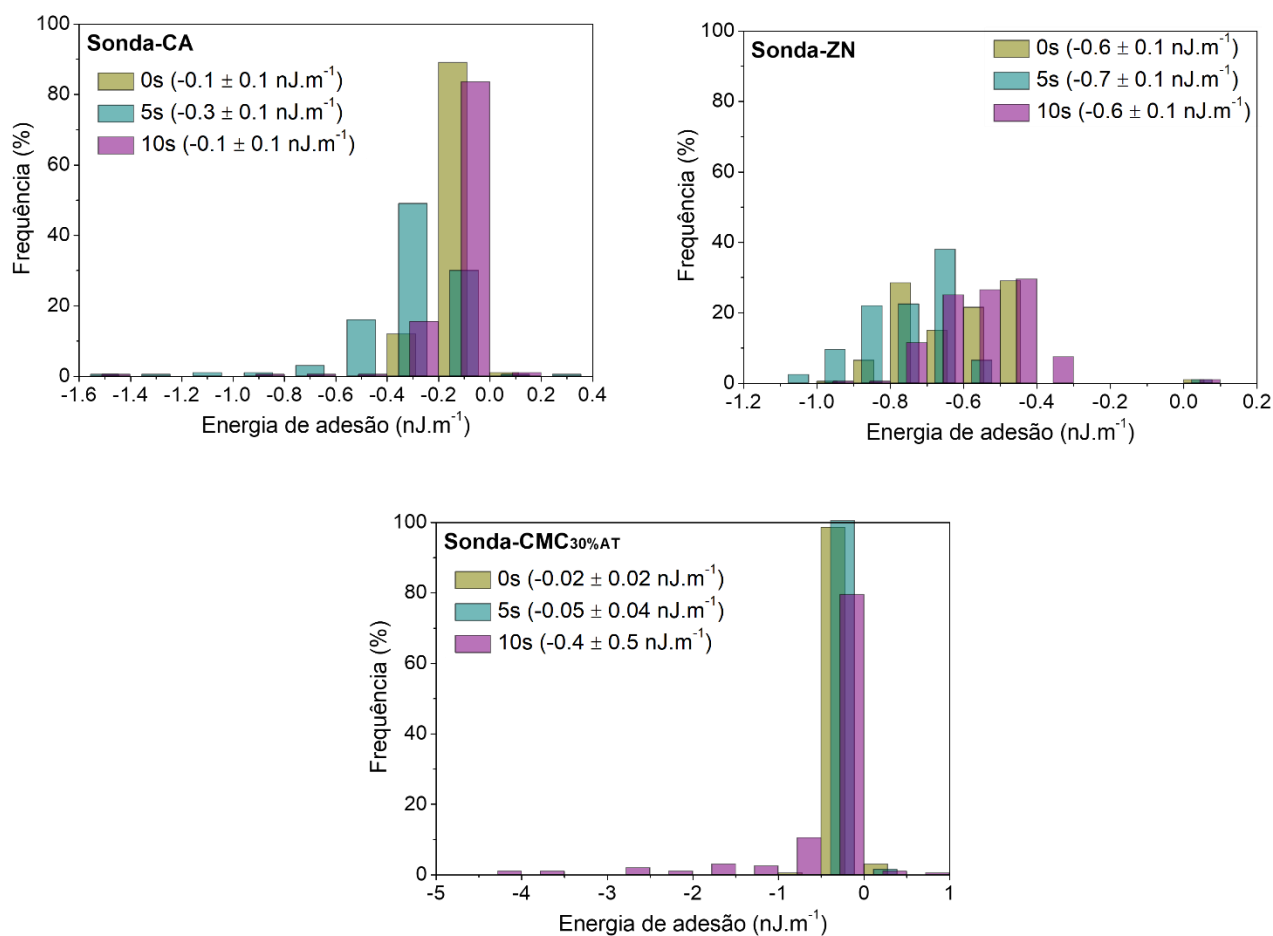


**FIGURA 6.32.** Curvas representativas de força-distância para as medidas entre a sonda modificada com caseína ( $CA_{sonda}$ ) e substratos de (a) caseína (CA) e zeína sem (ZN) e com a incorporação de ácido tânico ( $ZN_{15\%AT}$ ) e (b) carboximetilcelulose sem (CMC), contendo 5% ( $CMC_{5\%AT}$ ) e 30% de ácido tânico ( $CMC_{30\%AT}$ ). As curvas correspondem a medidas de força com tempo de contato de 10 s.

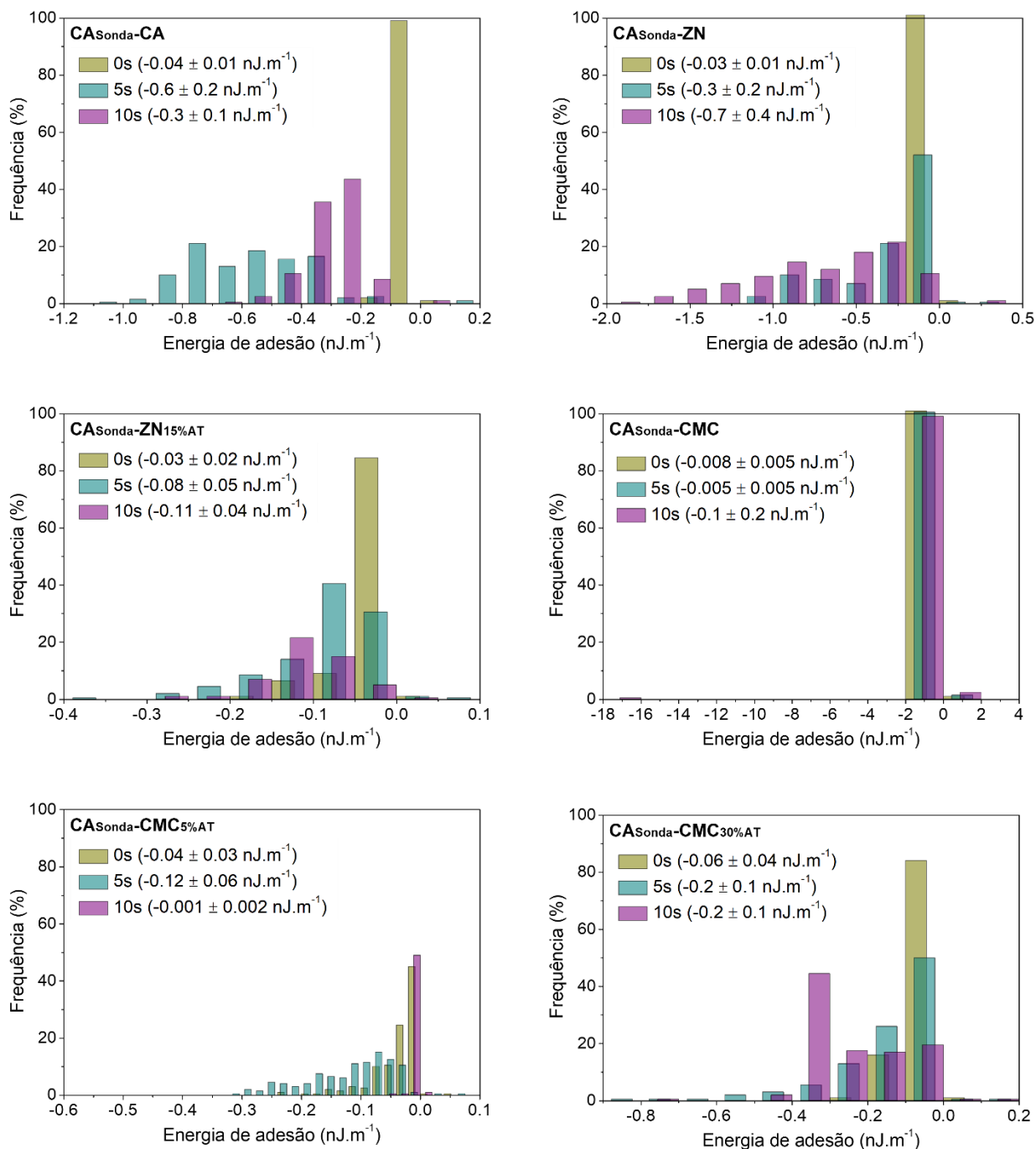
Os sistemas  $CA_{\text{sonda-CMC}}$ s mostraram que a incorporação do AT melhorou a compatibilidade entre a caseína e o CMC por meio da redução das forças repulsivas entre os biopolímeros. No sistema sem AT ( $CA_{\text{sonda-CMC}}$ ), a curva de aproximação exibiu um perfil de interações repulsivas fracas de longo alcance, no qual a sonda encontrou repulsão a uma distância de aproximadamente 0,9  $\mu\text{m}$  da superfície (Lefebvre & Gray, 2005; Nascimento et al., 2022). A introdução de AT provocou o deslocamento do ponto de contato entre a sonda e o substrato para cerca de 0,6  $\mu\text{m}$  e 0,2  $\mu\text{m}$  para os sistemas  $CA_{\text{sonda-CMC}5\%AT}$ , e  $CA_{\text{sonda-CMC}30\%AT}$ , respectivamente. (Chen et al. (2020) observaram que a introdução de AT em complexos de ovalbumina e CMC aumentou a repulsão entre os biopolímeros devido as cargas negativas do polifenol em meio aquoso. Entretanto, os autores constataram que as forças atrativas, associadas às ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas, sobressaem às forças repulsivas em pH próximo a neutralidade, causando uma diminuição da repulsão do sistema. Nos sistemas  $CA_{\text{sonda-ZNs}}$ , não foi observado variações de perfis das curvas de aproximação devido a incorporação do AT, isso porque este atua na reticulação entre as cadeias proteicas ao invés da interação interfacial, como previamente discutido.

Nas curvas de retração, observou-se que a separação entre a sonda e o substrato de proteínas ocorreu como um evento único. No entanto, para os substratos de CMCs, múltiplos eventos foram registrados devido ao desprendimento gradual entre a sonda e o substrato, característico de hidrogéis (Kaftan et al., 2011). Notou-se que a presença e a concentração de AT influenciam o número de eventos de adesão, o que é atribuído ao maior número de pontos de interação. As forças de *pull-off* representam a força máxima necessária para retirar a sonda do contato do substrato desconsiderando a dinâmica de separação. A fim de considerar toda a informação contida no poço da curva de retração, determinou-se a energia de adesão a partir da integração da área entre a curva de retração a *baseline* na força zero (Sychev et al., 2023).

Nas **FIGURAS 6.33** e **6.34** estão apresentados os histogramas das energias de adesão dos sistemas com a sonda não modificada e modificada com caseína, respectivamente, para os tempos de contato de 0, 5 e 10 s.



**FIGURA 6.33.** Histogramas das distribuições das energias de adesão entre sondas não modificadas e substratos de caseína (CA), zeína (ZN) e carboximetilcelulose contendo 30% de ácido tânico (CMC<sub>30%AT</sub>). As distribuições de força correspondem aos tempos de contato de 0 s, 5 s e 10 s. Os valores entre parênteses são a média aritmética e os desvios padrões das energias de adesão.



**FIGURA 6.34.** Histogramas das distribuições das energias de adesão entre sondas modificadas com caseína ( $CA_{sonda}$ ) e substratos de caseína (CA), zeína sem (ZN) e com a incorporação de ácido tânico ( $ZN_{15\%AT}$ ) e carboximetilcelulose sem (CMC), contendo 5% ( $CMC_{5\%AT}$ ) e 30% de ácido tânico ( $CMC_{30\%AT}$ ). As distribuições de força correspondem aos tempos de contato de 0 s, 5 s e 10 s. Os valores entre parênteses são a média aritmética e os desvios padrões das energias de adesão.

Os perfis das distribuições da energia de adesão foram diferentes dos perfis da força de *pull-off*. As distribuições das energias para os sistemas com a sonda não modificada foram distintas daquelas das sondas modificadas, as quais apresentaram um efeito menos significativo do tempo de contato. Diferentemente dos histogramas das forças de *pull-off*, a magnitude das energias de adesão para os substratos de proteínas foi similar aos da CMC. Os sistemas CA<sub>sonda</sub>-CA e CA<sub>sonda</sub>-ZN exibiram um aumento nos valores das energias e um alargamento das distribuições com o aumento do tempo de contato, o que não foi observado para CA<sub>sonda</sub>-ZN<sub>15%AT</sub>. Como já discutido, supõe-se que o AT interage com as cadeias de zeína limitando os grupos disponíveis para a promoção da adesão interfacial, já que não se observa uma dinâmica que favoreça o aumento das interações com o tempo. Em relação aos substratos de CMC, estes exibiram o mesmo comportamento das forças de *pull-off*. A introdução de 5% AT aumentou significativamente a adesão com a caseína, no entanto o aumento da concentração para 30%, provocou um aumento das energias e apresentou uma distribuição mais concentrada dos valores, os quais não foram afetados pelo tempo de contato. Essa distribuição mais concentrada indica uma menor variabilidade dos valores e uma medida mais precisa da adesão. Diferentemente das análises das forças de *pull-off*, as energias de adesão apresentaram valores médios de mesma magnitude, indicando que as afinidades entre CA<sub>sonda</sub>-ZN<sub>s</sub> e CA<sub>sonda</sub>-CMCs são comparáveis. Em resumo, a caseína e a zeína são compatíveis termodinamicamente, no entanto, as interações com a CMC é mediada pelo AT.

## 7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados, conclui-se que foi possível a produção e a integração de três camadas adjacentes, cada uma com diferentes características e parâmetros de processamento, a partir da combinação das técnicas de *casting* contínuo e deposição por sopro em solução (DSS). A CMC e a caseína exibem boa capacidade de formação de matriz e são solúveis em água, o que permitiu sua conformação em uma máquina de laminação contínua. Por outro lado, a zeína, com suas pobres propriedades filmogênicas e solubilidade em solventes voláteis, foi convenientemente depositada por aspersão. Essas técnicas mostram potencial para serem escalonáveis, o que é altamente relevante do ponto de vista industrial. Os filmes multicamadas foram autossuportáveis, contínuos e manuseáveis. Além disso, apresentaram-se transparentes indicando a ausência de incompatibilidade interfacial. Adicionalmente, os sistemas multiestruturados exibiram certo bloqueio à luz ultravioleta na região do UVA e UVB em relação às monocamadas.

A produção inicial de um filme bicamada mostrou-se uma estratégia viável para combinação da CMC e caseína sem que houvesse a complexação e/ou coacervação, resultando em filmes opacos e com separação de fases. Além disso, foi possível a obtenção de um material com uma interface que abrange toda a extensão bidimensional do filme, favorecendo as interações interfaciais. Em relação a composição dos filmes bicamadas inicialmente produzidos, o AT incorporado na matriz de CMC promoveu a formação de ligações covalentes e interações secundárias entre as camadas de CMC e a caseína, o que resultou no aumento da adesão interfacial. Tal efeito acarretou a diminuição do grau de intumescimento e no aumento da força requerida para a delaminação das bicamadas, o que foi justificado pela redução dos espaçamentos livres na interface. Também foi constatado que as diferentes proporções entre o BTCA e o AT, na formulação da camada de CMC, modularam as propriedades dos sistemas bicamadas, principalmente no tocante da afinidade com a água. Ambos os reticulantes atuaram no balanço entre os efeitos estéricos promovido pelas macromoléculas de AT e a reticulação e, conseqüentemente, a restrição da mobilidade das cadeias ocasionado pelo BTCA. Foi constatado mudanças estruturais referentes a diferentes exposições de grupamentos funcionais entre as faces externas e delaminadas de ambas as camadas poliméricas,

como demonstrado pelos diferentes graus de molhabilidade e variação dos perfis dos espectros de FTIR/ATR.

A deposição da terceira camada de zeína reduziu a resistência mecânica e aumentou a suscetibilidade à água das multicamadas. Esse comportamento foi atribuído à desestabilização das micelas da camada caseína, sobre a qual a zeína foi depositada, causada pelo ácido acético. O solvente provocou a formação de trincas, as quais atuaram como pontos de tensão e facilitaram a infiltração de umidade.

Foi possível o desenvolvimento de um protocolo para a realização de medidas de força entre os biopolímeros componentes do filme multicamada utilizando a técnica de AFM. O protocolo elucidou a modificação de sondas coloidais com caseína, a produção de substratos com superfícies planas e pouco rugosas, os parâmetros para aquisição dos dados e as medidas de força entre os biopolímeros. As medidas de forças de adesão e a determinação das energias de adesão indicaram que a caseína apresentou maior afinidade termodinâmica com a zeína do que com a CMC, a qual não foi afetada com a presença do AT. Além disso, a incorporação de AT na matriz de CMC aumentou significativamente os valores de força e energia de adesão entre a caseína e a CMC, corroborando com a hipótese da formação de ligações covalentes interfaciais. A contribuição das forças secundárias foi investigada a partir do modelo teórico vOCG, o qual mostrou que as proporções entre BTCA a AT também modulam as interações do tipo van de Waals e eletrostáticas.

A multiestruturação escalonada mostrou-se uma estratégia viável para a combinação de biopolímeros com propriedades distintas na forma de um material com potencial para ser aplicado como embalagens de alimentos. A integração de diferentes técnicas e materiais oriundos de fontes renováveis e naturais, além de ser interessante industrialmente, alinha-se com o modelo econômico emergente de economia circular. Os filmes multicamadas produzidos não exibiram as propriedades que foram objetivadas, entretanto, a metodologia aplicada mostrou-se de grande potencial para ser estendida a outros sistemas.

## 8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar a deposição da camada de zeína utilizando um solvente mais brando ou substituir a terceira camada por um outro polímero hidrofóbico, a fim de evitar a desestabilização da camada de caseína e aperfeiçoando as propriedades genéricas do sistema.
- Desenvolvimento de um filme multicamadas contendo quatro camadas, sendo as duas interiores produzidas por *casting* contínuo e as camadas externas por aspersão, as quais desempenhariam um papel de selagem do material.
- Fazer a incorporação de outros taninos que atuariam na hidrofobização do material.
- Acoplamento das técnicas de *casting* contínuo e deposição em série, o que permitiria a otimização da produção dos filmes.
- Expandir a combinação das técnicas para outros sistemas poliméricos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdullah, Cai, J., Hafeez, M. A., Wang, Q., Farooq, S., Huang, Q., Tian, W., & Xiao, J. (2022). Biopolymer-based functional films for packaging applications: A review. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1000116>

Ahmadzadeh, S., & Khaneghah, A. M. (2020). Role of Green Polymers in Food Packaging. Em *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803581-8.10576-4>

Ajitha A.R., & Thomas, S. (2020). Introduction. Em *Compatibilization of Polymer Blends* (p. 1–29). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816006-0.00001-3>

Alavarse, A. C., Frachini, E. C. G., da Silva, R. L. C. G., Lima, V. H., Shavandi, A., & Petri, D. F. S. (2022a). Crosslinkers for polysaccharides and proteins: Synthesis conditions, mechanisms, and crosslinking efficiency, a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 202, 558–596. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.029>

Alavarse, A. C., Frachini, E. C. G., da Silva, R. L. C. G., Lima, V. H., Shavandi, A., & Petri, D. F. S. (2022b). Crosslinkers for polysaccharides and proteins: Synthesis conditions, mechanisms, and crosslinking efficiency, a review. Em *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 202, p. 558–596). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.029>

Alias, A. R., Wan, M. K., & Sarbon, N. M. (2022). Emerging materials and technologies of multi-layer film for food packaging application: A review. *Food Control*, 136, 108875. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108875>

Aytac, Z., Huang, R., Vaze, N., Xu, T., Eitzer, B. D., Krol, W., MacQueen, L. A., Chang, H., Bousfield, D. W., Chan-Park, M. B., Ng, K. W., Parker, K. K., White, J. C., & Demokritou, P. (2020). Development of Biodegradable and Antimicrobial Electrospun Zein Fibers for Food Packaging. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8(40), 15354–15365. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c05917>

Azeredo, H. M. C., Kontou-Vrettou, C., Moates, G. K., Wellner, N., Cross, K., Pereira, P. H. F., & Waldron, K. W. (2015). Wheat straw hemicellulose films as affected by citric acid. *Food Hydrocolloids*, *50*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.005>

Beikzadeh, S., Ghorbani, M., Shahbazi, N., Izadi, F., Pilevar, Z., & Mortazavian, A. M. (2020). The Effects of Novel Thermal and Nonthermal Technologies on the Properties of Edible Food Packaging. *Food Engineering Reviews*, *12*(3), 333–345. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09227-y>

Biranje, S. S., Sun, J., Cheng, L., Cheng, Y., Shi, Y., Yu, S., Jiao, H., Zhang, M., Lu, X., Han, W., Wang, Q., Zhang, Z., & Liu, J. (2022). Development of Cellulose Nanofibril/Casein-Based 3D Composite Hemostasis Scaffold for Potential Wound-Healing Application. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *14*(3), 3792–3808. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c21039>

Blanco, P. M., Achetoni, M. M., Garcés, J. L., Madurga, S., Mas, F., Baieli, M. F., & Narambuena, C. F. (2022). Adsorption of flexible proteins in the ‘wrong side’ of the isoelectric point: Casein macropeptide as a model system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *217*, 112617. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112617>

Bouchelaghem, S. (2022). Propolis characterization and antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*: A review. *Em Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 29, Número 4, p. 1936–1946). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.11.063>

Briassoulis, D., & Giannoulis, A. (2018). Evaluation of the functionality of bio-based food packaging films. *Polymer Testing*, *69*, 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2018.05.003>

Brzoska, N., Müller, M., Nasui, L., & Schmid, M. (2018). Effects of film constituents on packaging-relevant properties of sodium caseinate-based emulsion films. *Progress in Organic Coatings*, *114*(August 2017), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2017.10.016>

Butt, H.-J., Jaschke, M., & Ducker, W. (1995a). Measuring surface forces in aqueous electrolyte solution with the atomic force microscope. Em *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* (Vol. 38).

Butt, H.-J., Jaschke, M., & Ducker, W. (1995b). Measuring surface forces in aqueous electrolyte solution with the atomic force microscope. Em *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* (Vol. 38).

Cai, J., Xiao, J., Chen, X., & Liu, H. (2020). Essential oil loaded edible films prepared by continuous casting method: Effects of casting cycle and loading position on the release properties. *Food Packaging and Shelf Life*, 26. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100555>

Canevaloro, Sebastião V., J. (2006). *Ciência dos Polímeros* (2o ed). Artliber.

Capanema, N. S. V., Mansur, A. A. P., de Jesus, A. C., Carvalho, S. M., de Oliveira, L. C., & Mansur, H. S. (2018). Superabsorbent crosslinked carboxymethyl cellulose-PEG hydrogels for potential wound dressing applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 1218–1234. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.124>

Cerqueira, M. A., Torres-Giner, S., & Lagaron, J. M. (2018). Nanostructured multilayer films. Em *Nanomaterials for Food Packaging: Materials, Processing Technologies, and Safety Issues* (p. 147–171). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51271-8.00006-1>

Chandrasekaran, N., Dimartino, S., & Fee, C. J. (2013). Study of the adsorption of proteins on stainless steel surfaces using QCM-D. *Chemical Engineering Research and Design*, 91(9), 1674–1683. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.07.017>

Chen, C., Yang, H., Yang, X., & Ma, Q. (2022). Tannic acid: A crosslinker leading to versatile functional polymeric networks: A review. Em *RSC Advances* (Vol. 12, Número 13, p. 7689–7711). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d1ra07657d>

Chen, Q., Xu, S., Liu, Q., Masliyah, J., & Xu, Z. (2016). QCM-D study of nanoparticle interactions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 233, 94–114. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.10.004>

Chen, X., Cui, F., Zi, H., Zhou, Y., Liu, H., & Xiao, J. (2019a). Development and characterization of a hydroxypropyl starch/zein bilayer edible film. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 1175–1182. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.240>

Chen, X., Cui, F., Zi, H., Zhou, Y., Liu, H., & Xiao, J. (2019b). Development and characterization of a hydroxypropyl starch/zein bilayer edible film. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 1175–1182. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.240>

Chen, X., Cui, F., Zi, H., Zhou, Y., Liu, H., & Xiao, J. (2019c). Development and characterization of a hydroxypropyl starch/zein bilayer edible film. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 1175–1182. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.240>

Chen, Y., Li, Z., Yi, X., Kuang, H., Ding, B., Sun, W., & Luo, Y. (2020). Influence of carboxymethylcellulose on the interaction between ovalbumin and tannic acid via noncovalent bonds and its effects on emulsifying properties. *LWT*, 118, 108778. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108778>

da Silva, C. E. P., de Oliveira, M. A. S., Simas, F. F., & Riegel-Vidotti, I. C. (2020). Physical chemical study of zein and arabinogalactans or glucuronomannans polyelectrolyte complexes and their film-forming properties. *Food Hydrocolloids*, 100. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105394>

Daristotle, J. L., Behrens, A. M., Sandler, A. D., & Kofinas, P. (2016). A Review of the Fundamental Principles and Applications of Solution Blow Spinning. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(51), 34951–34963. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b12994>

de Melo Fiori, A. P. S., Camani, P. H., dos Santos Rosa, D., & Carastan, D. J. (2019). Combined effects of clay minerals and polyethylene glycol in the mechanical and water barrier properties of carboxymethylcellulose films. *Industrial*

*Crops and Products*, 140(December 2018), 111644.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111644>

Della Volpe, C., Maniglio, D., Brugnara, M., Siboni, S., & Morra, M. (2004). The solid surface free energy calculation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 271(2), 434–453. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2003.09.049>

Demay, Y., & Agassant, J. F. (2021). The Polymer Film Casting Process – An Overview. *International Polymer Processing*, 36(3), 264–275. <https://doi.org/10.1515/ipp-2020-4061>

Demitri, C., Del Sole, R., Scalera, F., Sannino, A., Vasapollo, G., Maffezzoli, A., Ambrosio, L., & Nicolais, L. (2008). Novel superabsorbent cellulose-based hydrogels crosslinked with citric acid. *Journal of Applied Polymer Science*, 110(4), 2453–2460. <https://doi.org/10.1002/app.28660>

Derjaguin, B. V. (1934). Friction and adhesion. IV. The theory of adhesion of small particles. *Kolloid Zeits*, 69, 155–164.

Ding, L., Huang, Y., Cai, X. X., & Wang, S. (2019). Impact of pH, ionic strength and chitosan charge density on chitosan/casein complexation and phase behavior. *Carbohydrate Polymers*, 208, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.015>

el Omari, H., Ablouh, E., Brouillette, F., Taourirte, M., & Belfkira, A. (2019). New method for determining paper surface energy per contact angle. *Cellulose*, 26(17), 9295–9309. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02695-4>

Eliasson, A., Hedenqvist, M., Brolin, A., Wågberg, L., & Malmström, E. (2023). Highly Ductile Cellulose-Rich Papers Obtained by Ultrasonication-Assisted Incorporation of Low Molecular Weight Plasticizers. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 11(24), 8836–8846. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c07583>

Esteghlal, S., Niakousari, M., & Hosseini, S. M. H. (2018). Physical and mechanical properties of gelatin-CMC composite films under the influence of

electrostatic interactions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.079>

Faibish, R. S., Yoshida, W., & Cohen, Y. (2002). Contact Angle Study on Polymer-Grafted Silicon Wafers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 256(2), 341–350. <https://doi.org/10.1006/jcis.2002.8612>

Feng, X., Xiao, Z., Sui, S., Wang, Q., & Xie, Y. (2014). Esterification of wood with citric acid: The catalytic effects of sodium hypophosphite (SHP). *Holzforschung*, 68(4), 427–433. <https://doi.org/10.1515/hf-2013-0122>

Garcia, P. S., Grossmann, M. V. E., Shirai, M. A., Lazaretti, M. M., Yamashita, F., Muller, C. M. O., & Mali, S. (2014). Improving action of citric acid as compatibiliser in starch/polyester blown films. *Industrial Crops and Products*, 52, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.001>

Ghorpade, V. S., Yadav, A. V., & Dias, R. J. (2017). Citric acid crosslinked  $\beta$ -cyclodextrin/carboxymethylcellulose hydrogel films for controlled delivery of poorly soluble drugs. *Carbohydrate Polymers*, 164, 339–348. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.005>

Gianazza, E., Viglienghi, V., Righetti, P. G., Salamini, F., & Soave, C. (1977). Amino acid composition of zein molecular components. *Phytochemistry*, 16(3), 315–317. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(77\)80054-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(77)80054-X)

Gillingham, E. L., Lewis, D. M., & Voncina, B. (1999). An FTIR Study of Anhydride Formation on Heating Butane Tetracarboxylic Acid in the Presence of Various Catalysts. *Textile Research Journal*, 69(12), 949–955. <https://doi.org/10.1177/004051759906901211>

Grzebieniarz, W., Biswas, D., Roy, S., & Jamróz, E. (2023). Advances in biopolymer-based multi-layer film preparations and food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 35, 101033. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2023.101033>

Guo, J., Zhu, S., Lv, P., Huang, X., & Pang, J. (2022). Physicochemical dynamic changes and differences of  $\kappa$ -carrageenan in different vehicles (aqueous and

casein solution) during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Hydrocolloids*, 129, 107553. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107553>

Guo, Y., Bao, Y., Sun, K., Chang, C., & Liu, W. (2021). Effects of covalent interactions and gel characteristics on soy protein-tannic acid conjugates prepared under alkaline conditions. *Food Hydrocolloids*, 112, 106293. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106293>

Guzman-Puyol, S., Benítez, J. J., & Heredia-Guerrero, J. A. (2022). Transparency of polymeric food packaging materials. *Food Research International*, 161, 111792. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111792>

Hammam, A. R. A., Martínez-Monteagudo, S. I., & Metzger, L. E. (2021). Progress in micellar casein concentrate: Production and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(5), 4426–4449. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12795>

He, L., Liang, H., Lin, L., Shah, B. R., Li, Y., Chen, Y., & Li, B. (2015). Green-step assembly of low density lipoprotein/sodium carboxymethyl cellulose nanogels for facile loading and pH-dependent release of doxorubicin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 126, 288–296. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.12.024>

Heinze, T., el Seoud, O. A., & Koschella, A. (2018). *Cellulose Derivatives*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-73168-1>

Holt, C. (2016). Casein and casein micelle structures, functions and diversity in 20 species. *International Dairy Journal*, 60, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.01.004>

Holt, C., Carver, J. A., Ecroyd, H., & Thorn, D. C. (2013). Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods. *Journal of Dairy Science*, 96(10), 6127–6146. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6831>

Huang, Q., Lee, Y. Y., Wang, Y., & Qiu, C. (2023). Structural characterization, interfacial and emulsifying properties of soy protein hydrolysate-tannic acid

complexes. *Food Hydrocolloids*, 137, 108415.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108415>

Irfan, M., Rabel, S., Bukhtar, Q., Qadir, M. I., Jabeen, F., & Khan, A. (2016). Orally disintegrating films: A modern expansion in drug delivery system. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(5), 537–546.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.02.024>

Jamróz, E., Tkaczewska, J., Zając, M., Guzik, P., Juszczak, L., Kawecka, A., Turek, K., Zimowska, M., & Wojdyło, A. (2022). Utilisation of soybean post-production waste in single- and double-layered films based on furcellaran to obtain packaging materials for food products prone to oxidation. *Food Chemistry*, 387, 132883. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132883>

Jia, C., Cao, D., Ji, S., Zhang, X., & Muhoza, B. (2020). Tannic acid-assisted cross-linked nanoparticles as a delivery system of eugenol: The characterization, thermal degradation and antioxidant properties. *Food Hydrocolloids*, 104. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105717>

Jridi, M., Abdelhedi, O., Zouari, N., Fakhfakh, N., & Nasri, M. (2019). Development and characterization of grey triggerfish gelatin/agar bilayer and blend films containing vine leaves bioactive compounds. *Food Hydrocolloids*, 89, 370–378. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.039>

Juncu, G., Stoica-Guzun, A., Stroescu, M., Isopencu, G., & Jinga, S. I. (2016). Drug release kinetics from carboxymethylcellulose-bacterial cellulose composite films. *International Journal of Pharmaceutics*, 510(2), 485–492. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.11.053>

Kaftan, O., Tumbiolo, S., Dubreuil, F., Auzély-Velty, R., Fery, A., & Papastavrou, G. (2011). Probing multivalent host-guest interactions between modified polymer layers by direct force measurement. *Journal of Physical Chemistry B*, 115(24), 7726–7735. <https://doi.org/10.1021/jp110939c>

Khalifa, I., Lorenzo, J. M., Bangar, S. P., Morsy, O. M., Nawaz, A., Walayat, N., & Sobhy, R. (2022). Effect of the non-covalent and covalent interactions between

proteins and mono- or di-glucoside anthocyanins on  $\beta$ -lactoglobulin-digestibility. *Food Hydrocolloids*, 133, 107952. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107952>

Kim, S., Sessa, D. J., & Lawton, J. W. (2004). Characterization of zein modified with a mild cross-linking agent. *Industrial Crops and Products*, 20(3), 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2003.10.013>

La Fuente Arias, C. I., Kubo, M. T. K., Tadini, C. C., & Augusto, P. E. D. (2021). Bio-based multilayer films: A review of the principal methods of production and challenges. Em *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1973955>

La Fuente Arias, C. I., Kubo, M. T. K., Tadini, C. C., & Augusto, P. E. D. (2023). Bio-based multilayer films: A review of the principal methods of production and challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(14), 2260–2276. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1973955>

Lefebvre, J., & Gray, D. G. (2005). AFM of adsorbed polyelectrolytes on cellulose I surfaces spin-coated on silicon wafers. Em *Cellulose* (Vol. 12, Número 2, p. 127–134). <https://doi.org/10.1007/s10570-004-1574-0>

Leite, L. S. F., Ferreira, C. M., Corrêa, A. C., Moreira, F. K. V., & Mattoso, L. H. C. (2020). Scaled-up production of gelatin-cellulose nanocrystal bionanocomposite films by continuous casting. *Carbohydrate Polymers*, 238. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116198>

Leite, L. S. F., Moreira, F. K. V., Mattoso, L. H. C., & Bras, J. (2021a). Electrostatic interactions regulate the physical properties of gelatin-cellulose nanocrystals nanocomposite films intended for biodegradable packaging. *Food Hydrocolloids*, 113. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106424>

Leite, L. S. F., Moreira, F. K. V., Mattoso, L. H. C., & Bras, J. (2021b). Electrostatic interactions regulate the physical properties of gelatin-cellulose nanocrystals nanocomposite films intended for biodegradable packaging. *Food Hydrocolloids*, 113. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106424>

Li, H., Wang, T., Hu, Y., Wu, J., & Van der Meeren, P. (2022). Designing delivery systems for functional ingredients by protein/polysaccharide interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 119, 272–287. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.007>

Li, N., & Zhong, Q. (2020). Stable casein micelle dispersions at pH 4.5 enabled by propylene glycol alginate following a pH-cycle treatment. *Carbohydrate Polymers*, 233, 115834. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115834>

Li, S., Wang, X., Guo, Y., Hu, J., Lin, S., Tu, Y., Chen, L., Ni, Y., & Huang, L. (2022). Recent advances on cellulose-based nanofiltration membranes and their applications in drinking water purification: A review. *Journal of Cleaner Production*, 333, 130171. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.130171>

Li, Y. S., Meng, X. Y., Zhou, Y., Zhang, Y. Y., Meng, X. M., Yang, L., Hu, P., Lu, S. Y., Ren, H. L., Liu, Z. S., & Wang, X. R. (2015). Magnetic bead and gold nanoparticle probes based immunoassay for  $\beta$ -casein detection in bovine milk samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 66, 559–564. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.025>

Lin, O. H., Kumar, R. N., Rozman, H. D., Azemi, M., & Noor, M. (2005). Grafting of sodium carboxymethylcellulose (CMC) with glycidyl methacrylate and development of UV curable coatings from CMC-g-GMA induced by cationic photoinitiators. *Carbohydrate Polymers*, 59(1), 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.08.027>

López De Dicastillo, C., Rodríguez, F., Guarda, A., & Galotto, M. J. (2016). Antioxidant films based on cross-linked methyl cellulose and native Chilean berry for food packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, 136, 1052–1060. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.013>

McHUGH, T. H., AVENA-BUSTILLOS, R., & KROCHTA, J. M. (1993). Hydrophilic Edible Films: Modified Procedure for Water Vapor Permeability and Explanation of Thickness Effects. *Journal of Food Science*, 58(4), 899–903. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb09387.x>

Medeiros, E. S., Glenn, G. M., Klamczynski, A. P., Orts, W. J., & Mattoso, L. H. C. (2009). Solution blow spinning: A new method to produce micro- and nanofibers from polymer solutions. *Journal of Applied Polymer Science*, *113*(4), 2322–2330. <https://doi.org/10.1002/app.30275>

Mikheeva, L. M., Grinberg, N. V., Grinberg, V. Ya., Khokhlov, A. R., & de Kruif, C. G. (2003). Thermodynamics of Micellization of Bovine  $\beta$ -Casein Studied by High-Sensitivity Differential Scanning Calorimetry. *Langmuir*, *19*(7), 2913–2921. <https://doi.org/10.1021/la026702e>

Missio, A. L., Mattos, B. D., Ferreira, D. de F., Magalhães, W. L. E., Bertuol, D. A., Gatto, D. A., Petutschnigg, A., & Tondi, G. (2018). Nanocellulose-tannin films: From trees to sustainable active packaging. *Journal of Cleaner Production*, *184*, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.02.205>

Missio, A. L., Mattos, B. D., Otoni, C. G., Gentil, M., Coldebella, R., Khakalo, A., Gatto, D. A., & Rojas, O. J. (2020a). Cogrounding Wood Fibers and Tannins: Surfactant Effects on the Interactions and Properties of Functional Films for Sustainable Packaging Materials. *Biomacromolecules*, *21*(5), 1865–1874. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01733>

Missio, A. L., Mattos, B. D., Otoni, C. G., Gentil, M., Coldebella, R., Khakalo, A., Gatto, D. A., & Rojas, O. J. (2020b). Cogrounding Wood Fibers and Tannins: Surfactant Effects on the Interactions and Properties of Functional Films for Sustainable Packaging Materials. *Biomacromolecules*, *21*(5), 1865–1874. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01733>

Mohsin, G. F., Schmitt, F. J., Kanzle, C., Epping, J. D., Buhrke, D., & Hornemann, A. (2020). Melanoidin formed from fructosylalanine contains more alanine than melanoidin formed from D-glucose with L-alanine. *Food Chemistry*, *305*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125459>

Moore, N. W., & Houston, J. E. (2010). The Pull-Off Force and the Work of Adhesion: New Challenges at the Nanoscale. *Journal of Adhesion Science and Technology*, *24*(15–16), 2531–2544. <https://doi.org/10.1163/016942410X508325>

Mouzakitis, C.-K., Sereti, V., Matsakidou, A., Kotsiou, K., Biliaderis, C. G., & Lazaridou, A. (2022). Physicochemical properties of zein-based edible films and coatings for extending wheat bread shelf life. *Food Hydrocolloids*, *132*, 107856. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107856>

Mozaffarzogh, M., Misaghi, A., Shahbazi, Y., & Kamkar, A. (2020). Evaluation of probiotic carboxymethyl cellulose-sodium caseinate films and their application in extending shelf life quality of fresh trout fillets. *LWT*, *126*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109305>

Muhoza, B., Xia, S., & Zhang, X. (2019). Gelatin and high methyl pectin coacervates crosslinked with tannic acid: The characterization, rheological properties, and application for peppermint oil microencapsulation. *Food Hydrocolloids*, *97*, 105174. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105174>

Nascimento, D. M., Colombari, F. M., Focassio, B., Schleder, G. R., Costa, C. A. R., Biffe, C. A., Ling, L. Y., Gouveia, R. F., Strauss, M., Rocha, G. J. M., Leite, E., Fazzio, A., Capaz, R. B., Driemeier, C., & Bernardes, J. S. (2022). How lignin sticks to cellulose—insights from atomic force microscopy enhanced by machine-learning analysis and molecular dynamics simulations. *Nanoscale*, *14*(47), 17561–17570. <https://doi.org/10.1039/D2NR05541D>

Noreen, A., Sultana, S., Sultana, T., Tabasum, S., Zia, K. M., Muzammil, Z., Jabeen, M., Lodhi, A. Z., & Sultana, S. (2020). Natural polymers as constituents of bionanocomposites. In *Bionanocomposites*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816751-9.00003-9>

Nugroho, R. W. N., Harjumäki, R., Zhang, X., Lou, Y. R., Yliperttula, M., Valle-Delgado, J. J., & Österberg, M. (2019a). Quantifying the interactions between biomimetic biomaterials – collagen I, collagen IV, laminin 521 and cellulose nanofibrils – by colloidal probe microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *173*, 571–580. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.09.073>

Nugroho, R. W. N., Harjumäki, R., Zhang, X., Lou, Y. R., Yliperttula, M., Valle-Delgado, J. J., & Österberg, M. (2019b). Quantifying the interactions between biomimetic biomaterials – collagen I, collagen IV, laminin 521 and cellulose

nanofibrils – by colloidal probe microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 173, 571–580. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.09.073>

Oliveira, J. E., Mattoso, L. H. C., Orts, W. J., & Medeiros, E. S. (2013a). 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. <https://doi.org/10.1155/2013/409572>

Oliveira, J. E., Mattoso, L. H. C., Orts, W. J., & Medeiros, E. S. (2013b). 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. <https://doi.org/10.1155/2013/409572>

Oliveira, J. E., Moraes, E. A., Costa, R. G. F., Afonso, A. S., Mattoso, L. H. C., Orts, W. J., & Medeiros, E. S. (2011). Nano and submicrometric fibers of poly(D, L-lactide) obtained by solution blow spinning: Process and solution variables. *Journal of Applied Polymer Science*, 122(5), 3396–3405. <https://doi.org/10.1002/app.34410>

Ossio, F., Salinas, C., & Hernández, H. (2023). Circular economy in the built environment: A systematic literature review and definition of the circular construction concept. *Journal of Cleaner Production*, 414, 137738. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.137738>

Ostrowska-Czubenko, J., Pieróg, M., & Gierszewska-Drużyńska, M. (2013). Water state in chemically and physically crosslinked chitosan membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, 130(3), 1707–1715. <https://doi.org/10.1002/app.39357>

Otoni, C. (Org.). (2024). *Food Packaging Materials*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3613-8>

Otoni, C. G., Avena-Bustillos, R. J., Azeredo, H. M. C., Lorevice, M. v., Moura, M. R., Mattoso, L. H. C., & McHugh, T. H. (2017a). Recent Advances on Edible Films Based on Fruits and Vegetables—A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1151–1169. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12281>

Otoni, C. G., Avena-Bustillos, R. J., Azeredo, H. M. C., Lorevice, M. V., Moura, M. R., Mattoso, L. H. C., & McHugh, T. H. (2017b). Recent Advances on Edible Films Based on Fruits and Vegetables—A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *16*(5), 1151–1169. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12281>

Otoni, C. G., Azeredo, H. M. C., Mattos, B. D., Beaumont, M., Correa, D. S., & Rojas, O. J. (2021). The Food–Materials Nexus: Next Generation Bioplastics and Advanced Materials from Agri-Food Residues. Em *Advanced Materials* (Vol. 33, Número 43). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/adma.202102520>

Pacheco, M. S., Kano, G. E., Paulo, L. de A., Lopes, P. S., & de Moraes, M. A. (2020a). Silk fibroin/chitosan/alginate multilayer membranes as a system for controlled drug release in wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, *152*, 803–811. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.140>

Pacheco, M. S., Kano, G. E., Paulo, L. de A., Lopes, P. S., & de Moraes, M. A. (2020b). Silk fibroin/chitosan/alginate multilayer membranes as a system for controlled drug release in wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, *152*, 803–811. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.140>

Pang, L., Gao, Z., Feng, H., Wang, S., & Wang, Q. (2019). Cellulose based materials for controlled release formulations of agrochemicals: A review of modifications and applications. *Journal of Controlled Release*, *316*, 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.11.004>

Pasquier, E., Mattos, B. D., Koivula, H., Khakalo, A., Belgacem, M. N., Rojas, O. J., & Bras, J. (2022). Multilayers of Renewable Nanostructured Materials with High Oxygen and Water Vapor Barriers for Food Packaging. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *14*(26), 30236–30245. <https://doi.org/10.1021/acsmi.2c07579>

Peelman, N., Ragaert, P., de Meulenaer, B., Adons, D., Peeters, R., Cardon, L., van Impe, F., & Devlieghere, F. (2013). Application of bioplastics for food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, *32*(2), 128–141. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.06.003>

Picchio, M. L., Linck, Y. G., Monti, G. A., Gugliotta, L. M., Minari, R. J., & Alvarez Igarzabal, C. I. (2018a). Casein films crosslinked by tannic acid for food packaging applications. *Food Hydrocolloids*, *84*, 424–434. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.028>

Picchio, M. L., Linck, Y. G., Monti, G. A., Gugliotta, L. M., Minari, R. J., & Alvarez Igarzabal, C. I. (2018b). Casein films crosslinked by tannic acid for food packaging applications. *Food Hydrocolloids*, *84*, 424–434. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.028>

Piccinin, A. C. V., Coatrini-Soares, A., Franco, G. T., Bondancia, T. J., Coatrini-Soares, J., Oliveira, O. N., & Mattoso, L. H. C. (2024). Electronic tongue made of gelatin self-supporting films on printed electrodes to detect lactose. *Frontiers in Sensors*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fsens.2024.1401077>

Poggemann, L., Thelen, R., Meyer, J., & Dittler, A. (2023). Experimental investigation on the change of pull-off force between bulk particulate material and an elastic polymeric filter fiber. *Journal of Colloid and Interface Science*, *641*, 903–915. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.03.051>

Popescu, M.-C. (2017). Structure and sorption properties of CNC reinforced PVA films. *International Journal of Biological Macromolecules*, *101*, 783–790. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.168>

Ralston, J., Larson, I., Rutland, M. W., Feiler, A. A., & Kleijn, M. (2005a). Atomic force microscopy and direct surface force measurements (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, *77*(12), 2149–2170. <https://doi.org/10.1351/pac200577122149>

Ralston, J., Larson, I., Rutland, M. W., Feiler, A. A., & Kleijn, M. (2005b). Atomic force microscopy and direct surface force measurements (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, *77*(12), 2149–2170. <https://doi.org/10.1351/pac200577122149>

Raudino, M., Giambianco, N., Montis, C., Berti, D., Marletta, G., & Baglioni, P. (2017). Probing the Cleaning of Polymeric Coatings by Nanostructured Fluids: A

QCM-D Study. *Langmuir*, 33(23), 5675–5684.  
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00968>

Rehan, F., Ahemad, N., & Gupta, M. (2019). Casein nanomicelle as an emerging biomaterial—A comprehensive review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 179, 280–292. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.051>

Reid, M. S., Villalobos, M., & Cranston, E. D. (2016). Cellulose nanocrystal interactions probed by thin film swelling to predict dispersibility. *Nanoscale*, 8(24), 12247–12257. <https://doi.org/10.1039/c6nr01737a>

Ruhal, R., & Kataria, R. (2021). Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbiological Research*, 251, 126829. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126829>

Salem, A. M., Mohamed, A. R., Abdelghany, A. M., & Yassin, A. Y. (2022). Effect of polypyrrole on structural, optical and thermal properties of CMC-based blends for optoelectronic applications. *Optical Materials*, 134, 113128. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2022.113128>

Sarath, C. C., Shanks, R. A., & Thomas, S. (2014). Polymer Blends. Em *Nanostructured Polymer Blends* (p. 1–14). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3159-6.00001-8>

Satam, C. C., Irvin, C. W., Lang, A. W., Jallorina, J. C. R., Shofner, M. L., Reynolds, J. R., & Meredith, J. C. (2018). Spray-Coated Multilayer Cellulose Nanocrystal - Chitin Nanofiber Films for Barrier Applications. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6(8), 10637–10644. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b01536>

Seki, Y., Altinisik, A., Demircioğlu, B., & Tetik, C. (2014). Carboxymethylcellulose (CMC)–hydroxyethylcellulose (HEC) based hydrogels: synthesis and characterization. *Cellulose*, 21(3), 1689–1698. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0204-8>

Shen, L., Xu, H., Kong, L., & Yang, Y. (2015). Non-Toxic Crosslinking of Starch Using Polycarboxylic Acids: Kinetic Study and Quantitative Correlation of

Mechanical Properties and Crosslinking Degrees. *Journal of Polymers and the Environment*, 23(4), 588–594. <https://doi.org/10.1007/s10924-015-0738-3>

Sheokand, B., Vats, M., Kumar, A., Srivastava, C. M., Bahadur, I., & Pathak, S. R. (2023). Natural polymers used in the dressing materials for wound healing: Past, present and future. *Journal of Polymer Science*, 61(14), 1389–1414. <https://doi.org/10.1002/pol.20220734>

Shin, G. H., Lee, Y. H., Lee, J. S., Kim, Y. S., Choi, W. S., & Park, H. J. (2002). Preparation of plastic and biopolymer multilayer films by plasma source ion implantation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4608–4614. <https://doi.org/10.1021/jf020169r>

Silva, R. D., Pacheco, T. F., de Santi, A. D., Manarelli, F., Bozzo, B. R., Brienzo, M., Otoni, C. G., & Azeredo, H. M. C. (2024). From bulk banana peels to active materials: Slipping into bioplastic films with high UV-blocking and antioxidant properties. *Journal of Cleaner Production*, 438, 140709. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2024.140709>

Su, J. F., Huang, Z., Yuan, X. Y., Wang, X. Y., & Li, M. (2010). Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. *Carbohydrate Polymers*, 79(1), 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.035>

Sychev, D., Schubotz, S., Besford, Q. A., Fery, A., & Auernhammer, G. K. (2023). Critical analysis of adhesion work measurements from AFM-based techniques for soft contact. *Journal of Colloid and Interface Science*, 642, 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.03.139>

T. L. McMeekin, M. L. G. and N. J. H. (1949). Apparent Specific Volume of  $\alpha$ -Casein and  $\beta$ -Casein and the Relationship of Specific Volume to Amino Acid Composition. *Journal of the American Chemical Society*, 71(10), 3298–3300.

Takemoto, Y., Ajiro, H., & Akashi, M. (2015). Hydrogen-Bonded Multilayer Films Based on Poly(*N*-vinylamide) Derivatives and Tannic Acid. *Langmuir*, 31(24), 6863–6869. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00767>

Tan, J. Y. B., Yoon, B. K., Ma, G. J., Sut, T. N., Cho, N. J., & Jackman, J. A. (2020). Unraveling How Ethanol-Induced Conformational Changes Affect BSA Protein Adsorption onto Silica Surfaces. *Langmuir*, *36*(31), 9215–9224. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c01478>

Tian, Q., Lai, L., Zhou, Z., Mei, P., Lu, Q., Wang, Y., Xiang, D., & Liu, Y. (2019a). Interaction Mechanism of Different Surfactants with Casein: A Perspective on Bulk and Interfacial Phase Behavior. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(22), 6336–6349. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00969>

Tian, Q., Lai, L., Zhou, Z., Mei, P., Lu, Q., Wang, Y., Xiang, D., & Liu, Y. (2019b). Interaction Mechanism of Different Surfactants with Casein: A Perspective on Bulk and Interfacial Phase Behavior. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(22), 6336–6349. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00969>

van Oss, C. J. (2006). *Interfacial Forces in Aqueous Media*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420015768>

Velásquez, P., Skurtys, O., Enrione, J., & Osorio, F. (2011a). Evaluation of Surface Free Energy of Various Fruit Epicarps Using Acid-Base and Zisman Approaches. *Food Biophysics*, *6*(3), 349–358. <https://doi.org/10.1007/s11483-011-9209-0>

Velásquez, P., Skurtys, O., Enrione, J., & Osorio, F. (2011b). Evaluation of Surface Free Energy of Various Fruit Epicarps Using Acid-Base and Zisman Approaches. *Food Biophysics*, *6*(3), 349–358. <https://doi.org/10.1007/s11483-011-9209-0>

Vitorazi, L., Ould-Moussa, N., Sekar, S., Fresnais, J., Loh, W., Chapel, J. P., & Berret, J. F. (2014). Evidence of a two-step process and pathway dependency in the thermodynamics of poly(diallyldimethylammonium chloride)/poly(sodium acrylate) complexation. *Soft Matter*, *10*(47), 9496–9505. <https://doi.org/10.1039/c4sm01461h>

Vogl, U. S., Das, P. K., Weber, A. Z., Winter, M., Kostecki, R., & Lux, S. F. (2014). Mechanism of Interactions between CMC Binder and Si Single Crystal Facets. *Langmuir*, *30*(34), 10299–10307. <https://doi.org/10.1021/la501791q>

Walstra, P. (1999). Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*, 9(3–6), 189–192. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00059-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00059-X)

Wei, Z., & Huang, Q. (2019). Assembly of Protein–Polysaccharide Complexes for Delivery of Bioactive Ingredients: A Perspective Paper. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(5), 1344–1352. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06063>

Wusigale, Liang, L., & Luo, Y. (2020). Casein and pectin: Structures, interactions, and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 391–403. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.027>

Xia, C., Wang, W., Wang, L., Liu, H., & Xiao, J. (2019). Multilayer zein/gelatin films with tunable water barrier property and prolonged antioxidant activity. *Food Packaging and Shelf Life*, 19, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.12.004>

Xu, G., Liu, P., Pranantyo, D., Neoh, K.-G., Kang, E.-T., & Lay-Ming Teo, S. (2019). One-Step Anchoring of Tannic Acid-Scaffolded Bifunctional Coatings of Antifouling and Antimicrobial Polymer Brushes. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(1), 1786–1795. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b05789>

Xu, Y., Wei, Z., Xue, C., & Huang, Q. (2022). Assembly of zein–polyphenol conjugates via carbodiimide method: Evaluation of physicochemical and functional properties. *LWT*, 154. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112708>

Yuan, Y., Ma, M., Xu, Y., & Wang, D. (2022). Surface coating of zein nanoparticles to improve the application of bioactive compounds: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 120, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.025>

Zaleska, H., Tomasik, P., & Lii, C.-Y. ([s.d.]). *Formation of carboxymethyl cellulose±casein complexes by electrosynthesis*. [www.elsevier.com/locate/foodhyd](http://www.elsevier.com/locate/foodhyd)

Zeng, G., Duan, Y., Besenbacher, F., & Dong, M. (2012). Nanomechanics of Amyloid Materials Studied by Atomic Force Microscopy. In *Atomic Force Microscopy Investigations into Biology - From Cell to Protein*. InTech. <https://doi.org/10.5772/36342>

Zennifer, A., Senthilvelan, P., Sethuraman, S., & Sundaramurthi, D. (2021). Key advances of carboxymethyl cellulose in tissue engineering & 3D bioprinting applications. *Carbohydrate Polymers*, 256, 117561. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117561>

Zha, F., Chen, W., Zhang, L., & Yu, D. (2020). Electrospun natural polymer and its composite nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 31(4), 519–548. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1697170>

Zhang, W., Roy, S., Ezati, P., Yang, D.-P., & Rhim, J.-W. (2023). Tannic acid: A green crosslinker for biopolymer-based food packaging films. *Trends in Food Science & Technology*, 136, 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.04.004>

Zhang, W., Shu, C., Chen, Q., Cao, J., & Jiang, W. (2019). The multi-layer film system improved the release and retention properties of cinnamon essential oil and its application as coating in inhibition to penicillium expansion of apple fruit. *Food Chemistry*, 299, 125109. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125109>

Zhang, Y., Cui, L., Che, X., Zhang, H., Shi, N., Li, C., Chen, Y., & Kong, W. (2015a). Zein-based films and their usage for controlled delivery: Origin, classes and current landscape. *Em Journal of Controlled Release* (Vol. 206, p. 206–219). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.030>

Zhang, Y., Cui, L., Che, X., Zhang, H., Shi, N., Li, C., Chen, Y., & Kong, W. (2015b). Zein-based films and their usage for controlled delivery: Origin, classes and current landscape. *Journal of Controlled Release*, 206, 206–219. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.030>

Zhang, Z.-Y., Sun, Y., Zheng, Y.-D., He, W., Yang, Y.-Y., Xie, Y.-J., Feng, Z.-X., & Qiao, K. (2020). A biocompatible bacterial cellulose/tannic acid composite with antibacterial and anti-biofilm activities for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, 106, 110249. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110249>

Zheng, T., Yu, X., & Pilla, S. (2017). Mechanical and moisture sensitivity of fully bio-based dialdehyde carboxymethyl cellulose cross-linked soy protein isolate

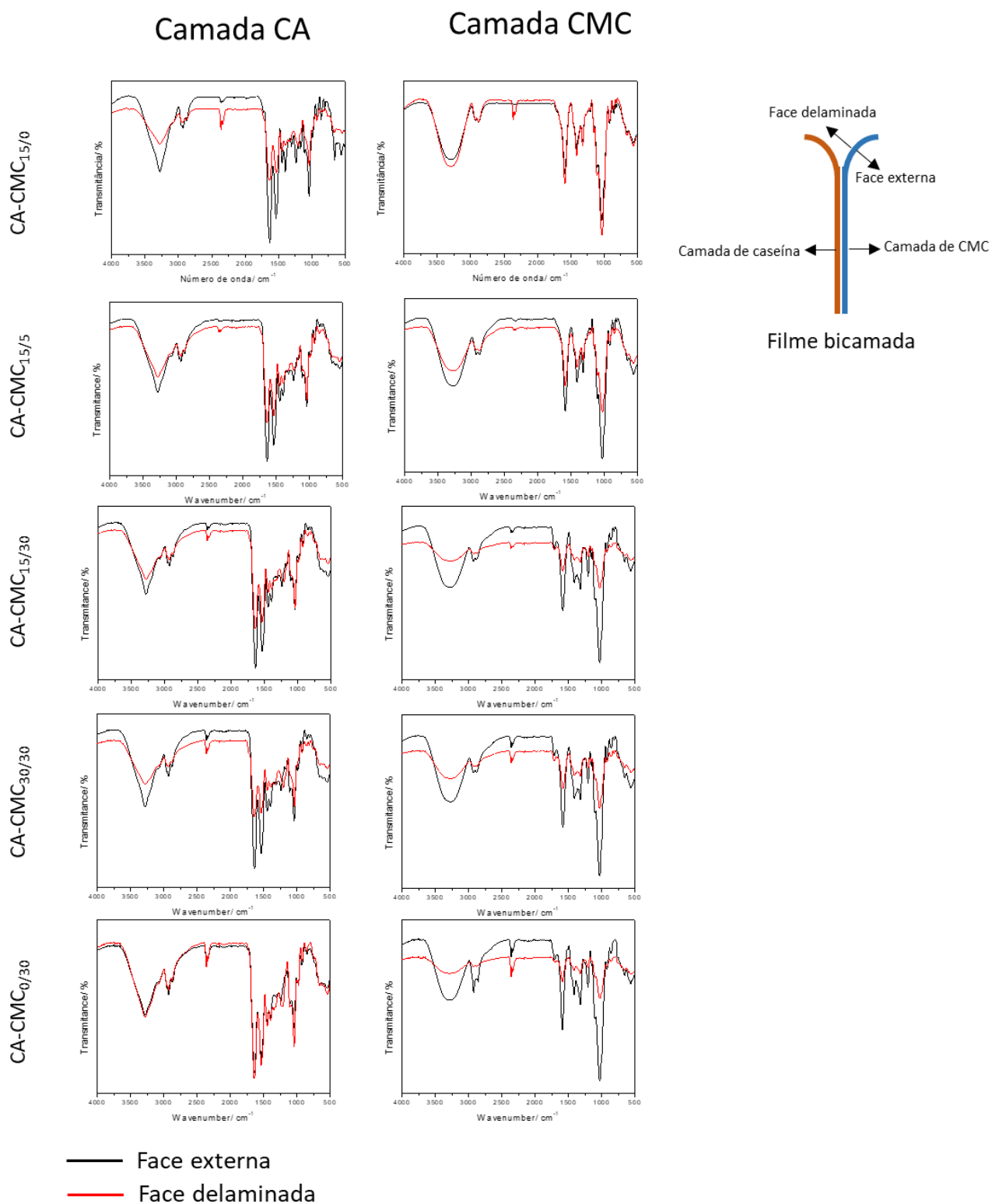
films. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1333–1340.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.011>

Zhong, Q., & Jin, M. (2009). Zein nanoparticles produced by liquid–liquid dispersion. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2380–2387.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.06.015>

Zhou, X., Yu, X., Xie, F., Fan, Y., Xu, X., Qi, J., Xiong, G., Gao, X., & Zhang, F. (2021). pH-responsive double-layer indicator films based on konjac glucomannan/camellia oil and carrageenan/anthocyanin/curcumin for monitoring meat freshness. *Food Hydrocolloids*, 118, 106695.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106695>

Zhu, J., Wu, H., & Sun, Q. (2019). Preparation of crosslinked active bilayer film based on chitosan and alginate for regulating ascorbate-glutathione cycle of postharvest cherry tomato (*Lycopersicon esculentum*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 130, 584–594.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.006>

## APÊNDICE A



**FIGURA A1.** Espectros FTIR das faces delaminadas e externas das camadas de caseína e CMC para as diferentes composições dos filmes bicamadas

## APÊNDICE B

**TABELA B1.** Valores das tensões superficiais totais ( $\gamma_s$ ), componentes Liftshitz-van der Waals ( $\gamma_{sv}^{LW}$ ), componentes polares ( $\gamma_{sv}^{AB}$ ), componentes da base de Lewis ( $\gamma_s^-$ ) e componentes de ácido de Lewis ( $\gamma_s^+$ ) para os filmes monocamadas de caseína, zeína e CMC em suas diferentes composições.

Filmes	$\gamma_s$	$\gamma_{sv}^{LW}$	$\gamma_{sv}^{AB}$	$\gamma_s^+$	$\gamma_s^-$
CA	34,1 ± 2,9	29,9 ± 0,7	4,2 ± 2,2	8,9 ± 3,5	0,5 ± 0,3
CMC	71,1 ± 2,0	35,5 ± 0,3	35,6 ± 1,7	72,3 ± 1,9	4,4 ± 0,3
CMC <sub>15/0</sub>	146,0 ± 14,4	44,7 ± 1,0	101,3 ± 13,4	99,6 ± 17,3	25,8 ± 2,4
CMC <sub>15/5</sub>	84,4 ± 5,8	34,7 ± 0,6	49,7 ± 5,3	106,4 ± 7,0	5,8 ± 0,8
CMC <sub>15/30</sub>	92,9 ± 6,6	36,6 ± 0,6	56,3 ± 6,0	102,5 ± 4,9	7,8 ± 1,3
CMC <sub>30/30</sub>	78,0 ± 11,2	34,3 ± 1,4	43,7 ± 9,8	112,0 ± 7,2	4,4 ± 1,5
CMC <sub>0/30</sub>	81,2 ± 7,1	32,2 ± 2,0	49,0 ± 5,2	120,0 ± 1,0	5,1 ± 1,1
ZN	36,0 ± 5,1	10,4 ± 4,7	25,6 ± 9,9	27,1 ± 8,0	9,1 ± 5,5
ZN <sub>AT</sub>	37,9 ± 4,4	15,1 ± 4,6	22,8 ± 6,2	22,6 ± 13,8	10,9 ± 6,5

**TABELA B2.** Valores calculados dos trabalhos totais de adesão ( $W_a$ ) e de suas componentes apolares ( $W_a^{LW}$ ) e polares ( $W_a^{AB}$ ) para os filmes de bicamada.

Combinações	$W_a^{AB}$	$W_a^{LW}$	$W_a$
CA/CA	8,3 ± 4,4	59,9 ± 1,5	68,2 ± 5,8
CA/CMC	23,7 ± 6,6	65,2 ± 1,0	88,9 ± 7,7
CA/CMC <sub>15/0</sub>	43,4 ± 12,6	73,2 ± 1,5	116,6 ± 14,1
CA/CMC <sub>15/5</sub>	28,2 ± 7,5	64,4 ± 0,8	92,6 ± 8,3
CA/CMC <sub>15/30</sub>	29,3 ± 5,5	66,2 ± 0,3	95,5 ± 5,8
CA/CMC <sub>30/30</sub>	26,4 ± 9,4	64,1 ± 1,8	90,4 ± 11,2
CA/CMC <sub>0/30</sub>	27,5 ± 6,6	62,1 ± 1,6	89,5 ± 6,4
CA/ZN	24,4 ± 9,6	34,3 ± 7,5	58,7 ± 6,0
CA/ZN <sub>AT</sub>	22,8 ± 3,3	42,0 ± 6,9	64,8 ± 5,8

## APÊNDICE C

**TABELA C1.** Valores das propriedades mecânicas dos filmes monocamadas, bicamadas e multicamadas.

<i>Filmes</i>	$\sigma$ / MPa	$\epsilon$ / %	<i>E</i> / Gpa	<i>Tensão máxima</i> ( <i>rasgo</i> )/N.mm <sup>2</sup>	<i>Espessura</i> / mm	<i>Força de adesão</i> / N
CA	8,9 ± 0,7	24,8 ± 9,2	2,2 ± 0,7	9,1 ± 2	0,038	-
CMC	38,6 ± 3,5	2,7 ± 0,4	15,6 ± 6,3	-	0,030	-
CMC <sub>15/0</sub>	24,6 ± 4,4	1,2 ± 0,5	15,8 ± 2,3	0,7 ± 0,1	0,037	-
CMC <sub>15/5</sub>	19,8 ± 1,1	6,7 ± 2,7	16,3 ± 2,8	6,2 ± 0,7	0,040	-
CMC <sub>15/30</sub>	19,9 ± 0,8	2,5 ± 0,9	9,5 ± 0,3	6,2 ± 3,8	0,046	-
CMC <sub>30/30</sub>	24,0 ± 6,0	3,5 ± 0,9	10,3 ± 0,1	-	0,030	-
CMC <sub>0/30</sub>	18,9 ± 1,2	1,1 ± 0,4	15,5 ± 2,5	-	0,039	-
CA-CMC <sub>15/0</sub>	19,1 ± 2,0	5,6 ± 0,7	7,4 ± 1,7	6,5 ± 0,9	0,086	0,060 ± 0,02
CA-CMC <sub>15/5</sub>	12,2 ± 5	7,5 ± 2,2	5,0 ± 1,6	5,5 ± 1,9	0,126	0,16 ± 0,04
CA-CMC <sub>15/30</sub>	19,2 ± 4,3	2,3 ± 0,3	9,2 ± 1,6	7,4 ± 1,8	0,119	0,14 ± 0,03
CA-CMC <sub>30/30</sub>	13,2 ± 1,9	4,4 ± 1,1	0,5 ± 0,04	-	0,070	-
CA-CMC <sub>0/30</sub>	16,1 ± 2,4	8,0 ± 1,9	0,6 ± 0,07	-	0,110	0,09 ± 0,02
ZN <sub>AT</sub> -CA-CMC <sub>15/5</sub>	1,9 ± 0,4	1,8 ± 0,6	13,2 ± 1,8	2,0 ± 1,5	0,163	-
ZN <sub>AT</sub> -CA-CMC <sub>15/30</sub>	1,2 ± 0,2	3,8 ± 1,1	6,0 ± 0,6	1,0 ± 0,1	0,193	-

**TABELA C2.** Valores das propriedades de afinidade com a água dos filmes monocamadas, bicamadas e multicamadas.

<i>Filmes</i>	<i>PVA (face CA)/ 10<sup>-6</sup>.m.h<sup>-1</sup>.Pa<sup>-1</sup></i>	<i>PVA (face CMC)/ 10<sup>-6</sup>.m.h<sup>-1</sup>.Pa<sup>-1</sup></i>	<i>Grau de intumescimento/ %24 h</i>	<i>Grau de solubilidade/ %</i>
CA	0,62 ± 0,035	-	3 ± 0,4	100 ± 0
CMC	-	0,4 ± 0,004	50 ± 1	100 ± 0
CMC <sub>15/0</sub>	-	0,4 ± 0,02	32 ± 2	49 ± 2
CMC <sub>15/5</sub>	-	0,1 ± 0,005	6 ± 0,3	55 ± 5
CMC <sub>15/30</sub>	-	0,1 ± 0,001	6 ± 0,3	62 ± 7
CMC <sub>30/30</sub>	-	0,3 ± 0,003	3 ± 0,2	59 ± 2
CMC <sub>0/30</sub>	-	0,1 ± 0,001	32 ± 1	100 ± 0
CA-CMC <sub>15/0</sub>	2,7 ± 0,1	1,8 ± 0,2	38,5 ± 0,6	100 ± 0
CA-CMC <sub>15/5</sub>	1,3 ± 0,2	1,6 ± 0,08	8,7 ± 0,2	100 ± 0
CA-CMC <sub>15/30</sub>	2,3 ± 0,05	1,9 ± 0,1	9,9 ± 0,3	94 ± 6
CA-CMC <sub>30/30</sub>	1,5 ± 0,09	1,5 ± 0,09	7,1 ± 0,1	39 ± 2
CA-CMC <sub>0/30</sub>	2,5 ± 0,04	2,5 ± 0,2	11,0 ± 0,3	73 ± 0,6
ZN <sub>AT</sub> -CA-CMC <sub>15/5</sub>	4,7 ± 0,2	-	40 ± 0,8	-
ZN <sub>AT</sub> -CA-CMC <sub>15/30</sub>	3,8 ± 0,2	-	38 ± 2	-

## APÊNDICE D

### **Elucidação de um protocolo para a funcionalização de sondas coloidais com proteínas e produção de substratos para os experimentos de medidas de força de interação utilizando microscopia de força atômica (AFM).**

#### **D.1. Metodologia**

##### **D.1.1. Acoplamento de proteínas em nanopartículas de sílica carboxilada (Si-NPs)**

A funcionalização das Si-NPs com proteína foi realizada a fim de verificar a viabilidade da metodologia antes da modificação das sondas de AFM. Inicialmente, duas etapas de lavagem foram realizadas pela adição de 10 mL de tampão MES (pH 5) em 1 mL de Si-NPs ( $25 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), seguida de centrifugação (Thermo Scientific, Sorvall Legend XTR, Alemanha) a 10.000 rpm durante 15 min, descartando o sobrenadante. Em seguida, as Si-NPs foram ressuspensas em 2,5 mL de tampão MES (pH 5) com auxílio de um banho de ultrassom por 15 min. Na sequência, 75 mg de cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e NHS (N-hidroxisuccinimida) foram adicionados à suspensão e o sistema foi mantido sob agitação por 15 min à temperatura ambiente. As Si-NPs foram lavadas com a adição de 10 mL de tampão MES (pH 7) e centrifugadas, em duplicata, e posteriormente ressuspensas em 5 mL de tampão MES (pH 7) em banho de ultrassom por 15 min. Uma solução de 0,4% m/v de caseína em tampão MES (pH 7) foi adicionada à suspensão de Si-NPs, mantendo a mistura sob agitação por 4 h à temperatura ambiente. O sistema foi novamente lavado com 10 mL de água purificada e centrifugado para obter as nanopartículas modificadas, que foram dispersas em 5 mL de água utilizando banho de ultrassom por 15 min. Para os Si-NPs modificados com zeína, os mesmos passos foram seguidos, substituindo o tampão MES por uma solução de etanol 80%, devido à insolubilidade da zeína em água (Biranje et al., 2022; Kim et al., 2004; Morgan et al., 2021).

### D.1.2. Produção de substratos

Os substratos foram produzidos segundo a metodologia já descrita na **seção 5.2.20.2**.

### D.1.3. Imagens por AFM

As imagens e os valores de rugosidade dos substratos foram coletados utilizando um equipamento Jupiter XR AFM (Asylum Research AFM, Oxford Instruments, EUA), o qual foi operado em modo de contato intermitente (*tapping*) à temperatura ambiente. A raiz quadrada média da rugosidade ( $Rq$ ) foi calculada pelo próprio equipamento conforme a equação:

$$Rq = \sqrt{\frac{1}{m} \sum_{i=1}^m z_i^2}$$

onde  $m$  é o número total de pontos de medição na superfície e  $z_i$  é a altura da superfície no ponto  $i$ .

### D.1.4. Outras caracterizações

Foram realizadas análises de FTIR, potencial Zeta, espalhamento dinâmico de luz, MEV os quais tiveram os parâmetros já descritos na **seção 5.2**.

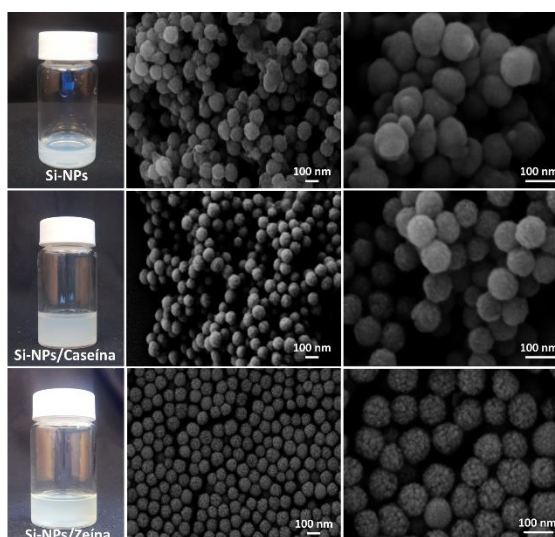
## D.2. Resultados

### D.2.1. Modificação das nanopartículas de sílica carboxiladas (Si-NPs) com proteína

O mecanismo da reação de acoplamento entre a Si-NPs carboxiladas e as proteínas foi relatada na **seção 6.3.1**.

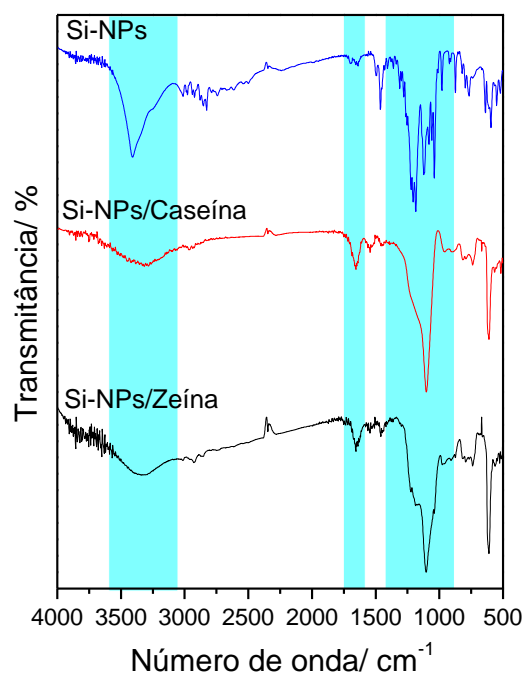
As mudanças na morfologia dos Si-NPs foram observadas por meio de imagens de MEV, apresentadas na **FIGURA D1**. As nanopartículas modificadas exibiram uma morfologia mais rugosa comparadas com as não modificadas, indicando a deposição de proteína na superfície das nanoestruturas, especialmente as Si-NPs/Zeína. As imagens foram obtidas após a etapa de lavagem com água,

demonstrando que a proteína permaneceu aderida às nanopartículas, o que é fundamental, considerando que as medidas de força são conduzidas em meio aquoso.



**FIGURA D.1.** *Imagens de MEV das nanopartículas de sílica carboxilada sem acoplamento proteico (Si-NPs), acopladas à caseína (Si-NPs/Caseína) e acopladas à zeína (Si-NPs/Zeína).*

A **FIGURA D.2** mostra os espectros de FTIR das Si-NPs antes e após o acoplamento com proteínas. Foram observadas alterações na forma e intensidade das bandas de vibração, especialmente nas regiões características das proteínas (destacadas na figura). Notou-se uma diminuição nas intensidades das bandas entre 3500 e 3000  $\text{cm}^{-1}$ , associadas ao estiramento das ligações -OH e -NH. Tal comportamento indica que os Si-NPs foram recobertos por proteínas devido à supressão das bandas de hidroxilas das nanopartículas. A banda em 1633  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao estiramento da ligação C=O das amidas I, apresentou aumento de intensidade para as Si-NPs modificadas. Mudanças no formato da banda em 1107  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento de ligações de álcoois secundários, indicam alterações na energia vibracional das ligações devido a mudanças no ambiente químico (Wu et al., 2020).



**FIGURA D.2.** Espectros de AFM das nanopartículas de sílica carboxiladas (Si-NPs) sem modificação e modificadas com caseína e zeína. Os espectros foram normalizados pela soma.

Na **TABELA D.1** estão mostrados os valores de potencial Zeta e tamanho hidrodinâmico dos polímeros em solução e das Si-NPs antes e após a modificação. A modificação com zeína causou uma redução no potencial Zeta de -26 mV para -2 mV devido à carga positiva da proteína. Entretanto, a modificação com caseína não exibiu alteração considerável nas cargas superficiais, pois esta apresenta caráter aniônico no pH avaliado. Em relação aos tamanhos hidrodinâmicos, houve um aumento significativo nas dimensões das Si-NPs acoplados às proteínas. A variação nos tamanhos hidrodinâmicos das nanoestruturas indicou a imobilização da proteína sobre as nanopartículas. No entanto, as alterações nas dimensões não foram proporcionais aos valores observados para os polímeros em solução, isto porque as cadeias livres em solução apresentam maior mobilidade e ocupam um maior espaço hidrodinâmico (Canevaloro, 2006).

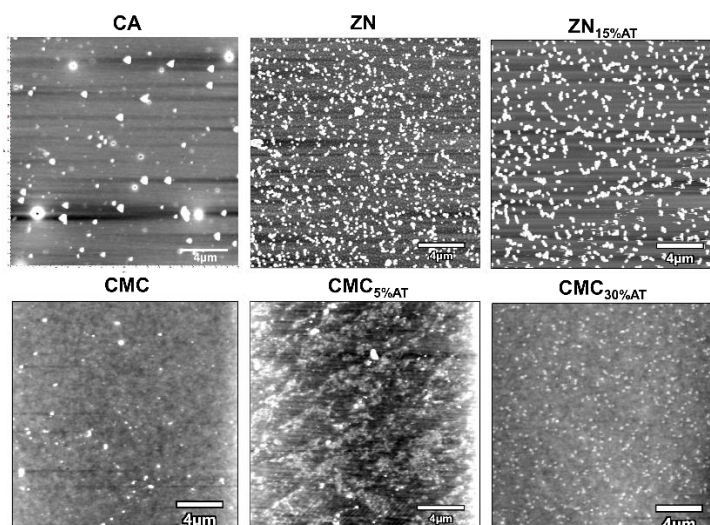
**TABELA D.1.** Valores do potencial Zeta e do tamanho hidrodinâmico das cadeias poliméricas e das nanopartículas de sílica carboxilada (Si-NPs) acopladas com caseína (Si-NPs/Caseína) e zeína (Si-NPs/Zeína).

	<b>Potencial Zeta/ mV</b>	<b>Tamanho hidrodinâmico/nm</b>
Caseína	-36 ± 1	135 ± 0.1
Zeína	3 ± 0.1	613 ± 3
Si-NPs	-26 ± 0.7	108 ± 0.8
Si-NPs/Caseína	-25 ± 0.5	569 ± 13
Si-NPs/Zeína	-2 ± 0.1	3053 ± 395

Considerando as análises realizadas, a metodologia aplicada na modificação de nanopartículas carboxiladas demonstrou ser viável para a funcionalização das sondas de AFM.

### **D.2.2. Produção dos substratos por *spin coating***

Os substratos de caseína (CA), zeína (ZN, ZN<sub>AT</sub>) e CMC (CMC<sub>15/0</sub>, CMC<sub>15/5</sub>, CMC<sub>15/30</sub>) foram produzidos pela deposição das soluções poliméricas sobre *wafers* de sílica por *spin coating*. As rugosidades quadráticas médias (*Rq*) das superfícies foram determinadas por imagens de AFM. Considerando que as análises de força foram conduzidas em meio aquoso salino, a estabilidade dos recobrimentos foi avaliada por medidas de espessura, antes e após 24 h de imersão em solução de NaCl, por elipsometria. A **FIGURA D.3** mostra as imagens de AFM dos substratos e a **TABELA D.2** contém os valores de *Rq* e das solubilidades dos recobrimentos.



**FIGURA D.3.** Imagens de AFM dos substratos de caseína (CA), zeína (ZN) e carboximetilcelulose (CMC) sem e com a incorporação de ácido tânico (AT).

**TABELA D.2.** Valores da rugosidade quadrática média ( $R_q$ ) obtidos a partir de imagens AFM ( $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ ) e as espessuras dos substratos antes e depois de serem mantidas por 24 h em meio aquoso contendo 10 mM de NaCl. Para os substratos de CMC, um pré-recobrimento com poli-L-lisina (PLL) foi realizado antes da deposição da solução polimérica. Diferentes índices indicam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dentro da mesma coluna.

Substrato	$R_q / \text{nm}$	Teste de solubilidade		
		Espessura $t=0 / \text{nm}$	Espessura $t=24\text{h} / \text{nm}$	Solubilidade/ %
CA	$4 \pm 1^a$	$21,3 \pm 0,04^a$	$18,3 \pm 0,2^a$	14
CMC	$0,5 \pm 0,1^b$	$22 \pm 2^{ab}$	$6,2 \pm 0,1^b$	72
CMC <sub>5%AT</sub>	$0,9 \pm 0,1^b$	$20 \pm 1^b$	$17,4 \pm 0,5^c$	14
CMC <sub>30%AT</sub>	$0,40 \pm 0,02^c$	$26 \pm 2^c$	$15 \pm 1^d$	44
ZN	$36 \pm 4^d$	$15,6 \pm 0,1^d$	$14,10 \pm 0,05^d$	10
ZN <sub>15%AT</sub>	$47 \pm 7^e$	$24,4 \pm 0,3^c$	$24,2 \pm 0,3^e$	1

A rugosidade dos substratos é um aspecto importante a ser considerar, pois influencia diretamente a precisão das medidas de força. Isso porque uma superfície

irregular pode resultar em um contato ineficaz com a sonda coloidal, levando a interpretações errôneas (Butt et al., 2005).

Os valores de rugosidade obtidos foram de 3,5 nm para os substratos de CA, menos de 1 nm para CMCs e cerca de 40 nm para ZNs. O diâmetro da sonda (10  $\mu\text{m}$ ) é cerca de 200 vezes maior que os valores de rugosidade o que, segundo a literatura, não deve afetar consideravelmente as medidas de força (Butt et al., 2005). Os testes de solubilidade mostraram que os substratos de CA e ZNs exibiram uma solubilidade abaixo de 20%, enquanto os substratos de CMCs apresentaram uma solubilidade de 75%, que foi reduzida com a incorporação do AT. Considerando que as medidas de força levam cerca de 2 h, estipulou-se que os substratos foram aquedados para as análises. Testes anteriores mostraram que, na ausência do pré-revestimento de PLL, a solubilidade dos recobrimentos de CMCs era próxima de 100%.