

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

**“APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS EM FILMES  
UTILIZADOS EM EMBALAGENS PARA ALIMENTOS”**

**Márcia Regina de Moura Aouada\***

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

**Orientador: Luiz Henrique Capparelli Mattoso**

**\* bolsista CNPq**

**São Carlos - SP  
2009**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

A638an

Aouada, Márcia Regina de Moura.

Aplicação de nanopartículas em filmes utilizados em embalagens para alimentos / Márcia Regina de Moura Aouada. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

119 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

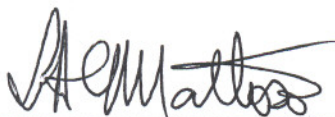
1. Físico-química. 2. Quitosana. 3. Filmes comestíveis. 4. Hidroxipropil metilcelulose. 5. Propriedades de barreira. I. Título.

CDD: 541.3 (20<sup>a</sup>)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Curso de Doutorado**

---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado da candidata **Marcia Regina de Moura Aouada** realizada em 30 de abril de 2009:*




---

Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso



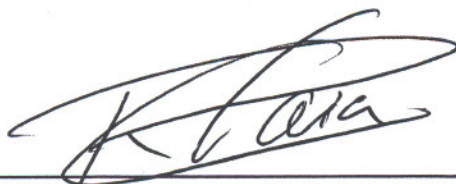
---

Dra. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo



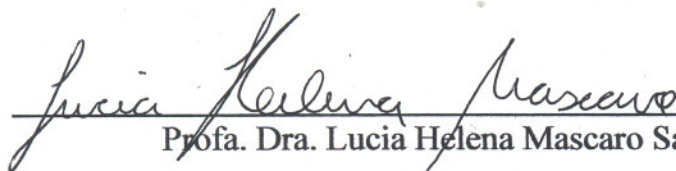
---

Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto



---

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria



---

Profa. Dra. Lucia Helena Mascaro Sales

*“Eu vos louvarei de todo o coração, Senhor, porque ouvistes as minhas palavras. Na presença dos anjos eu vos cantarei. Ante vosso santo templo prostrar-me-ei, e louvarei o vosso nome, pela vossa bondade e fidelidade, porque acima de todas as coisas, exaltastes o vosso nome e a vossa promessa. Quando vos invoquei, vós me respondestes; fizestes crescer a força de minha alma. Não de vos louvar, Senhor, todos os reis da terra, ao ouvirem as palavras de vossa boca. E celebrarão os desígnios do Senhor: Verdadeiramente, grande é a glória do Senhor. Sim, excelso é o Senhor, mas olha os pequeninos, enquanto seu olhar perscruta os soberbos. Em meio à adversidade vós me conservais a vida, estendeis a mão contra a cólera de meus inimigos; salva-me a vossa mão. O Senhor completará o que em meu auxílio começou. Senhor, eterna é a vossa bondade: não abandoneis a obra de vossas mãos.”*

*SALMO 137 - Agradecimento*

*Dedico esta tese aos meus pais, PAULO RAIMUNDO e OLIVIA TEREZINHA, pelos maiores e valiosos ensinamentos.*

*“Por ter vocês, nenhuma dificuldade é impedimento e toda alegria é completa”.*

*Dedico esta tese ao meu amor  
FAUZE AOUADA, pelo carinho,  
atenção, força e por sempre estar ao meu  
lado.*

## *AGRADECIMENTOS*

*A DEUS, pela vida e pela presença constante nela, que me dá força para ir cada vez mais longe.*

*Ao Dr. LUIZ MATTOSO, pela orientação, incentivo, confiança, amizade e por acreditar em mim na realização do trabalho. Meus sinceros agradecimentos.*

*Aos meus irmãos ANA PAULA e LUIZ GUSTAVO, pela amizade e confiança, por acreditarem em mim, me mostrando que posso alcançar tudo que desejo.*

*Aos pesquisadores Dr. JOHN M. KROCHTA, Dra. TARA H. MCHUGH e Dr. ROBERTO J. AVENA-BUSTILLOS do USDA, Estados Unidos, Albany-Califórnia, pela infra-estrutura disponibilizada, por compartilharem seus conhecimentos comigo e por todo auxílio e ensinamento dado a mim e ao trabalho.*

*A Dra. HENRIETTE MONTEIRO CORDEIRO DE AZEREDO da Embrapa-CNPAT, pela amizade e disponibilidade a mim dispensada em vários momentos.*

*A professora e Dra. LÚCIA HELENA MASCARO da UFSCar, pela atenção e incentivo dado na correção do projeto de Doutorado e relatórios.*

*Aos professores Dr. LEONARDO FRACETO e RENATA DE LIMA pela amizade, partilha de conhecimentos e estudo toxicológico das nanoestruturas.*

*Aos secretários, bibliotecários, telefonistas, pesquisadores, técnicos, etc, a todos os colegas da EMBRAPA-CNPEDIA sempre atenciosos e prestativos.*

*A EMBRAPA INSTRUMENTAÇÃO AGROPECUÁRIA, pela infra-estrutura e pelo excelente ambiente de trabalho.*

*Ao Departamento de Química, da UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, pela oportunidade dada na realização do Doutorado e apoio na pesquisa.*

*Aos amigos da EMBRAPA-CNPEDIA que de uma maneira ou de outra contribuíram para meu aprimoramento e fizeram parte do meu dia-a-dia.*

*Ao CNPq pelo apoio financeiro.*

## *PRODUÇÃO CIENTÍFICA*

### *Publicações em Periódicos:*

- **MOURA, Márcia R. de**; AOUADA, Fauze A.; AVENA-BUSTILLOS, Roberto J.; MCHUGH, Tara H.; KROCHTA, John M.; MATTOSO, Luiz Henrique C. “Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles”. *Journal of Food Engineering*, 92: 448-53; 2009.
  
- **MOURA, Márcia R. de**; AVENA-BUSTILLOS, Roberto J.; MCHUGH, Tara H.; KROCHTA, John M.; MATTOSO, Luiz Henrique C. “Properties of novel hydroxypropyl methylcellulose films containing chitosan nanoparticles”. *Journal of Food Science*, 73: 31-7; 2008.
  
- **MOURA, Márcia R. de**; AOUADA, Fauze A.; MATTOSO, Luiz Henrique C. “Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid”. *Journal of Colloid and Interface Science*, 321: 477-83; 2008.
  
- AZEREDO, Henriette M.C.; **MOURA, Márcia R. de**; OLSEN, Carl; DU, Wen-X.; MATTOSO, Luiz Henrique C.; AVENA-BUSTILLOS, Roberto J.; MCHUGH, Tara H. “Performance of mango puree edible films as affected by chitosan submicronparticles and high methoxyl pectin”. *International Journal of Food Science & Technology*, submetido.
  
- **MOURA, Márcia R. de**; AOUADA, Fauze A.; FRACETO, Leonardo F.; LIMA, Renata de; MATTOSO, Luiz Henrique C. “Evaluation of toxicity of chitosan nanoparticles”. *Journal of Colloid and Interface Science*, a ser submetido.



- **MOURA, Márcia R. de;** AZEREDO, Henriette M. C.; McHUGH, Tara H.; MATTOSO, Luiz Henrique C. “Thickness effects of hydroxypropyl methylcellulose films with chitosan nanoparticles on their properties”. *Journal of Food Engineering*, a ser submetido.

**Publicações em Anais e Participação em Congressos**

- **MOURA, M. R. de;** AOUADA, Fauze A.; CATTELAN, Alexandre J.; MOSCARDI, Flávio; MUNIZ, Edvani C.; VAZ, Carlos M. P.; MATTOSO, Luiz Henrique C. “Desenvolvimento de nanopartículas e hidrogéis para sistemas de liberação controlada de insumos agrícolas para a cultura de soja”. IV Congresso Brasileiro de Soja, 2006, Londrina-PR, Brasil.

- **MOURA, M. R. de;** AOUADA, Fauze A.; MATTOSO, Luiz Henrique C. “Preparation of chitosan with controlled nanoparticles sizes”. ISNAPOL, 2007, Gramado-RS, Brasil.

- **MOURA, M. R. de;** AOUADA, Fauze A.; MATTOSO, Luiz Henrique C. “Nanopartículas de quitosana para aplicação na síntese de filmes utilizados na indústria de alimentos”. 3º Workshop de Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, 2007, Londrina- PR, Brasil.

- **MOURA, M. R. de;** AVENA-BUSTILLOS, Roberto J.; MCHUGH, Tara H.; MATTOSO, Luiz Henrique C. “Mechanical properties of films from hydroxy propyl methyl cellulose and chitosan nanoparticles”. SBPMat, 2007, Natal-RN, Brasil.

- **MOURA, M. R. de;** AVENA-BUSTILLOS, Roberto J.; MCHUGH, Tara H.; KROCHTA, John M.; MATTOSO, Luiz Henrique C. “Barrier and

mechanical properties of hydroxypropyl methylcellulose edible films containing chitosan nanoparticles”. IFT Annual Meeting & Food Expo, 2008, New Orleans-LA, USA.

-AZEREDO, H. M. C.; **MOURA, M. R. de**; OLSEN, C.; MATTOSO, L.H.C.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; McHUGH, T. H. “Influence of chitosan submicronparticles and pectin on mechanical and barrier properties of mango puree edible films”. IFT Annual Meeting & Food Expo, 2008, New Orleans-LA, USA.

- **MOURA, M. R. de**; MCHUGH, Tara H.; KROCHTA, John M.; MATTOSO, Luiz Henrique C. “Influence of particle size on the thermal and water vapor barrier properties of HPMC films containing chitosan nanoparticles”. Nano 9<sup>th</sup>: International Conference on Nanostructured Materials, 2008, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

-AZEREDO, H. M. C.; **MOURA, M. R. de**; MATTOSO, Luiz Henrique C.; AVENA-BUSTILLOS, Roberto J.; MCHUGH, Tara H. “Propriedades mecânicas e de barreira de filmes nanocompósitos de quitosana e celulose microcristalina”. 18º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2008, Porto de Galinhas-PE, Brasil.

-**MOURA, Márcia R. de**; AOUADA, Fauze A.; AVENA-BUSTILLOS, Roberto J.; MCHUGH, Tara H.; KROCHTA, John M.; MATTOSO, Luiz Henrique C. “Preparação e caracterização mecânica de filmes comestíveis sintetizados a partir de hidroxipropil metilcelulose e nanopartículas”. 18º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2008, Porto de Galinhas-PE, Brasil.

## *LISTA DE ABREVIATURAS*

$\sigma$	Tensão
ANOVA	Análise de Variância
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
E	Módulo de Elasticidade
FT-IR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
GS	Grau de Substituição
HPMC	Hidroxipropil Metilcelulose
KCl	Cloreto de Potássio
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NPs	Nanopartículas
O <sub>2</sub> P	Permeabilidade ao Oxigênio
PMAA	Poli(ácido metacrílico)
QS	Quitosana
RH	Umidade Relativa
RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
Td	Temperatura de Degradação
TG	Termogravimetria
TPP	Tripolifosfato de Sódio
WVP	Inglês (Water Vapor Permeability) Permeabilidade ao Vapor de Água

## *Lista de Tabelas*

TABELA 2.1: Três diferentes tipos de nanopartículas QS-TPP formadas, com diferentes concentrações dos reagentes.....	29
TABELA 2.2: Valores de tamanho médio para as diferentes NPs de quitosana em pH = 4,0. ....	39
TABELA 2.3: Valores de $\Delta H$ para as diferentes NPs de quitosana.....	50
TABELA 2.4: Influência da concentração de QS e TPP no tamanho de partícula. ....	54
TABELA 2.5: Influência da concentração de QS e TPP nos valores de potencial zeta.....	55
TABELA 3.1: Valores de tamanho médio para as diferentes NPs de quitosana em pH = 4,0. ....	69
TABELA 3.2: Solubilidade em água dos filmes com e sem nanopartículas incluso. ....	71
TABELA 3.3: Tensão para filmes de HPMC com diferentes concentrações e tamanhos de partículas.....	75
TABELA 3.4: Efeito da formulação e tamanho de partículas no módulo de elasticidade, e % de alongação nos filmes de HPMC. ....	76
TABELA 3.5: Tensão para filmes de HPMC com diferentes concentrações e tamanhos de partículas, após sete meses de estocagem.....	77
TABELA 3.6: Permeabilidade ao oxigênio para filmes de HPMC contendo nanopartículas inclusas. ....	81
TABELA 3.7: Temperatura de degradação dos filmes de HPMC e HPMC com nanopartículas. ....	82
TABELA 4.1: Efeito da presença e tamanho de partículas, no módulo de elasticidade e alongação dos filmes contendo nanopartículas de QS-TPP.....	96
TABELA 4.2: Tensão para filmes de HPMC com diferentes concentrações e tamanhos de partículas, após sete meses de estocagem.....	96
TABELA 4.3: Efeito da presença e tamanho de partícula no WVP dos filmes de HPMC.....	97
TABELA 4.4: Temperaturas de degradação de filmes de HPMC sem e com nanopartículas. ...	101

## *Lista de Figuras*

FIGURA 1.1: Diferenciação estrutural entre nanoesferas e nanocápsulas.....	7
FIGURA 1.2: Representação esquemática da polimerização em molde tipo I. (POLOWINSKI, 2002).....	9
FIGURA 1.3: Representação esquemática da polimerização em molde tipo II. (POLOWINSKI, 2002).....	10
FIGURA 1.4: Gelatinização da quitosana com tripolifosfato de sódio.....	11
FIGURA 1.5: Representação da estrutura primária da quitosana (a) e quitina (b) onde n é o grau de polimerização.....	12
FIGURA 1.6: Esquema da obtenção da quitina e quitosana.....	14
FIGURA 1.7: Estrutura química da hidroxipropil metilcelulose, onde n é o grau de polimerização. (R = -CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub> , CH <sub>3</sub> ou H).....	17
FIGURA 1.8: Representação gráfica das propriedades mecânicas de tensão versus deformação. FONTE: (WARD e HARDLEY, 1998). .....	22
FIGURA 2.1: Fotografia da síntese das nanopartículas.....	27
FIGURA 2.2: Foto das soluções: com ausência (solução transparente) e presença (solução opalescente) de nanopartículas.....	28
FIGURA 2.3: Equipamentos utilizados na síntese das nanopartículas QS-TPP.....	29
FIGURA 2.4: Mecanismo proposto de preparação das nanopartículas (MOURA et al., 2008)..	35
FIGURA 2.5: Espectro de FT-IR da quitosana (2a) e nanopartículas (2b-d).....	36
FIGURA 2.6: Espectro de C <sup>13</sup> VACP-MAS: a) quitosana pura; b) 0,2% (m/v) de quitosana na síntese das nanopartículas; c) 0,5% (m/v) na síntese e d) 0,8% (m/v) na síntese. * Corresponde ao grupo CH <sub>3</sub> acetil residual.....	38
FIGURA 2.7: Distribuição do tamanho médio de nanopartículas de QS-PMAA com 0,5 % (82 nm) e 0,2 % m/v (110 nm) de quitosana.....	40
FIGURA 2.8: Dependência do tamanho de partícula com a variação de pH para concentrações de 0,2; 0,5 e 0,8% m/v de QS utilizadas na síntese.....	41
FIGURA 2.9: Micrografia de MET de nanopartículas de QS-PMAA preparadas com 0,2% (m/v) de QS na síntese, equilibrada em pH 8,0.....	42
FIGURA 2.10: Dependência do potencial zeta com a variação do pH em suspensões de nanopartículas preparadas com 0,2; 0,5 e 0,8 % (m/v) de QS. As análises foram realizadas na temperatura de 25 °C.....	45
FIGURA 2.11: Micrografias de MET das nanopartículas de quitosana preparadas com (a) 0,2; (b) 0,5 e (c) 0,8 (m/v) de quitosana a pH ≈ 4.....	47
FIGURA 2.12: Micrografias de MET de nanopartículas de Q sintetizadas com 0,2% (m/v) em pH = 4,0 e equilibradas após a síntese em a) pH= 7,0 e b) pH= 8,0.....	48
FIGURA 2.13: Curva de DSC para quitosana pura e nanopartículas sintetizadas com 0,2; 0,5 e 0,8% (m/v) de QS. A programação utilizada para todas as análises foi: rampa de aquecimento de -20 até 450 °C; razão de 5 °C/min sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.....	49
FIGURA 2.14: Curvas de TG para (a) QS, nanopartículas de QS com (b) 0,2; (c) 0,5 e (d) 0,8 % (m/v). As curvas foram obtidas nas seguintes condições: rampa de aquecimento de 20 até 500 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min para cada amostra; vazão de nitrogênio mantida em 60 cm <sup>3</sup> /min.....	51
FIGURA 2.15: Espectro de FT-IR da quitosana (A); TPP (B) e nanopartículas QS-TPP(C).....	52

FIGURA 2.16: Micrografia eletrônica de transmissão de nanopartículas sintetizadas a partir de 3,00 mg L <sup>-1</sup> de QS e 1,2 mg L <sup>-1</sup> de TPP (85 nm). .....	56
FIGURA 3.1: Fotografia do esquema de preparação do filme de HPMC.....	62
FIGURA 3.2: Micrografias de MEV: (a) filme controle (somente HPMC); (b) QS-PMAA nanopartículas com 0,2 % (m/v) de quitosana; (c) filme de HPMC contendo 6,3 % de nanopartículas com 110 nm; (d) o mesmo que (c) em 20.000 X de magnificação. ....	70
FIGURA 3.3: Curva de tensão-deformação para filmes de HPMC com 6,3 % (110 nm), 14,3% (82 nm) e 20,7% (59 nm) de nanopartículas QS-PMAA adicionadas e com uma curva de filme contendo somente quitosana sem nanopartículas (QS-MAA).....	72
FIGURA 3.4: Tensão dos filmes de HPMC com diferentes concentrações e tamanhos de nanopartículas. Os valores médios são apresentados e as barras indicam os erros das medidas. .	74
FIGURA 3.5: Dependência da permeabilidade dos filmes de HPMC com a concentração de nanopartículas para diferentes tamanhos de partículas: (a) 59 nm; (b) 82 nm e (c) 110 nm. Diferentes letras sobre as barras indicam significância a $P < 0,05$ . Ou seja, $a \neq b \neq c$ .....	78
FIGURA 3.6: Representação esquemática do modelo de permeação proposto.....	79
FIGURA 3.7: Representação esquemática do modelo de permeação proposto.....	80
FIGURA 3.8: Curva de DSC para filme de HPMC puro. A curva foi obtida nas seguintes condições: vazão de nitrogênio de 50 mL min <sup>-1</sup> , razão de aquecimento de 10 °C min <sup>-1</sup> , porta amostra de alumínio com tampa.....	84
FIGURA 4.1: Efeito da incorporação de nanopartículas na tensão de filmes de HPMC. As colunas mostram os valores médios e as barras de erro indicam os desvios. As diferentes letras nas colunas indicam significância a $P < 0,05$ . Ou seja, $a \neq b \neq c$ .....	95
FIGURA 4.2: Curva TG dos filmes de HPMC (A) e do filme de HPMC com NPs de 110 nm (B). As análises foram realizadas em atmosfera de nitrogênio com vazão de 60 cm <sup>3</sup> min <sup>-1</sup> , amostra com massa de 6-7 mg e porta amostra de platina.....	100
FIGURA 4.3: Micrografias eletrônicas de varredura de filmes de HPMC puro (a) e filme de HPMC contendo nanopartícula de QS-TPP com 221 nm (b).....	102

## *Resumo*

APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS EM FILMES UTILIZADOS EM EMBALAGENS PARA ALIMENTOS: Nanopartículas formadas a partir de quitosana (QS) foram obtidas pelo método de polimerização em molde (QS-PMAA) e gelatinização ionotrópica (QS-TPP). As nanopartículas foram analisadas através de análises de FT-IR, tamanho de partícula, potencial zeta, microscopias eletrônicas (transmissão e varredura) e medidas de TGA. As nanopartículas sintetizadas apresentaram morfologia homogênea, ou seja, tamanho uniforme e forma esférica. O tamanho das partículas e o potencial zeta foram dependentes da concentração de quitosana utilizada no método de preparação e do pH. As diferentes partículas foram incorporadas em filmes de hidroxipropil metilcelulose (HPMC) a fim de melhorar suas propriedades. Para isso, uma solução de HPMC com 3% m/v foi preparada e sobre esta foi adicionada solução de nanopartículas de ambas as sínteses. Nos filmes foram realizadas análises de propriedades mecânicas (tensão, alongação e módulo de elasticidade), propriedades de barreira [vapor de água (WVP) e oxigênio], análise de espessura, microscopia eletrônica de varredura e análises térmicas. O filme controle de HPMC sem nanopartícula apresenta um valor de WVP de 0,79 g mm/ kPa h m<sup>2</sup>. Com a incorporação das nanopartículas de QS-PMAA os valores de WVP do filme decrescem para 0,64; 0,59 e 0,47 g mm/ kPa h m<sup>2</sup> com a incorporação de nanopartículas de 59; 82 e 110 nm, respectivamente. Com a incorporação de nanopartículas de QS-TPP os valores de WVP decrescem para 0,58; 0,45 e 0,33 g mm/ kPa h m<sup>2</sup> com a incorporação de nanopartículas com 220; 110 e 85 nm, respectivamente. Da mesma forma, as propriedades mecânicas dos filmes de HPMC foram significativamente melhoradas com a inserção de nanopartículas de quitosana. Este trabalho demonstrou que os filmes contendo nanopartículas podem ser considerados como extremamente promissores para serem aplicados em embalagens na conservação de alimentos.

## *Abstract*

APPLICATION OF NANOPARTICLES IN FILMS USED FOR FOOD PACKAGING: Dispersions composed of chitosan (CS) were obtained by the template polymerization (CS-PMAA) and ionotropic gelatinization (CS-TPP). The nanoparticles were analyzed by FT-IR analysis, particle size, zeta potential, electron microscopy (transmission and scanning), and TGA analysis. The nanoparticles obtained presented a very homogeneous morphology showing a quite uniform particles size distribution and a rather spherical shape. The particle size and zeta potential were dependent on the chitosan concentration used during the preparation method and pH. Different particles were incorporated in the hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) films in order to improve their properties. For this, a 3% HPMC (in w:v %) solution was prepared and added in this nanoparticles solutions of both syntheses. The films were characterized by mechanical (tensile, elongation and elastic modulus), barrier [water vapor (WVP) and oxygen], thickness, morphological, and thermal properties. The WVP of the control HPMC film was 0.79 g mm/kPa h m<sup>2</sup>. The WVP decreased significantly when CS-PMAA nanoparticles were incorporated to HPMC films. For example, WVP decreased to 0.64; 0.59 and 0.47 g mm/kPa h m<sup>2</sup> for films containing 59, 82 and 110 nm, respectively. For CS-TPP nanoparticles the WVP decreased to 0.58; 0.45 and 0.33 g mm/kPa h m<sup>2</sup> for films containing nanoparticles with 220, 110 and 85 nm, respectively. The same way, the mechanical properties of the HPMC films were strongly improved when CS nanoparticles were incorporated. In this way, HPMC films containing nanoparticles could be considered as promising materials for application in packaging for preservation of foods.



# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I: Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>5</b>
1.1. Nanotecnologia aplicada em embalagens.....	6
1.2. Nanopartículas poliméricas .....	6
1.2.1. Polimerização em molde .....	8
1.2.2. Gelatinização Ionotrópica.....	10
1.3. Quitosana .....	11
1.4. Matrizes polissacarídicas.....	15
1.5. Hidroxipropil metilcelulose (HPMC).....	17
1.6. Formação de filmes .....	18
1.7. Propriedades dos filmes.....	20
<b>CAPÍTULO II: Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Quitosana Sintetizadas Por Diferentes Métodos</b> .....	<b>24</b>
2.1. Introdução.....	25
2.2. Materiais e Métodos .....	26
2.2.1. Materiais .....	26
2.2.1.1. Síntese 1 .....	26
2.2.1.2. Síntese 2.....	26
2.2.2. Métodos .....	26
2.2.2.1. Preparação das Nanopartículas.....	26
2.2.2.1.1. Método de polimerização do ácido metacrílico (QS-PMAA) - Síntese 1 ....	26
2.2.2.1.2. Método de gelatinização ionotrópica (QS-TPP) - Síntese 2.....	28
2.2.2.2. Caracterização de nanopartículas QS-PMAA .....	30
2.2.2.2.1. Análise por FT-IR.....	30
2.2.2.2.2. Análise por RMN.....	30
2.2.2.2.3. Tamanho médio e distribuição do tamanho das partículas.....	31
2.2.2.2.4. Análise por Potencial Zeta.....	31
2.2.2.2.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	31
2.2.2.2.6. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	32
2.2.2.2.7. Termogravimetria (TG) .....	32
2.2.2.3. Caracterização nanopartículas QS-TPP .....	32
2.2.2.3.1. Análise por FT-IR.....	32
2.2.2.3.2. Tamanho de partículas e distribuição do tamanho das partículas .....	33
2.2.2.3.3. Análise por Potencial Zeta.....	33
2.2.2.3.4. Termogravimetria (TG) .....	33
2.2.2.3.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	34
2.3. Resultados e Discussões .....	34
2.3.1. Nanopartículas QS-PMAA .....	34
2.3.1.1. Síntese das nanopartículas .....	34
2.3.1.2. Análise de FT-IR .....	36
2.3.1.3. Análise de RMN .....	37
2.3.1.5. Análise do potencial zeta das partículas .....	43
2.3.1.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	46
2.3.1.6. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	48
2.3.1.7. Termogravimetria (TG) .....	50

2.3.2. Nanopartículas QS-TPP.....	52
2.3.2.1. Análise de FT-IR.....	52
2.3.2.2. Tamanho médio de Partículas .....	53
O efeito da concentração de QS e TPP no tamanho final das NPs e parâmetros que afetam o tamanho de partículas já foram relatados na literatura. CALVO et al. (1997) relataram que o tamanho dessas partículas depende de ambas as concentrações, tanto de QS quanto de TPP. GAN et al. (2005) estudaram a diferença entre partículas associadas com proteína, tipo albumina do soro bovino (BSA) e partículas sem BSA. Partículas carregadas com BSA apresentam tamanho maior que partículas sem o carregamento. Esse fato ocorre devido à alta massa molar e tamanho das moléculas de proteínas.....	54
2.3.2.3. Potencial Zeta .....	54
2.3.2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	55
2.4. Conclusões.....	57
<b>CAPÍTULO III: Síntese e Caracterização de Filmes de Hidroxipropil Metilcelulose Contendo Nanopartículas de Quitosana e Poli(ácido metacrílico) ..59</b>	
3.1. Introdução.....	60
3.2. Materiais e Métodos .....	62
3.2.1. Materiais .....	62
3.2.2. Métodos .....	62
3.2.2.1. Preparação dos filmes.....	62
3.2.2.2. Caracterização dos Filmes.....	63
3.2.2.2.1. Determinação da espessura.....	63
3.2.2.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	63
3.2.2.2.3. Solubilidade do filme em água .....	64
3.2.2.2.4. Propriedades Mecânicas .....	64
3.2.2.2.5. Permeabilidade ao Vapor de Água (WVP).....	65
3.2.2.2.6. Permeabilidade ao Oxigênio (O <sub>2</sub> P) .....	67
3.2.2.2.7. Termogravimetria (TG) .....	67
3.2.2.2.8. Análise Estatística.....	68
3.2.2.2.9. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	68
3.3. Resultados e Discussões .....	68
3.3.1. Determinação do Tamanho Médio .....	68
3.3.2. Morfologia do Filme.....	69
3.3.3. Solubilidade do filme em água .....	70
3.3.4. Propriedades mecânicas.....	72
3.3.5. Permeabilidade ao Vapor da Água (WVP).....	77
3.3.6. Permeabilidade ao Oxigênio (O <sub>2</sub> P).....	81
3.3.7. Análise da degradação .....	82
3.3.8. Estudos de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	83
3.4. Conclusões.....	85
<b>CAPÍTULO IV: Síntese e Caracterização de Filmes de Hidroxipropil Metilcelulose Contendo Nanopartículas de Quitosana e Tripolifosfato de Sódio. ....86</b>	
4.1. Introdução.....	87
4.2. Materiais e Métodos .....	88
4.2.1. Materiais .....	88
4.2.2. Métodos .....	88

4.2.2.1. Preparação dos filmes.....	88
4.2.2.2. Caracterização dos Filmes.....	89
4.2.2.2.1. Determinação da espessura.....	89
4.2.2.2.2. Propriedades Mecânicas.....	89
4.2.2.2.3. Permeabilidade ao Vapor de Água (WVP).....	90
4.2.2.2.4. Permeabilidade ao Oxigênio (O <sub>2</sub> P).....	91
4.2.2.2.5. Termogravimetria (TG).....	91
4.2.2.2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	92
4.2.2.2.7. Análise Estatística.....	92
4.2.2.2.8. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	92
4.3. Resultados e Discussões.....	93
4.3.1. Propriedades Mecânicas.....	93
4.3.2. Permeabilidade ao Vapor de Água (WVP).....	97
4.3.3. Permeabilidade ao Oxigênio (O <sub>2</sub> P).....	99
4.3.4. Degradação Térmica.....	100
4.3.5. Morfologia dos Filmes.....	102
4.3.6. Estudos de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	103
4.4. Conclusões.....	103
<b>CAPÍTULO V: Considerações Finais.....</b>	<b>105</b>
5.1. Conclusões Gerais.....	106
5.2. Sugestões para trabalhos futuros.....	107
<b>CAPÍTULO VI: Referências Bibliográficas.....</b>	<b>108</b>

## INTRODUÇÃO

A conservação dos alimentos exige em geral tratamentos físicos ou químicos para manter ou aumentar a sua vida de prateleira. A utilização de embalagens, rígidas ou flexíveis, é imprescindível, visto que esta tem que agir como uma barreira entre o ambiente externo e o alimento. Atualmente, a maioria das embalagens flexíveis é produzida com plásticos, isto é, de materiais sintéticos de fonte não renovável, que apesar de possuírem excelentes propriedades funcionais, são consideradas não biodegradáveis e estão envolvidas em problemas ambientais (SOARES et al., 2005).

Recentemente surgiu um grande interesse pelo desenvolvimento de embalagens biodegradáveis, principalmente, devido à demanda por alimentos ecologicamente corretos, de alta qualidade e devido, também, às preocupações ambientais sobre o descarte desses materiais não renováveis que levam milhares de anos para serem degradados (LE HELLAYE et al., 2008; MARCOS et al., 2008; CAO et al., 2009).

Uma das soluções encontradas para amenizar este problema, particularmente na área de embalagens de alimentos, é o desenvolvimento de filmes ou biofilmes a partir de materiais renováveis que possam substituir os materiais sintéticos. Porém o maior desafio da utilização destes filmes biodegradáveis é substituir as embalagens convencionais, mantendo, com a mesma eficácia, a qualidade do produto, garantindo sua vida de prateleira através do controle de características mecânicas e de permeabilidade (KESTER e FENNEMA, 1986; KROCHTA et al., 2002; YAKIMETS et al., 2007; SRINIVASA et al., 2007; OLIVAS e BARBOSA-CANOVAS, 2008).

Alguns sistemas promissores desenvolvidos pelo nosso grupo para melhorar as características dos filmes biodegradáveis sintetizados envolvem a

incorporação de nanoestruturas nos filmes (MOURA et al., 2008; MOURA et al., 2009).

O agronegócio brasileiro tem ocupado uma posição de líder mundial, entre outros aspectos, devido às pesquisas e investimentos neste setor. Para que os países continuem crescendo e abrindo novos mercados, vários setores ainda requerem agregação de valor aos seus produtos, o que só pode ser feito pela incorporação contínua de novas tecnologias.

As perdas pós-colheita de frutas frescas são enormes, cerca de 25 a 40%, dependendo do tipo de fruta e do uso de tecnologias de operações pós-colheita. Isso reflete a falta de conhecimento dos manipuladores de frutas sobre os fatores biológicos e as condições do ambiente envolvido na deterioração, ou a falta de uso de tecnologias pós-colheita requeridas na preservação da qualidade das frutas.

Muita pesquisa atualmente vem sendo realizada com o objetivo de explorar o potencial dos filmes e coberturas comestíveis e/ou biodegradáveis em manter e estender a qualidade e a vida útil de produtos frescos e reduzir a quantidade de embalagens descartáveis não biodegradáveis. As coberturas são formadas diretamente sobre a superfície do alimento, enquanto os filmes são pré-formados e posteriormente aplicados. Entretanto é comum que os termos coberturas e filmes sejam utilizados indistintamente.

Tradicionalmente, os filmes são usados para reduzir a perda de peso, alterando a permeabilidade e criando um efeito de “atmosfera modificada” sobre as frutas frescas. Coberturas já foram aplicadas em frutas como bananas, maçãs, mangas, pêras, morangos, goiabas entre outras. As coberturas e filmes sintetizados apresentaram influência na fisiologia das frutas, no atraso do amadurecimento e no metabolismo do fruto pós-colheita. Filmes sintetizados podem também sofrer

modificação, com o intuito de melhorar ainda mais as propriedades e desempenho desse filmes, frente ao seu uso.

Neste contexto a aplicação da nanotecnologia para aumentar a competitividade e a sustentabilidade do agronegócio pelo desenvolvimento de novos usos de produtos de origem agropecuária pode se tornar uma solução.

O presente trabalho busca a melhoria das propriedades mecânicas e de barreiras de filmes comestíveis para a indústria de embalagens pela inserção de materiais nanoestruturados em filmes de polissacarídeos. A utilização de polissacarídeo como matriz é muito importante, visando à diminuição da poluição ambiental causada pelo excesso de embalagens plásticas descartadas no ambiente. Além disso, o aprimoramento na síntese e caracterização de nanopartículas de quitosana é extremamente promissor na utilização em embalagens.

Para uma melhor apresentação e discussão dos resultados obtidos, essa tese será subdividida como descrito a seguir:

- Capítulo 1: Onde foi apresentada uma revisão geral da literatura sobre os aspectos principais da tese.
- Capítulo 2: Contém o método de síntese e caracterização de nanopartículas de quitosana baseado em dois métodos de síntese: polimerização em molde e gelatinização ionotrópica.
- Capítulo 3: Contém a preparação e caracterização dos filmes de HPMC contendo nanopartículas sintetizadas com base na polimerização em molde.
- Capítulo 4: Contém a preparação e caracterização dos filmes de HPMC contendo nanopartículas sintetizadas com base na gelatinização ionotrópica.
- Capítulo 5: É apresentado um resumo das principais conclusões da tese, em um item denominado considerações finais.

O principal objetivo da tese é a incorporação de nanopartículas poliméricas em matrizes polissacarídicas de fontes renováveis, derivadas de celulose, atuando como reforço nas propriedades mecânicas e melhoria nas propriedades de barreira.

Esse trabalho compreendeu ainda os seguintes objetivos específicos:

1) Determinar o tamanho de partículas variando a concentração de polímeros na síntese, a fim de se obter sistemas com possível controle de tamanho.

2) Caracterizar as nanopartículas quanto à morfologia, potencial zeta, distribuição de tamanho, FT-IR, análise térmica, dando ênfase principalmente para o sistema de síntese desenvolvido por este grupo, baseado na polimerização em molde.

3) Determinar a melhor condição de preparo dos filmes, a fim de se obter filmes homogêneos.

4) Caracterizar os filmes quanto às propriedades mecânicas e de barreira com o objetivo de se otimizar as propriedades dos filmes.

## **CAPÍTULO I: Revisão Bibliográfica**



## **1.1. Nanotecnologia aplicada em embalagens**

A nanotecnologia, a manipulação da matéria na escala dos átomos e moléculas (um nanômetro [nm] é um bilionésimo de metro), está rapidamente convergindo com a biotecnologia e tecnologia da informação para alterar radicalmente os sistemas da alimentação e agricultura.

A nanociência e a nanotecnologia são consideradas atualmente, como um dos mais fascinantes avanços nas tradicionais áreas do conhecimento e constituem um dos principais focos das atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação em todos os países industrializados (**CHAVES, 2002; PIRES, 2004**).

Atualmente, a embalagem e o monitoramento de alimentos constituem o foco principal de pesquisa e desenvolvimento nanotecnológico da indústria de alimentos. As embalagens que incorporam nanomateriais podem ser “ativas”, o que significa que podem responder a condições ambientais ou se autoconservarem, ou “inteligente”, significando que podem alertar o consumidor sobre contaminação, condições inadequadas de estocagem e/ou presença de patógenos.

Existem vários tipos diferentes de nanoestruturas, onde dependendo do material de composição e tipos de sínteses, podem variar suas características. Dentre os materiais nanoestruturados as nanopartículas merecem destaque, devido ao grande número de estudos realizados nesses sistemas. As nanopartículas podem ser divididas em orgânicas (nanopartículas poliméricas, que serão aplicadas em nosso trabalho) e inorgânicas (nanopartículas metálicas e óxidos).

## **1.2. Nanopartículas poliméricas**

O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (FIGURA 1.1). As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, ou seja, há diferenciação de núcleo. Por outro lado, as

nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde a diferenciação de núcleo não é observada, trata-se de uma matriz mais homogênea.

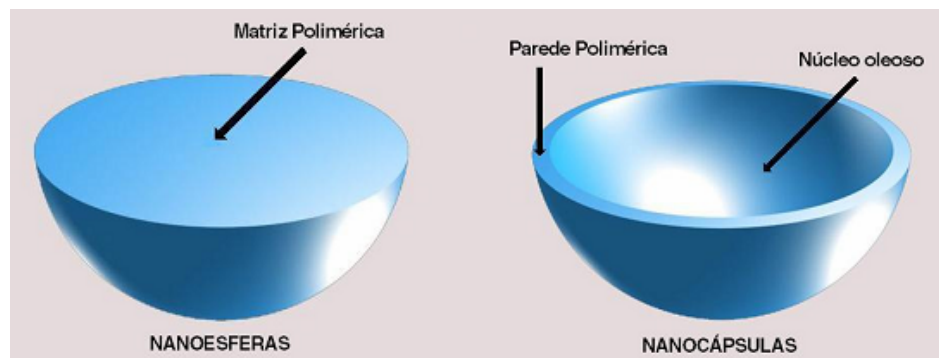


FIGURA 1.1: Diferenciação estrutural entre nanoesferas e nanocápsulas.

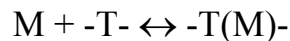
As nanopartículas poliméricas podem ser sintetizadas a partir de polímeros sintéticos como poliacrilatos e policaprolactona (PCL) ou polímeros naturais como gelatina e quitosana (**PANYAM e LABHASETWAR, 2003; QURRAT-UL-AIN et al., 2003**). Vários métodos de preparação são encontrados na literatura. Esses métodos podem ser classificados em duas principais categorias: (1) as que requerem uma reação de polimerização ou (2) as que utilizam diretamente uma macromolécula, ou um polímero pré-formado (**SCHAFFAZICK et al., 2003**).

No caso da síntese de nanopartículas poliméricas, um material que está sendo bastante utilizado é a quitosana. Uma grande variedade de métodos de síntese e aplicações de nanopartículas de quitosana é encontrada na literatura (**BORGES et al., 2007; AJUN et al., 2009; DU et al., 2009**). No presente trabalho foram utilizados dois métodos de síntese: polimerização em molde e gelatinização ionotrópica.

### 1.2.1. Polimerização em molde

A polimerização em molde ocorre através de interações cooperativas (interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas) entre os grupos complementares de moléculas de monômeros e o molde, formando um complexo polieletrólítico (**Polowinski, 2002**). Interações de van der Waals não específicas em combinação com interações estereoquímicas do polímero em formação com o molde, também pode levar à polimerização em molde. De modo geral, forma-se um gel interpolimérico compacto ou um precipitado de complexo polimérico agregado. A presença de um molde normalmente afeta várias características da polimerização, tais como a cinética, a massa molar e a microestrutura do polímero formado.

O mecanismo de polimerização em molde depende do grau de adsorção ou complexação do monômero (M) pelo molde:



onde -T- significa um sítio do molde. A constante de equilíbrio de adsorção,  $K_M$ , depende de alguns fatores tais como o modo de interação, a temperatura e o solvente. Dois casos extremos podem ser discutidos:  $K_M = \infty$  e  $K_M = 0$ . Quando  $K_M$  se aproxima do  $\infty$  (tipo I), o monômero está completamente adsorvido por todos os sítios do molde por forças eletrostáticas ou ligações de hidrogênio. Uma forte preferência do molde pelo monômero indica que o molde pode ser insolúvel no solvente na ausência do monômero. Se o molde é solúvel em um solvente apropriado, então o solvente pode competir com o monômero pelos sítios T, reduzindo  $K_M$ . Deste modo, apenas variando o solvente, pode-se ajustar o  $K_M$  e portanto, o modo de propagação do molde. Quando  $K_M$  se torna muito

pequeno, a propagação do molde se procede às custas da reação com o monômero adsorvido adjacente.

Com  $K_M = 0$  (tipo II) as macromoléculas do molde estão praticamente solvatadas pelo solvente. Um pré-requisito para a propagação em molde sob esta condição é que o oligômero formado na solução (ou seja, a polimerização se inicia fora do molde) se complexa com o molde, depois de atingido um tamanho crítico. A partir daí, a propagação procede ao longo do molde pela adição de moléculas de monômero advindo da solução, presente na vizinhança do molde. Esses dois tipos de reações podem ser ilustrados pelos esquemas apresentados nas FIGURAS 1.2 e 1.3.

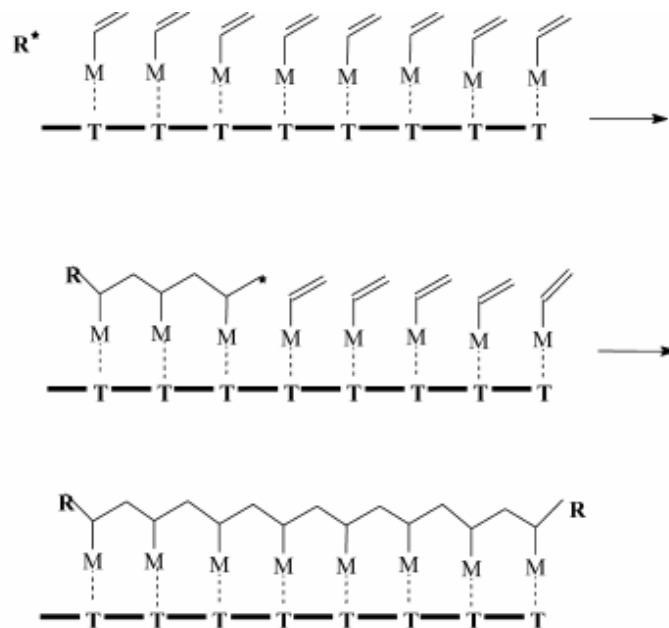


FIGURA 1.2: Representação esquemática da polimerização em molde tipo I. (POLOWINSKI, 2002)

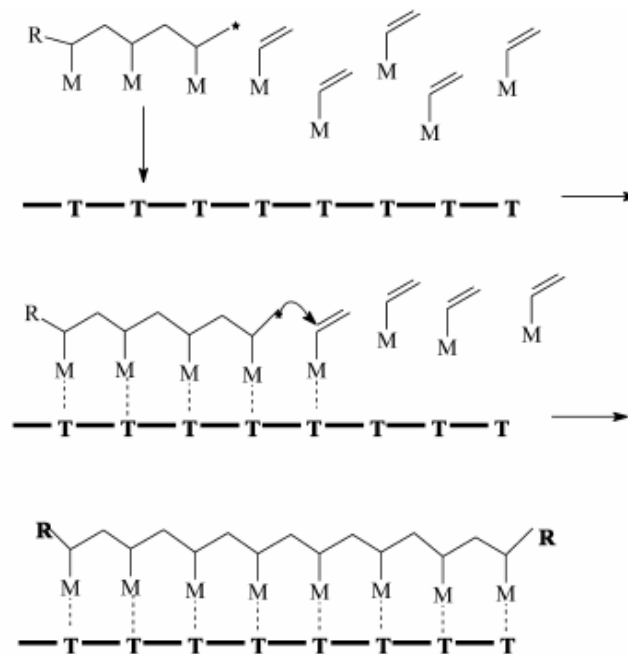


FIGURA 1.3: Representação esquemática da polimerização em molde tipo II. (POLOWINSKI, 2002)

### 1.2.2. Gelatinização Ionotrópica

Uma propriedade da quitosana, muito interessante, é sua habilidade de gelatinizar em contato com poliânions específicos. Esse processo de gelatinização se deve à formação de reticulação inter- e intramolecular mediada por esses poliânions. O método de gelatinização ionotrópica (FIGURA 1.4) é um dos métodos mais utilizados na obtenção de nanopartículas de quitosana (CALVO et al., 1997; GAN et al., 2005). Essa técnica envolve a adição, à temperatura ambiente, de uma fase alcalina (pH 7-9) contendo tripolifosfato (TPP) em uma fase ácida (pH 4-6) contendo quitosana. As nanopartículas são formadas imediatamente após a mistura das duas fases através de ligações inter- e intramoleculares formadas entre os fosfatos do TPP e os grupos amino da quitosana.

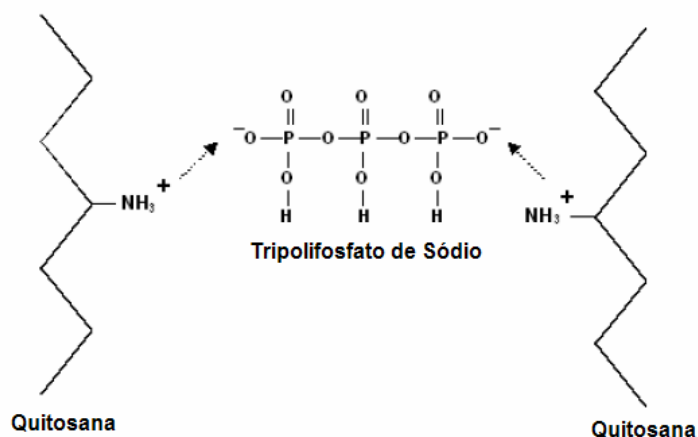


FIGURA 1.4: Gelatinização da quitosana com tripolifosfato de sódio.

A formação de nanopartículas de quitosana-TPP de alto rendimento com tamanho nanométrico e densidade de carga predeterminada, pode ser simplesmente manipulada e controlada variando-se as condições de processo como concentração de quitosana, razão em massa de quitosana e TPP e valores de pH.

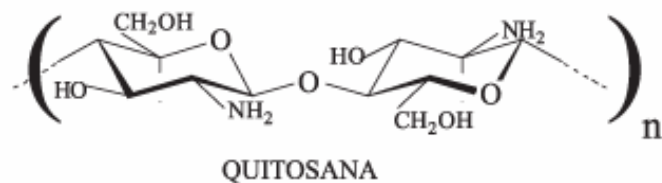
### 1.3. Quitosana

A quitina é um polissacarídeo natural que se destaca do ponto de vista químico por apresentar um grupo acetamido. Sua desacetilação conduz a um novo biopolímero denominado quitosana (KUMAR et al., 2000).

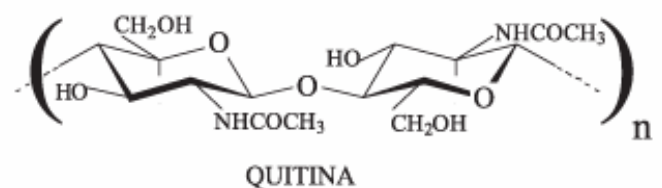
Durante os últimos trinta anos, estes biopolímeros vêm despertado bastante interesse junto à comunidade científico mundial, devido principalmente ao grande potencial de aplicação apresentado por estes materiais em diversas áreas (SHAHIDI e ARACHCHI, 1999). Este fato é observado tanto para formas naturais como para os derivados. Entretanto, o reconhecimento científico, como já comentado anteriormente, não se deu imediatamente após a descoberta, mas só veio depois do reconhecimento das propriedades químicas e físicas.

A confirmação de presença de glucosamida na estrutura desses polissacarídeos, que possui como característica básica um grupo amino no carbono 2, os tornaram especiais do ponto de vista químico, físico e biológico (**HIRANO et al., 1999**).

Sendo assim, a quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina, cujas estruturas são mostradas nas FIGURAS 1.5a e 1.5b, respectivamente. Apresenta, em maior proporção na cadeia polimérica, unidades de  $\beta$  - (1 - 4) - 2 - amino - 2 - desóxi - D - glicose e, em menor número, unidades de  $\beta$  - (1 - 4) - 2 - acetamido - 2 - desóxi - D - glicose da quitina. Possui semelhança na sua estrutura química com a celulose, porém exibe propriedades diferenciadas devido à presença dos grupos amínicos (**BELITZ e GROSCH, 1992**).



(a)



(b)

FIGURA 1.5: Representação da estrutura primária da quitosana (a) e quitina (b) onde n é o grau de polimerização.

A quitosana pode ser encontrada naturalmente na parede celular de fungos, mas sua maior fonte disponível é obtida através do processo de

desacetilação da quitina, polissacarídeo encontrado abundantemente na natureza e que constitui o exoesqueleto de insetos e crustáceos (**SOLOMONS, 1996**).

A prática industrial mais comum, utilizada no processo de desacetilação, e que também é bastante empregada em laboratório de pesquisas é aquela na qual a desacetilação da quitina é realizada em suspensão de solução aquosa de hidróxido de sódio, sendo que a concentração dessa solução, o excesso de álcali, o tempo e a temperatura da reação são variáveis, conforme o procedimento adotado (FIGURA 1.6). Assim, não se pode definir uma condição padronizada para a realização dessa reação. Entretanto, **NO et al. (1992)** afirmam que a eficiência da desacetilação e as características da quitosana são afetadas pelos seguintes fatores:

- a) temperatura e tempo de reação;
- b) concentração da solução de álcali e adição de diluente (álcoois de cadeia curta e cetonas são empregados);
- c) razão quitina/álcali;
- d) tamanho das partículas de quitina;
- e) atmosfera da reação e presença de agentes que evitem a despolimerização.

Quitina e quitosana são polímeros atóxicos, biodegradáveis, biocompatíveis e produzidos por fontes naturais renováveis, cujas propriedades vêm sendo exploradas em aplicações industriais e tecnológicas há quase setenta anos (**ROBERTS e GOOSEN, 1996**).

Devido as suas características atóxicas e de fácil formação de géis, a quitosana tem sido considerada, há décadas, como um composto de interesse industrial e especialmente de uso farmacêutico (**CAMPANA-FILHO et al., 2000**). Recentemente, contudo, uma série de estudos tem sido publicada, caracterizando o



uso da quitosana como cobertura de alimentos ou revestimentos protetores em frutas e legumes processados (COMA et al., 2002; EUSABEE et al., 2008).

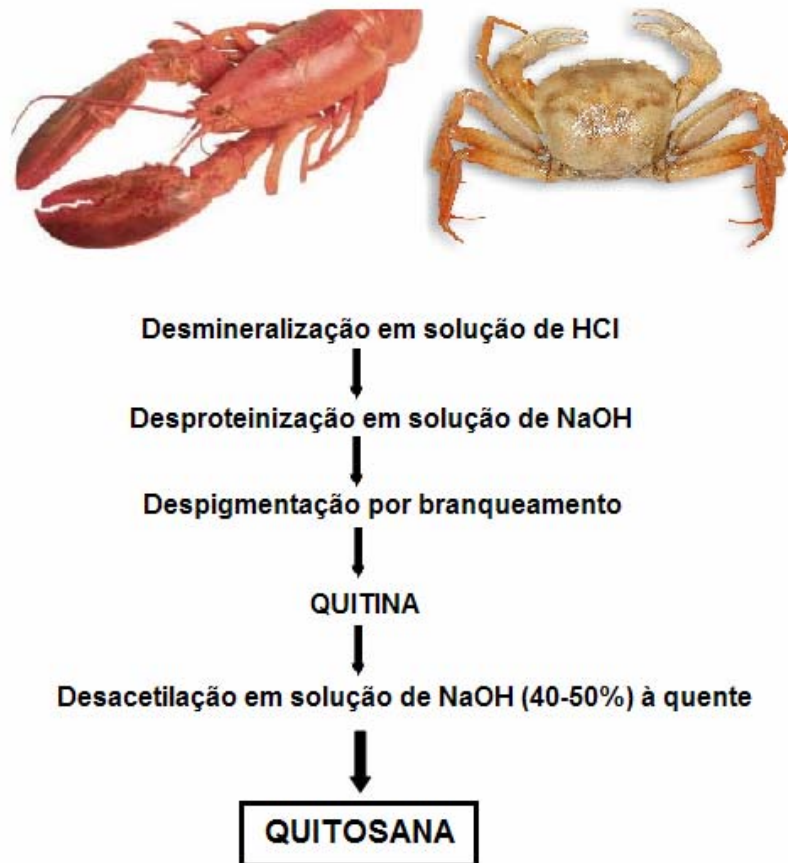


FIGURA 1.6: Esquema da obtenção da quitina e quitosana.

Estes trabalhos enfocam, essencialmente, as propriedades antifúngicas e antibacterianas da quitosana, conforme demonstrado por **NO et al. (2007)**, indicando, por conseguinte, o seu uso potencial sobre superfícies cortadas ou sobre frutos com alta taxa de maturação pós-colheita. Como a quitosana se constitui de fibras não-digeríveis, não apresenta, portanto, valor calórico, independentemente da quantidade ingerida, o que é mais um atrativo para a indústria alimentar.

**DEVLIEGHERE et al. (2004)** investigaram a atividade antimicrobiana da quitosana, suas interações com os componentes alimentícios e sua aplicabilidade no recobrimento de frutas e vegetais. Neste estudo verificou-se que o retardamento do crescimento microbiano ficou limitado a produtos com baixa concentração de proteínas e NaCl. Com relação ao recobrimento de frutas e verduras, no entanto, o efeito foi promissor quanto às frutas, porém, foi verificada a adição de um leve gosto amargo para as verduras.

**CHIEN et al. (2007)**, trataram fatias de manga com soluções de quitosana, a diferentes concentrações, armazenadas a 6 °C. As coberturas não afetaram o sabor natural da manga em fatias e a característica de cor não diferiram das amostras *in natura*. Além disso, inibiram crescimento de microrganismos e prolongaram a qualidade e a vida de prateleira da manga.

#### **1.4. Matrizes polissacarídicas**

A utilização de revestimentos comestíveis ou biodegradáveis com o intuito de retardar a desidratação não é recente. Já no século XVI, os europeus protegiam a carne da perda de umidade através da aplicação de gordura animal (**LABUZA e CONTRERAS, 1981**).

Dentre as principais classes de materiais que são utilizados na formação de filmes estão: polissacarídeos, lipídios e proteínas. Dentre esses os polissacarídeos merecem destaque.

Os polissacarídeos apresentam características coloidais e, quando em contato com o solvente apropriado ou agente de intumescimento, produzem géis ou suspensões de elevada viscosidade mesmo em baixas concentrações. Apresentam uso consagrado na indústria alimentícia e farmacêutica, atuando como agentes filmógenos, espessantes, emulsionantes, estabilizantes, formadores de matrizes

hidrofilicas e hidrogéis, entre outras aplicações, principalmente devido a suas características biodegradáveis (**WHISTLER e MILLER, 1997**).

O grande crescimento na utilização de polímeros biodegradáveis e sistemas poliméricos aquosos, observado nas últimas duas décadas, estão diretamente relacionados à redução do impacto ambiental. Por exemplo, o crescente aumento na quantidade de materiais plásticos desperdiçados e descartados, sendo que uma parte disso é oriunda das embalagens, têm levado vários países a se mobilizarem para minimizar e tentar solucionar problemas ambientais. As embalagens produzidas com polímeros sintéticos convencionais são consideradas inertes ao ataque imediato de microrganismos. Essa propriedade faz com que esses materiais apresentem um longo tempo de vida útil e, conseqüentemente, provoquem sérios problemas ambientais, visto que, após o seu descarte, demoram em média 100 anos para se decomporem totalmente (**ROSA, 2001**).

Plásticos ou polímeros biodegradáveis são aqueles que degradam sob a ação de organismos vivos, e também por meio de reações abióticas tais como fotodegradação, oxidação e hidrólise, que podem alterar o polímero devido a fatores ambientais (**RAGHAVAN, 1995; AMASS et al., 1998**). Dentre estes materiais, polissacarídeos, como derivados de celulose, quitina/quitosana, alginato e carragenina são extensivamente usados em alimentos, cosméticos e na medicina, devido às suas diferentes propriedades e biodegradabilidade. A hidroxipropil metilcelulose (HPMC), é um éter de celulose no qual os hidrogênios e grupos hidroxilas da celulose foram parcialmente substituídos por alquil ou por grupos alquil substituídos, para modificar as características da celulose nativa. É um polímero altamente solúvel em água e de fácil obtenção de filmes, e já é largamente aplicado na indústria alimentícia.

## 1.5. Hidroxipropil metilcelulose (HPMC)

A celulose é formada por unidades D-glicopiranosídicas, unidas por ligações  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4 numa cadeia longa e não-ramificada, as quais levam a formação de uma cadeia linear. Os três grupos hidroxilas por unidade monomérica formam fortes ligações secundárias entre as cadeias, impedindo sua fusão (CANEVAROLO, 2002). Devido à sua infusibilidade e insolubilidade, a celulose é geralmente convertida em derivados para tornar-se mais processável. O número médio de hidroxilas que são substituídas em um determinado produto é conhecido como grau de substituição (GS). Todos os derivados da celulose importantes são produtos da reação de um ou mais dos três grupos hidroxilas, que estão presentes em cada unidade glicopiranosídica (CHANDRA e RUSTGI, 1998). A estrutura do HPMC é encontrada na FIG. 1.7 (PEKEL et al., 2004).

Derivados de celulose são principalmente utilizados em embalagens, devido à sua biodegradabilidade. Uma limitação destes materiais é sua sensibilidade à água, produzindo uma perda de propriedades quando o grau de hidratação aumenta (COMA et al. 2003).

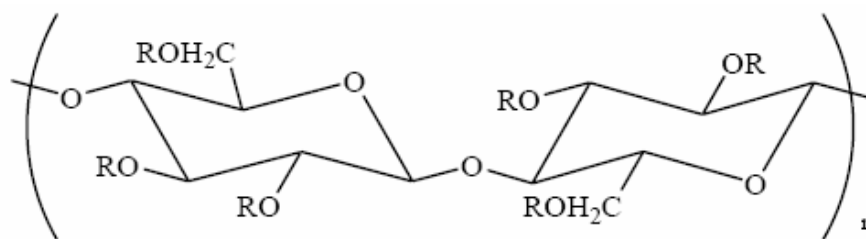


FIGURA 1.7: Estrutura química da hidroxipropil metilcelulose, onde  $n$  é o grau de polimerização. ( $R = -\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3, \text{CH}_3$  ou  $\text{H}$ )

**BALASUBRAMANIAM et al. (1997)** utilizaram filmes de HPMC no recobrimento de almôndegas de frango fritas em óleo de amendoim. Este filme

reduziu a perda de umidade e a quantidade de óleo absorvida a partir de 40 segundos de fritura, entre 50 a 90 °C.

**HIREMATH et al. (2002)** estudaram a miscibilidade entre polivinil pirrolidona (PVP) e HPMC. Os resultados mostraram que os polímeros formaram blendas miscíveis em toda faixa de composição. Através de infravermelho, os autores demonstraram que ocorre forte ligação de hidrogênio intermolecular entre o grupo carbonila do PVP e grupos hidroxila do HPMC.

Apesar da grande capacidade do HPMC em formar filmes, a elaboração do método de síntese dos filmes e métodos para melhoria das propriedades, tanto de barreira quanto mecânicas, são etapas que devem ser levadas em consideração no estudo.

## **1.6. Formação de filmes**

Existe diferença em relação a recobrimentos comestíveis e filmes. Os recobrimentos são aplicados ou confeccionados diretamente sobre o produto ou alimento a ser protegido enquanto filmes são estruturas independentes que podem ser utilizadas para envolvê-los, após sua fabricação (**AZEREDO, 2003**). Os filmes podem localizar-se na superfície ou como finas camadas entre diferentes partes do produto. No nosso trabalho estamos desenvolvendo a produção de filmes e não de recobrimentos. Ou seja, a preparação do filme é feita em separado ao produto que este vai proteger.

O processo de revestimento de uma matriz por um filme polimérico envolve forças de coesão, que atuam entre as cadeias do polímero formador do filme, e forças de adesão, que atuam entre o filme e o suporte (**CARVALHO, 1996**). Entre os materiais que constituem os suportes, são citados na literatura: o acrílico (**TÁPIA-BLACIDO et al., 2005**), o poliestireno (**AUDIC e CHAUFER,**

2005), o vidro (GODBILLOT et al., 2006), o polietileno (CARVALHO, 1996) e o poli(tetrafluoretileno), Teflon (HOSNY et al., 1998).

Duas técnicas podem ser usadas, basicamente, para a obtenção de filmes poliméricos livres: o processo de nebulização (“spraying”) e o processo conhecido como evaporação do solvente (“solvent casting”). Durante o processo de “spraying”, o filme é formado por deposição de gotículas atomizadas, formando camadas homogêneas de filmes (KFURI, 2003). O processo de evaporação do solvente envolve a dispersão do polímero em um solvente ou mistura de solventes adequados, formando um sistema relativamente viscoso. A dispersão é então vertida sobre uma superfície não adesiva (suporte) e é levada para uma estufa para que o solvente evapore.

Depois que todo o solvente foi evaporado, o filme seco pode ser retirado do suporte. Alguns fatores, tais como o tipo do solvente utilizado e as condições de evaporação (temperatura), exercem forte influência nas propriedades finais de filmes poliméricos (CARVALHO, 1996).

Alterações estruturais nos filmes podem ser obtidas se as dispersões de polímeros são preparadas com “solventes adequados ou não”, ou se são preparadas com uma mistura desses solventes. Pode-se dizer que um solvente é adequado para um polímero quando os valores dos parâmetros de solubilidade do solvente e do polímero forem semelhantes. Em “solventes adequados”, as moléculas poliméricas apresentam uma conformação em hélice de forma expandida. Durante a evaporação do solvente, há um aumento da concentração da dispersão. Assim, as forças intermoleculares, entre os segmentos das cadeias de uma molécula polimérica e também entre os segmentos das cadeias das moléculas poliméricas da vizinhança, tornam-se cada vez mais eficazes e o filme resultante é formado por uma estrutura densa e forte, devido ao entrelaçamento das cadeias.

Uma outra situação ocorre se o polímero for colocado em uma solução diluída contendo “solventes adequados ou solventes não adequados”. As hélices poliméricas são compactas e interagem somente superficialmente quando o solvente evaporar. O filme resultante é heterogêneo, pois sua estrutura apresentará microporos. Se o polímero for preparado com uma mistura de solventes, devido às diferentes taxas de evaporação de cada componente da mistura, uma situação crítica ocorrerá durante a formação do filme, na qual a separação do polímero a partir da solução acontecerá (formação do gel).

A estrutura do filme polimérico é dependente do estágio no qual ocorre a separação de fases. Se a separação ocorrer precocemente, por exemplo, antes da formação do gel, então será obtido um filme com poros abertos em sua estrutura. De uma outra forma, se a separação ocorrer em um estágio posterior da formação do filme, quando as moléculas do polímero já estiverem interagindo fortemente (após a formação do gel), então filmes contendo poros fechados em sua estrutura serão formados. E se nenhuma separação ocorrer, filmes com estrutura densa serão formados de maneira similar aos filmes preparados com bons solventes **(KROCHTA et al., 1994; JONES e MEDLICOTT, 1995)**.

Uma das preocupações na técnica de evaporação do solvente é manter constante para todos os filmes que serão sintetizados e analisados, as mesmas condições de preparação, como: temperatura, solvente, tempo de evaporação e suporte.

### **1.7. Propriedades dos filmes**

Os filmes utilizados em alimentos não devem apresentar sabor para não serem detectados durante o consumo do produto alimentício que foi coberto ou embalado. Quando os filmes apresentarem um aroma ou sabor particular, suas

características sensoriais devem ser compatíveis ao alimento (**DEBEAUFORT et al., 1998**).

Os filmes para embalagens devem apresentar os seguintes requisitos: alta eficiência à barreira (vapor de água e gás) e mecânica; estabilidade térmica, obtenção por tecnologia de processamento simples, não poluente e de baixo custo, tanto de matérias primas como de processo (**DEBEAUFORT et al., 1998**).

A eficiência à barreira de água é desejável para retardar a desidratação da superfície de produtos frescos (carne, frutas e verduras) ou congelados. Muitos produtos requerem embalagens que sejam barreira ao vapor de água para evitar ganho ou perda de umidade. A migração de vapor de água é um dos principais fatores de alteração da qualidade sensorial, características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais bem como estabilidade de estocagem.

Filmes preparados com polissacarídeos apresentam alta taxa de permeabilidade ao vapor de água, devido principalmente, a grande solubilidade apresentada por esses. Assim esse é um parâmetro que necessita ser melhorado.

O controle das trocas gasosas, particularmente do oxigênio, permite o melhor controle da maturação das frutas ou a redução da oxidação de alimentos sensíveis ao oxigênio. A transferência de vapores orgânicos deve ser diminuída a fim de reter os compostos de aroma no produto durante a estocagem ou prevenir a penetração de solventes no alimento, o que pode envolver toxicidade ou sabor não característico (“off-flavor”) (**GENNADIOS e WELLER, 1990**). A deterioração dos alimentos é causada principalmente pelo crescimento microbiano nas superfícies dos alimentos (**TORRES e KAREL, 1985**). A utilização das películas que apresentam baixa taxa de permeabilidade a gases, como as sintetizadas por polissacarídeos, reduz o acesso do oxigênio aos tecidos, minimizando tais alterações (**KESTER e FENNEMA, 1986**).



Para que as embalagens não percam sua proteção pelo manuseio ou armazenamento é necessário que os filmes apresentem uma certa resistência à ruptura, à abrasão e também uma certa flexibilidade, que permita a deformação do filme sem a sua ruptura (**VICENTINI e CEREDA, 1999**).

Assim, uma importante propriedade dos filmes poliméricos é sua resposta à aplicação de uma força, indicada por dois tipos principais de comportamentos: o elástico e o plástico. Materiais elásticos irão retornar à sua forma original desde que a força seja removida. Materiais plásticos não retomam sua forma. Nestes, o fluxo ocorre semelhantemente a um líquido altamente viscoso. A maioria dos filmes poliméricos sintéticos demonstra uma combinação dos comportamentos elástico e plástico, apresentando comportamento plástico após o limite elástico ter sido excedido. A FIGURA 1.8 exemplifica o comportamento de um material viscoelástico sob tensão.

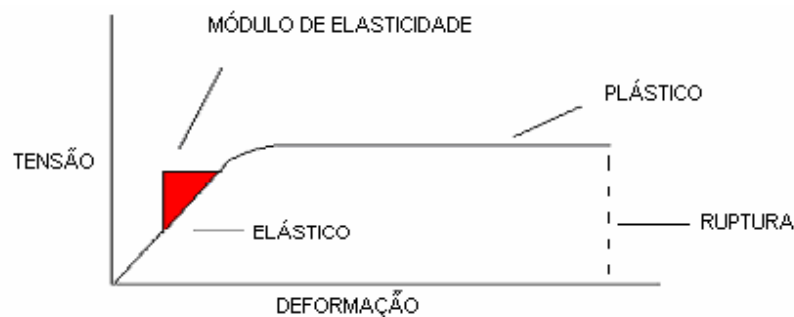


FIGURA 1.8: Representação gráfica das propriedades mecânicas de tensão versus deformação. **FONTE: (WARD e HARDLEY, 1998).**

Uma das propriedades mecânicas apresentadas pelos filmes são resistência à tração e alongação. A resistência à tração é a máxima tensão suportada pelo filme até o momento de sua ruptura. A alongação é a medida de maleabilidade do filme e pode ser considerada como uma característica que define a habilidade do

filme em deformar antes de ocorrer sua ruptura. Baixos valores de alongação implicam em filmes quebradiços (**MACLEOD et al., 1997**). Outra propriedade mecânica avaliada em filmes poliméricos é o módulo de elasticidade (módulo de Young), que é a relação linear entre a tensão aplicada e a deformação sofrida e é determinado pela inclinação da curva de tensão versus deformação na região elástica.

**CAPÍTULO II: Síntese e Caracterização de**  
**Nanopartículas de Quitosana Sintetizadas Por**  
**Diferentes Métodos**

## 2.1. Introdução

A quitosana (QS) é um biopolímero obtido da desacetilação da quitina, que é o maior constituinte de exoesqueletos de crustáceos e outros animais marinhos (**BOONSONGRIT et al., 2006**). Atualmente a quitosana vem sendo utilizada no tratamento de águas, produção de cosméticos, drogas e medicamentos, aditivos alimentícios, membranas semipermeáveis e no desenvolvimento de biomateriais (**JIANG et al., 2006; ALMENAR et al., 2009; XIAO et al., 2009**).

A abundância (baixo custo), biodegradabilidade, não toxicidade e origem natural, fazem da quitosana um material bastante viável na utilização na agricultura.

O estudo de nanopartículas (NPs) de quitosana já é algo bem difundido no meio científico. Só que a cada ano, vem crescendo o número de descobertas inovadoras na área de nanotecnologia utilizando a quitosana (**NASCIMENTO et al., 2001; WU et al., 2005; BODNAR et al., 2005; DOUGLAS et al., 2006**). As nanopartículas (NPs) tem sido desenvolvidas visando inúmeras aplicações, tais como: aumentar a capacidade de armazenamento e processamento de dados dos computadores; criar novos mecanismos para a liberação de medicamentos mais seguros e menos prejudiciais ao paciente dos que os disponíveis de hoje; criar materiais mais leves e mais resistentes do que metais e plásticos, para aplicação em construções, automóveis e aviões; e diversas outras inovações.

Novos meios de energia, proteção ao meio ambiente, menor uso de matérias primas escassas são possibilidades concretas dos desenvolvimentos em nanotecnologia que estão ocorrendo.

A literatura relata várias maneiras diferentes de sínteses de nanopartículas, com diferentes tamanhos (**JANES e ALONSO, 2003; LIU et al., 2005**). Entretanto, as nanopartículas de quitosana na maioria dos trabalhos apresentam tamanhos maiores que 125 nm, usualmente na faixa de 175 à 600 nm.

A obtenção de nanopartículas de quitosana com tamanhos menores é algo realmente inovador no campo da nanotecnologia.

Essa etapa teve como objetivo, sintetizar nanopartículas de quitosana a partir de dois métodos diferentes: i) polimerização em molde através da polimerização de ácido metacrílico em solução de quitosana (QS-PMAA); ii) gelatinização ionotrópica da quitosana com tripolifosfato de sódio (QS-TPP).

## **2.2. Materiais e Métodos**

### **2.2.1. Materiais**

#### **2.2.1.1. Síntese 1**

- Quitosana; a quitosana utilizada foi da Polymar, (Fortaleza-Brasil). (MW= 71,3 kDa, grau de desacetilação 94%, fornecido pelo fabricante).
- Persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ); obtido da Aldrich (St. Louis, USA).
- Ácido metacrílico (MAA); obtido da Aldrich (St. Louis, USA).

#### **2.2.1.2. Síntese 2**

- Quitosana; Polymar, Fortaleza-Brasil. (MW= 71,3 kDa, grau de desacetilação 94%).
- Tripolifosfato de sódio (TPP); obtido da Aldrich (St. Louis, USA).

### **2.2.2. Métodos**

#### **2.2.2.1. Preparação das Nanopartículas**

##### **2.2.2.1.1. Método de polimerização do ácido metacrílico**

##### **(QS-PMAA) - Síntese 1**

As nanopartículas foram preparadas por polimerização do ácido metacrílico em solução de quitosana, a partir de duas etapas (MOURA et al.,

2008). Na primeira etapa, a quitosana foi solubilizada em solução de ácido metacrílico (0,5% v/v) por 12 horas, sob agitação magnética. As concentrações de quitosana utilizada na síntese foram de 0,2; 0,5 e 0,8 (% m/v). Na segunda etapa, adicionou-se sob a solução previamente solubilizada 0,2 mmol de  $K_2S_2O_8$  com agitação mecânica. O sistema foi fechado e mantido a 70 °C por 1 hora, para que ocorresse a polimerização do ácido metacrílico (FIGURA 2.1). Com o aumento de poli(ácido metacrílico) na solução, essa muda de clara para uma suspensão opalescente, indicando a formação de nanopartículas QS-PMAA.

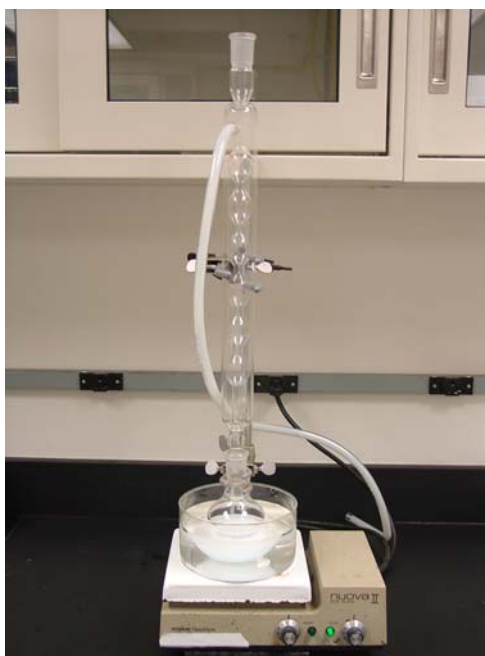


FIGURA 2.1: Fotografia da síntese das nanopartículas.

Finalmente, após 1 hora de reação, a suspensão foi imersa em banho de gelo por 30 minutos. As nanopartículas foram centrifugadas e então re-suspensas em água deionizada (Mili-Q). Na FIGURA 2.2, é apresentada uma foto da solução de nanopartículas antes e após a formação das nanoestruturas.



FIGURA 2.2: Foto das soluções: com ausência (solução transparente) e presença (solução opalescente) de nanopartículas.

#### **2.2.2.1.2. Método de gelatinização ionotrópica (QS-TPP) - Síntese 2**

Para a preparação de nanopartículas de quitosana e tripolifosfato de sódio, utilizou-se o método de gelatinização iônica de grupamentos da QS com TPP.

As nanopartículas foram obtidas de acordo com o procedimento, reportado primeiramente por **CALVO et al. (1997)**. Na primeira etapa, solubilizou-se a quitosana em solução de ácido acético nas concentrações de 3,0 e 4,4 mg/mL. Deixou-se a quitosana solubilizando em ácido, por cerca de 6 horas. Após esse período, a solução foi alocada em um homogenizador (Polytron PT 3000-Brinkmann). Sob agitação de 4500 rpm, 28 mL de solução de TPP com concentração de 1,2 e 2,1 mg/mL foram adicionados em 70 mL das soluções de QS (TABELA 2.1). A taxa de adição da solução de TPP foi de 1 mL/min. A zona de suspensão opalescente, que apareceu no sistema após a adição do TPP, foi atribuída as nanopartículas formadas.

TABELA 2.1: Três diferentes tipos de nanopartículas QS-TPP formadas, com diferentes concentrações dos reagentes.

Concentração de Quitosana (mg/mL)	Concentração de TPP (mg/mL)
3,15	0,6
2,14	0,6
2,14	0,3

Na Figura 2.3, é apresentado uma fotografia dos equipamentos utilizados na síntese das nanopartículas.



FIGURA 2.3: Equipamentos utilizados na síntese das nanopartículas QS-TPP.



## **2.2.2.2. Caracterização de nanopartículas QS-PMAA**

### **2.2.2.2.1. Análise por FT-IR**

A partir das nanopartículas sintetizadas, estas foram centrifugadas, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas, para só depois serem misturadas com brometo de potássio (KBr) e prensadas em alta pressão, formando pastilhas. Espectros de FT-IR foram obtidos registrando 128 varreduras de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ , em um Perkin Elmer Spectrum, modelo Paragon 1000.

As análises de FT-IR foram realizadas na quitosana pura e nas NPs com diferentes quantidades de QS. As análises de FT-IR foram importantes para analisar o mecanismo pelo quais as NPs são formadas. Permitirá também, a caracterização estrutural e composição química dos diferentes tipos de polímeros e dos materiais, elucidando os tipos de ligações químicas e os grupos funcionais presentes nos polímeros utilizados no trabalho.

### **2.2.2.2.2. Análise por RMN**

Os ensaios de RMN  $\text{C}^{13}$  VACP-MAS foram realizados em um espectrômetro Varian Inova 400, com campo de 9,4 T. Os espectros de RMN no estado sólido foram obtidos utilizando os seguintes parâmetros: pulso de  $\pi/2$ , tempo de aquisição de 12,8 ms, e tempo de repetição de 1 ms.

Foram utilizados aproximadamente 200 mg de amostra em rotores de zircônio com 5 mm de diâmetro.

As amostras foram analisadas com frequência de rotação de 6.500 Hz. Todos os espectros foram filtrados usando função de decaimento exponencial ( $lb=10$ ).

### **2.2.2.2.3. Tamanho médio e distribuição do tamanho das partículas**

A distribuição do tamanho das partículas foi determinada no aparelho Fiber Optic Quasi Elastic Light Scattering (FOQELS) (Brookhaven, USA), que opera pelo princípio de difração de raios laser. As medidas foram realizadas em triplicata, na temperatura de 25 °C. As análises foram feitas, em soluções com diferentes concentrações de QS na síntese das nanopartículas (0,2; 0,5 e 0,8 % m/v). Para nanopartículas obtidas a partir do método de polimerização em molde, foram realizadas medidas de tamanho em diferentes pHs na faixa entre 3,0 - 9,0.

### **2.2.2.2.4. Análise por Potencial Zeta**

A carga superficial das partículas foi analisada por um Zeta Potencial Analyzer (Brookhaven, USA). Nessas medidas, o KCl foi adicionado à fase dispersora, de modo que sua concentração foi de  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, a fim de manter constante a força iônica do meio. As medidas foram realizadas a temperatura ambiente (25 °C). Para nanopartículas obtidos a partir do método de polimerização em molde, foram realizadas medidas de potencial zeta em diferentes pHs, onde a faixa analisada foi pH 3,5 - 9,0. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### **2.2.2.2.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

As suspensões de partículas foram caracterizadas quanto à forma das partículas e homogeneidade da suspensão, através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). O microscópio utilizado foi um Philips CM200. As amostras foram sonificadas por 2 min, para obter melhor dispersão e prevenir a aglomeração das NPs. Uma gota da suspensão foi adicionada sobre uma grade de cobre e seca a temperatura ambiente, para então ser analisada por MET.

#### **2.2.2.2.6. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**

Todas as medidas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) realizadas nas nanopartículas foram feitas utilizando um equipamento de DSC da marca TA Instruments Q100.

Aproximadamente, 4 mg de amostra foram pesadas em placas de alumínio, essas placas foram seladas e alocadas no equipamento. A programação utilizada para todas as análises foi: rampa de aquecimento de  $-20$  até  $450$  °C; razão de  $5$  °C/min sob atmosfera de nitrogênio com vazão de  $50$  mL/min.

#### **2.2.2.2.7. Termogravimetria (TG)**

As análises foram realizadas no aparelho TGA Q-500. Aproximadamente 5-6 mg da amostra foram analisados em placa de platina. Os experimentos foram programados com rampa de aquecimento de  $20$  até  $500$  °C, com razão de aquecimento de  $10$  °C/min para cada amostra. A vazão de nitrogênio foi mantido em  $60$  cm<sup>3</sup>/min. Todas as análises foram feitas em triplicatas.

### **2.2.2.3. Caracterização nanopartículas QS-TPP**

#### **2.2.2.3.1. Análise por FT-IR**

As soluções de nanopartículas foram centrifugadas, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas (12 horas), para só depois serem misturadas com brometo de potássio (KBr) e prensadas em alta pressão, formando pastilhas.

Espectros de FT-IR foram obtidos registrando 128 varreduras de  $4000$  a  $400$  cm<sup>-1</sup>, com resolução de  $2$  cm<sup>-1</sup>, em um Perkin Elmer Spectrum, modelo Paragon 1000. As análises de FT-IR foram realizadas na quitosana pura e nas NPs com diferentes concentrações de materiais na síntese. A análise permitirá a caracterização estrutural e composição química dos diferentes tipos de polímeros e

dos materiais, elucidando os tipos de ligações químicas e os grupos funcionais presentes nos polímeros utilizados no trabalho.

#### **2.2.2.3.2. Tamanho de partículas e distribuição do tamanho das partículas**

A distribuição do tamanho das partículas foi medida no equipamento Horiba LA 900, (Horiba Instruments Inc., Irvine, CA, USA), que opera pelo princípio de difração de raios laser. As medidas foram realizadas em triplicata na temperatura de 25 °C e pH 4,5.

#### **2.2.2.3.3. Análise por Potencial Zeta**

A carga superficial das partículas foi analisada por um Zeta Potencial Analyser (Brookhaven, USA). KCl foi adicionado à fase dispersora, de modo que sua concentração foi de  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, a fim de manter constante a força iônica do meio. As partículas foram analisadas na temperatura de 25 °C e pH 4,5. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **2.2.2.3.4. Termogravimetria (TG)**

O procedimento foi similar ao descrito no item 2.3.2.7. As análises foram realizadas no aparelho TGA Q-500. Aproximadamente 5-6 mg da amostra foram analisados em panela de platina. Os experimentos foram programados com rampa de aquecimento de 20 até 500 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min para cada amostra. A vazão de nitrogênio foi mantida em 60 cm<sup>3</sup>/min. Todas as análises foram feitas em triplicatas.

### **2.2.2.3.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

O procedimento foi similar ao descrito no item 2.2.2.2.5. As suspensões de partículas foram caracterizadas quanto à forma das partículas e homogeneidade da suspensão, através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). O microscópio utilizado foi um Philips CM200. As amostras foram sonificadas por 2 min, para obter melhor dispersão e prevenir a aglomeração das NP. Uma gota da suspensão foi adicionada sobre uma grade de cobre e seca a temperatura ambiente, para só então ser analisada por MET.

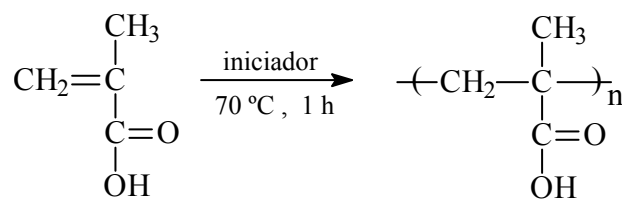
## **2.3. Resultados e Discussões**

### **2.3.1. Nanopartículas QS-PMAA**

#### **2.3.1.1. Síntese das nanopartículas**

A quitosana é um polímero que apresenta a característica de um polieletrólito positivo quando em solução. Essa característica faz com que a quitosana apresente interação eletrostática com o ácido, o que provoca a formação das nanopartículas, a partir, da polimerização do ácido na solução.

O mecanismo de preparação das nanopartículas está presente na FIGURA 2.4. Em se tratando de um método de polimerização em molde, a quitosana é insolúvel em água pura, atingindo uma completa solubilização quando o MAA é adicionado na solução. Isso indica que, tal como ocorre com o ácido acético nas soluções comuns de quitosana, o MAA protonou os grupos  $\text{NH}_2$  da quitosana. Quando a polimerização começou, a propagação das cadeias de PMAA resultou em um aumento da densidade de carga, de modo que, ao tornar-se crítica, os complexos polieletrólitos insolúveis entre a quitosana e o poli(ácido metacrílico) são formados através de interações eletrostáticas. Naturalmente, as interações hidrofóbicas e as ligações de hidrogênio não podem ser desconsideradas.



Ácido Metacrílico

Poli(ácido metacrílico)

Poli(ácido metacrílico)

Quitosana

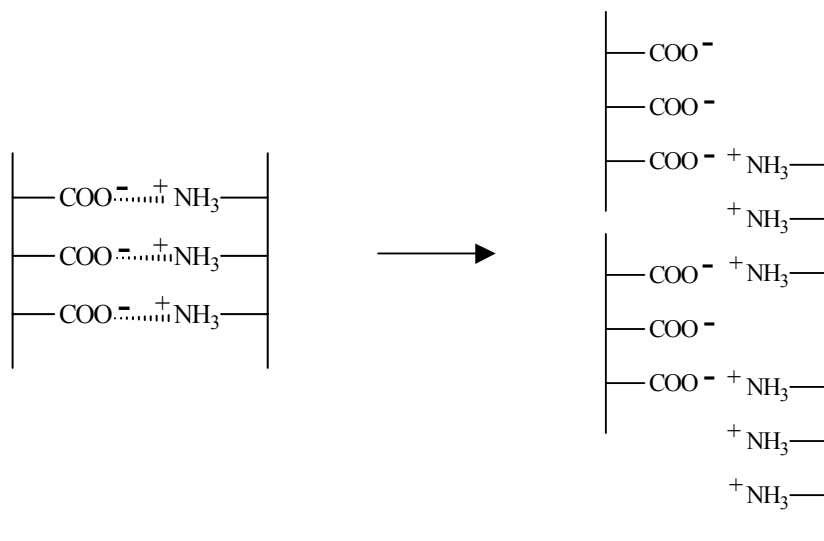
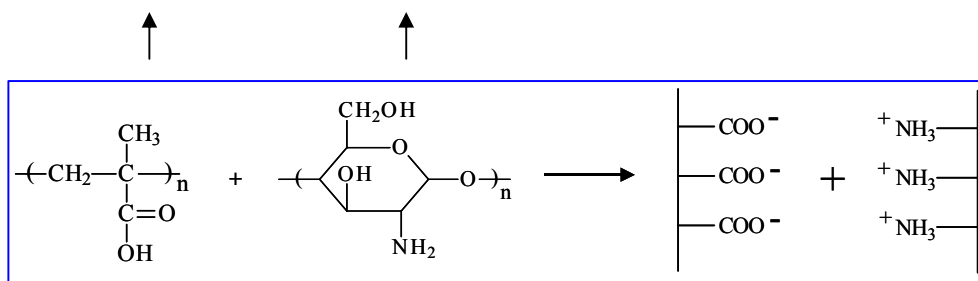


FIGURA 2.4: Mecanismo proposto de preparação das nanopartículas (MOURA et al., 2008).

### 2.3.1.2. Análise de FT-IR

A fim de estudar a interação existente entre o grupamento amina da QS e o grupamento ácido do PMAA foram realizadas as análises de FT-IR.

O espectro de FT-IR pode ser observado na FIGURA 2.5 e foi realizado nas nanopartículas contendo 0,2, 0,5 e 0,8 % (m/v) de quitosana e na quitosana pura. O espectro da quitosana pura (FIG. 2.5a) apresenta picos característicos:  $1649\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento da ligação C=O de amina I;  $1083 - 1020\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento do C-O e  $620\text{ cm}^{-1}$  devido às vibrações dos anéis piranosídicos, de acordo com a literatura (TONHI e PLEBIS, 2002).

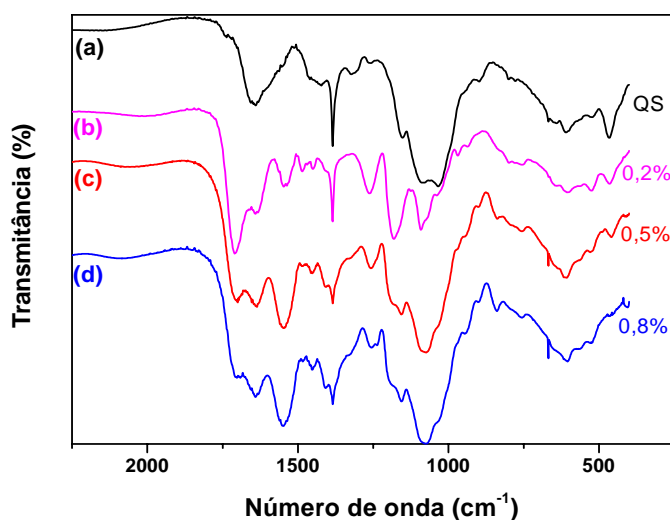


FIGURA 2.5: Espectro de FT-IR da quitosana (2a) e nanopartículas (2b-d).

Na FIG. 2.5b observamos que a banda em  $1649\text{ cm}^{-1}$ , que aparece claramente no espectro da quitosana pura, diminui surgindo duas novas bandas em  $1638\text{ cm}^{-1}$  (grupo  $\text{COO}^-$ ) e  $1545\text{ cm}^{-1}$  (grupo  $\text{NH}_3^+$ ), indicando a interação iônica entre PMAA e QS, caracterizando a formação de nanopartículas.

As bandas em 1703 e 1264  $\text{cm}^{-1}$  (C=O) confirmam a presença de PMAA nas nanopartículas (**AZHGOZHINOVA et al., 2004**). O aumento da quantidade de quitosana nas NPs (FIG. 2.5b-d) provoca uma mudança química significativa, pois bandas em 1703 e 1264  $\text{cm}^{-1}$  decrescem drasticamente, com aumento concomitante das bandas em 1638  $\text{cm}^{-1}$  e 1545  $\text{cm}^{-1}$ . Esse fato está relacionado diretamente com o decréscimo na quantidade de PMAA, e aumento nas interações iônicas entre PMAA e quitosana que passam a existir no sistema.

### **2.3.1.3. Análise de RMN**

A FIGURA 2.6, apresenta o espectro de RMN das nanopartículas de QS-PMAA com 0,2, 0,5 e 0,8 % m/v de quitosana na síntese. Os picos C1 ( $\delta$ 105,7), C2 ( $\delta$ 57,6), C3 ( $\delta$ 75,5), C4 ( $\delta$ 82,9), C5 ( $\delta$ 76,1) e C6 ( $\delta$ 61,5), que aparecem no espectro da FIG. 2.6a correspondem à estrutura da quitosana, estando de acordo com a literatura (**SILVA et al., 2007**).

Os picos característicos do poli(ácido metacrílico) reportados na literatura são: C1 ( $\delta$ 183,6), C2 ( $\delta$ 43), C3 ( $\delta$ 57) e C4 ( $\delta$ 18,7). Para as nanopartículas QS-PMAA os picos de RMN obtidos, estão próximos dos picos apresentados pela QS e PMAA. Isto mostra que essa pequena diferença no deslocamento dos picos acontece devido à formação de nanopartículas, ou seja, a interação entre os dois sistemas (FIG. 2.6b – 2.6d).

Nos espectros das nanopartículas, o pico do C1 ( $\delta$ 183,6), referente ao grupamento  $\text{COO}^-$  do ácido, se desloca para uma região de campo mais baixo (0,2% -  $\delta$ 184,0; 0,5% -  $\delta$ 188,5; e 0,8% -  $\delta$ 190,8). Isso ocorre devido à mudança na massa relativa da razão dos grupos  $\text{COO}^- / \text{COOH}$ , que reflete nas diferenças da frequência de vibração. Os picos em 49 e 20 ppm são atribuídos ao C2 e C4 do PMAA, respectivamente. É também observado um decréscimo na intensidade de ambos os picos, quando a concentração de quitosana na síntese das nanopartículas é



aumentada. Com o aumento na quantidade de quitosana, uma maior quantidade de ácido é utilizada para solubilizá-las. Os outros picos, presentes nos espectros das nanopartículas, são atribuídos à estrutura da quitosana.

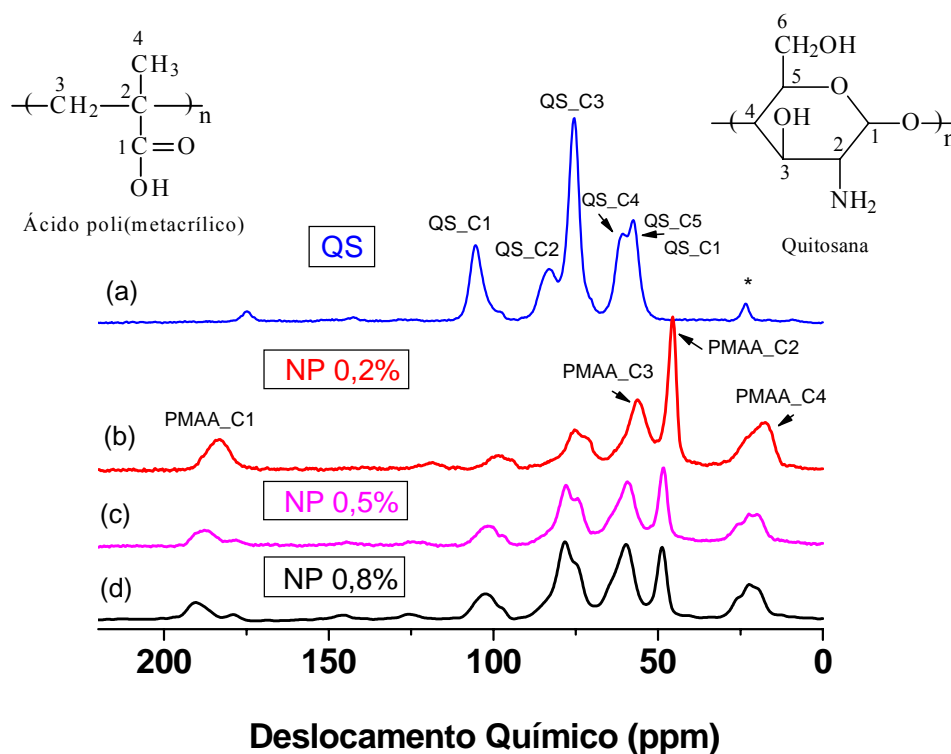


FIGURA 2.6: Espectro de  $C^{13}$  VACP-MAS: a) quitosana pura; b) 0,2% (m/v) de quitosana na síntese das nanopartículas; c) 0,5% (m/v) na síntese e d) 0,8% (m/v) na síntese. \* Corresponde ao grupo  $CH_3$  acetil residual.

#### 2.3.1.4. Análise do tamanho médio das partículas

Na TABELA 2.2, é apresentada a dependência entre a quantidade de quitosana na síntese e o tamanho médio das nanopartículas.

Nesta tabela observa-se que o diâmetro das partículas está diretamente relacionado com a quantidade de quitosana utilizada na síntese. Nas mesmas condições de preparação, quanto menor a massa de quitosana maior o tamanho

médio das partículas, variando de 111 nm quando foi utilizado 0,2 % m/v de quitosana até 60 nm para a massa de 0,8 % m/v.

TABELA 2.2: Valores de tamanho médio para as diferentes NPs de quitosana em pH = 4,0.

<b>Nanopartícula</b>	<b>Tamanho médio (nm)</b>
0,2 % m/v de QS	111 ± 4
0,5 % m/v de QS	82 ± 2
0,8 % m/v de QS	60 ± 4

A literatura mostra casos em que ocorre o aumento e também a diminuição do tamanho de partículas com a adição de maior quantidade de polímero na síntese.

No nosso trabalho a explicação foi baseada na determinação da razão molar COOH/NH<sub>2</sub>. Para COOH/NH<sub>2</sub> = 4,8/1, o tamanho de partícula foi de ≈ 110 nm (0,2 % m/v). Entretanto, quando a razão é de COOH/NH<sub>2</sub> = 1,2/1, o tamanho médio das partículas fica em torno de 60 nm (0,8% m/v). As partículas de QS-PMAA são formadas por ligações inter e intra-moleculares, entre grupamentos carboxil do ácido e aminos protonados da quitosana. Quando as nanopartículas são formadas através da razão COOH/NH<sub>2</sub> = 1,2/1, praticamente toda a quantidade do ácido MAA que remanescerá na solução (sem ser utilizado para solubilizar a quitosana) interage com os grupos protonados da quitosana. Nesse caso o tamanho das cadeias de PMAA que estão interagindo com as de QS é menor. Com o aumento da razão COOH/NH<sub>2</sub>, o tamanho das cadeias de PMAA deverá aumentar, resultando em expansão do volume da partícula (ver Fig. 2.4). Assim, os maiores tamanhos de partículas foram observados para razões de COOH/NH<sub>2</sub> maiores.

Explicação similar é apresentada por **HU et al. (2002)**, onde partículas menores formadas a partir de QS e ácido acrílico (AA) foram obtidas quando a razão AA/QS é 1/1.

Um fator interessante na pesquisa é o fato de que, na maioria dos trabalhos que sintetizam nanopartículas de quitosana, o tamanho médio dessas partículas foi superior a 125 nm (**LIU et al., 2005; TANG et al., 2003**). No presente trabalho obteve-se o tamanho de 60 nm, com possibilidade de controle de tamanho variando-se a quantidade de quitosana na síntese. Esse é um outro fator de grande importância, pois o campo da pesquisa se expande para várias outras aplicações que necessitam de partículas menores que 100 nm.

A distribuição do tamanho médio das partículas é unimodal com baixa polidispersidade, como pode ser observado na FIGURA 2.7.

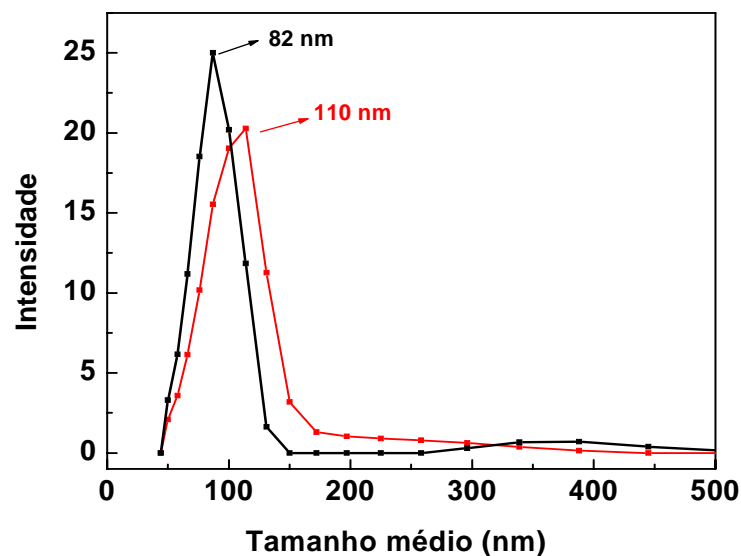


FIGURA 2.7: Distribuição do tamanho médio de nanopartículas de QS-PMAA com 0,5 % (82 nm) e 0,2 % m/v (110 nm) de quitosana.

Informações relevantes sobre a estabilidade de suspensões nanoparticuladas podem ser obtidas mediante o monitoramento do pH, em função do tempo. Por exemplo, a alteração do pH pode ser indício de degradação do polímero (SCHAFFAZICK et al., 2003). Em um trabalho realizado por CALVO et al. (1997), foi verificada uma diminuição da massa molar do polímero policaprolactona em suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas, após 6 meses de armazenamento, com conseqüente diminuição do pH destas formulações.

Outras informações são a respeito da variação de tamanho médio das partículas, que pode ser obtido com a variação do pH nas soluções.

A FIGURA 2.8 apresenta a relação entre tamanho médio de partículas e pH, para suspensões de nanopartículas.

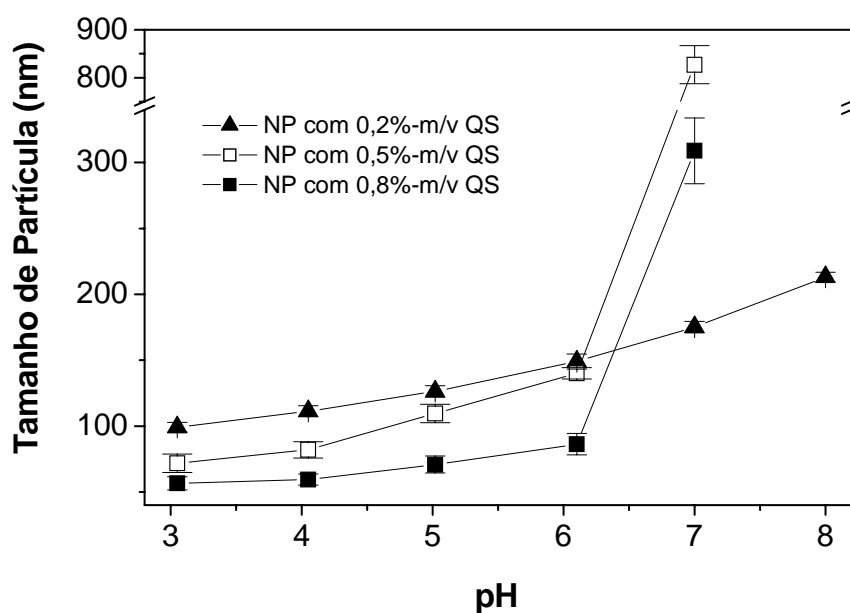


FIGURA 2.8: Dependência do tamanho de partícula com a variação de pH para concentrações de 0,2; 0,5 e 0,8% m/v de QS utilizadas na síntese.

Os tamanhos das nanopartículas aumentam com o aumento nos valores do pH da solução. Nanopartículas preparadas com 0,2 % m/v de quitosana

apresentam um aumento de tamanho de 99 para 218 nm com o aumento no pH da solução de 3,0 para 8,0. Há duas razões possíveis para essa transição. A primeira é que o aumento no pH aumenta o grau de ionização e densidade de carga das moléculas de PMAA e como consequência, as forças de repulsões eletrostáticas inter- e intra-moleculares aumentam. Através disso, por efeito de intumescimento, as partículas aumentam de volume. A segunda razão é o aumento da insolubilidade da quitosana com o aumento nos valores de pHs. Com o aumento da insolubilidade, a quitosana começa a se agregar na suspensão, aumentando os valores de tamanho médio medido no aparelho.

As nanopartículas com tamanho menor, com 0,5 e 0,8% (m/v) de QS, apresentam maior elevação de tamanho em pHs acima de 6. Esse fato ocorre devido a serem sistemas menores, com maior proximidade dos grupos carregados que fazem com que uns sentem mais a presença dos outros. Com isso, ocorre um aumento de tamanho maior devido a maior repulsão nesses sistemas.

Uma maior agregação das partículas em pH mais alcalino pode ser observada na micrografia representada na FIGURA 2.9.

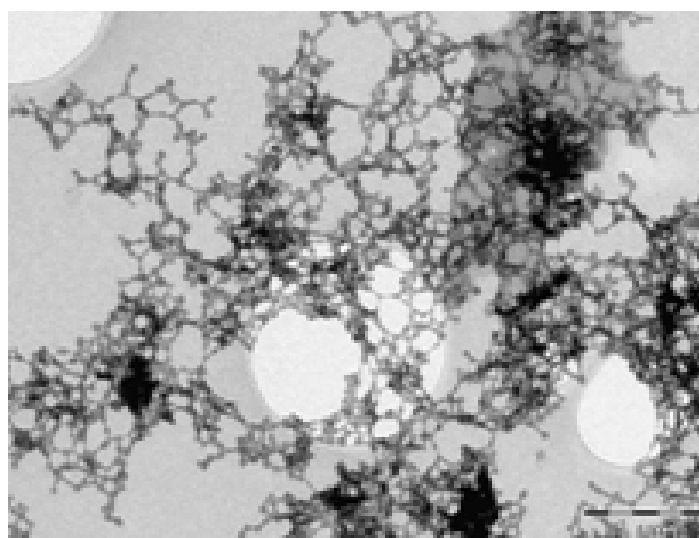


FIGURA 2.9: Micrografia de MET de nanopartículas de QS-PMAA preparadas com 0,2% (m/v) de QS na síntese, equilibrada em pH 8,0.

### **2.3.1.5. Análise do potencial zeta das partículas**

A estabilidade de uma suspensão depende das propriedades físicas das partículas coloidais que as constituem, sendo necessário determiná-las para a compreensão das interações individuais de cada partícula que podem levar a desestabilização de uma suspensão. Em geral, busca-se maximizar as forças repulsivas entre as partículas a fim de minimizar as interações que levam a formação de agregados, os quais desestabilizam as suspensões coloidais. Dessa forma, as forças de interação nas superfícies dos colóides são as responsáveis pelo comportamento das suspensões, sendo as forças eletrostáticas repulsivas uma das vias pelas quais as partículas podem resistir à agregação.

A maior parte dos materiais macroscópicos ou particulados em contato com um líquido adquire uma carga elétrica superficial, a qual pode ser gerada devido à dissociação de grupos ionogênicos presentes na superfície das partículas, ou devido à adsorção diferencial de íons da solução na superfície do colóide. Esta carga superficial influencia a distribuição dos íons próximos à superfície (**SHAW, 1975**). Considerando-se uma partícula carregada negativamente, íons de carga positiva (contra-íons) são atraídos pela superfície e formam uma rígida camada adjacente ao redor da mesma, conhecida como camada de Stern. Outros contra-íons são também atraídos pela partícula negativa, no entanto, são repelidos pela camada de Stern. Isto resulta em uma camada difusa de contra-íons caracterizada pela alta concentração de íons positivos próximos à partícula negativa e pela diminuição gradual desta concentração com o afastamento em relação à partícula carregada, até que seja atingido o equilíbrio com a concentração dos contra-íons em solução. De forma oposta, os íons negativos (co-íons) são repelidos pela superfície da partícula carregada negativamente, de maneira que na camada difusa há uma pequena concentração de co-íons próxima a partícula carregada. No entanto, a concentração de íons negativos tende a aumentar com o afastamento em relação à partícula

carregada, em função da diminuição do efeito repulsivo, até que o equilíbrio com a concentração dos co-íons em solução seja atingido (**HUNTER, 1988**).

Assim se constitui uma dupla camada elétrica a qual está dividida em duas regiões: uma interna que inclui íons fortemente ligados à superfície e uma região externa, onde a distribuição dos íons é determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e movimento térmico (**HUNTER, 1988**). Quando um campo elétrico é aplicado a uma suspensão, cada partícula e os íons mais fortemente ligados à mesma se movem como uma unidade eletrocinética, e o potencial determinado na superfície de cisalhamento (superfície imaginária constituída pelos contra-íons ligados à superfície da partícula, bem como por algumas moléculas do solvente também ligada à superfície) é chamado de potencial zeta (**HUNTER, 1988**), o qual pode ser utilizado para prever a tendência das partículas coloidais a agregação.

Na FIGURA 2.10 é apresentada a dependência dos valores de potencial zeta com variação no pH. As variações dos valores de potencial zeta com o pH resultam em mudanças na densidade de carga ao redor da partícula.

O potencial zeta positivo encontrado na superfície das partículas é devido às características catiônicas das cadeias de quitosana, em pH baixo. Com um aumento na concentração de quitosana, há um excesso de grupamento  $\text{NH}_3^+$  em relação aos grupamentos  $\text{COO}^-$ , o que resulta em nanopartículas com valores maiores de potencial zeta.

Com o aumento do pH para valores maiores que 4,6, um aumento nas cargas superficiais negativas é observado. Esse fato ocorre devido à ionização dos grupamentos  $\text{COO}^-$  do ácido PMAA e a neutralização dos grupamentos  $\text{NH}_2$  da QS.

Os resultados de potencial zeta são extremamente interessantes. Além de mostrarem que as nanopartículas QS-PMAA são sensíveis ao pH, mostram que controlando o pH a carga da superfície pode ser alterada de positiva para negativa.

Essa característica é muito importante, pois pode servir para entender e aplicar essas nanopartículas em sistemas como filmes de *self-assembled*, derivados de vários materiais de diferentes naturezas (BORATO et al., 2006; WU et al., 2006).

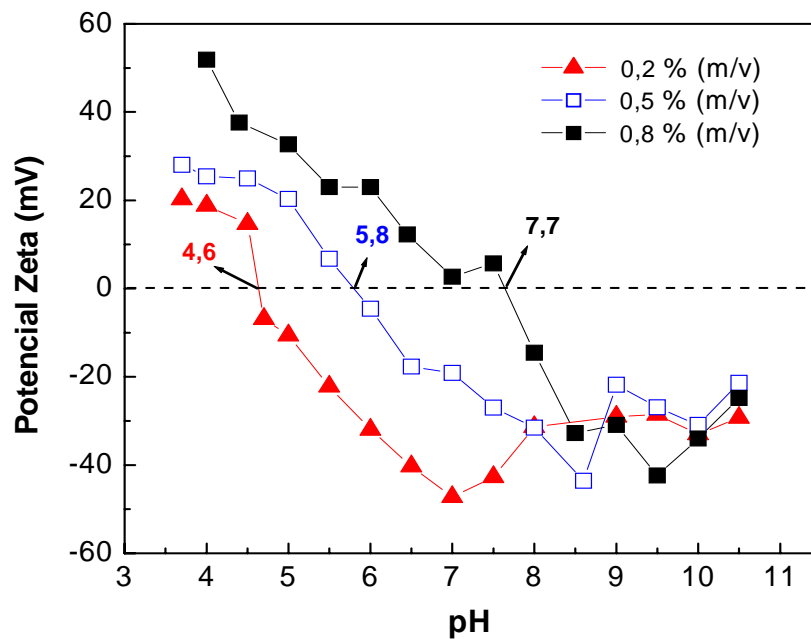


FIGURA 2.10: Dependência do potencial zeta com a variação do pH em suspensões de nanopartículas preparadas com 0,2; 0,5 e 0,8 % (m/v) de QS. As análises foram realizadas na temperatura de 25 °C.

Com base nesses dados comprovamos que nossos resultados de potencial zeta, estão de acordo com dados já relatados, de que o potencial zeta sofre variação com mudanças no pH de positivo para negativo. E, além disso, passa por uma região onde o sistema se torna instável, ou seja, valores próximos de potencial igual a zero.

Outro fato interessante no nosso trabalho é a grande estabilidade das soluções preparadas, ou seja, por um período de quatro meses nossa suspensão está estável, não apresentando indício do aparecimento de agregados. Esse tempo é



ainda maior para partículas preparadas com 0,2% de quitosana e que apresentam tamanho de 110 nm.

### **2.3.1.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

No Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), os elétrons transmitidos são usados para formar a imagem de microestrutura da amostra, resultante da interação entre os elétrons incidentes e a matéria. Este fenômeno ocorre devido ao espalhamento elástico dos elétrons pelo núcleo dos átomos da amostra, com a mesma energia do elétron incidente, mas com uma alteração na direção.

Todas as nanopartículas analisadas apresentam morfologia homogênea, com uniforme distribuição de tamanho de partículas e esféricos formatos, como apresentado na FIGURA 2.11.

Os tamanhos de partícula determinados pelas imagens de MET foram de 38, 50 e 78 nm para sistemas contendo 0,8; 0,5 e 0,2 % (m/v) de quitosana na síntese. Os tamanhos são menores que os medidos por FOQELS (60-110 nm em pH = 4,0). Para a análise de MET a suspensão de nanopartícula é gotejada sobre uma grade e deixada evaporar na temperatura ambiente, para só depois ser realizada a análise. Com a evaporação, a água presente na nanopartícula é eliminada e esta sofre uma contração, diminuindo de tamanho. Assim a análise de MET não é muito recomendada para a determinação do tamanho das nanopartículas em solução, mas sim no estado seco indicando também a homogeneidade e forma das NPs.

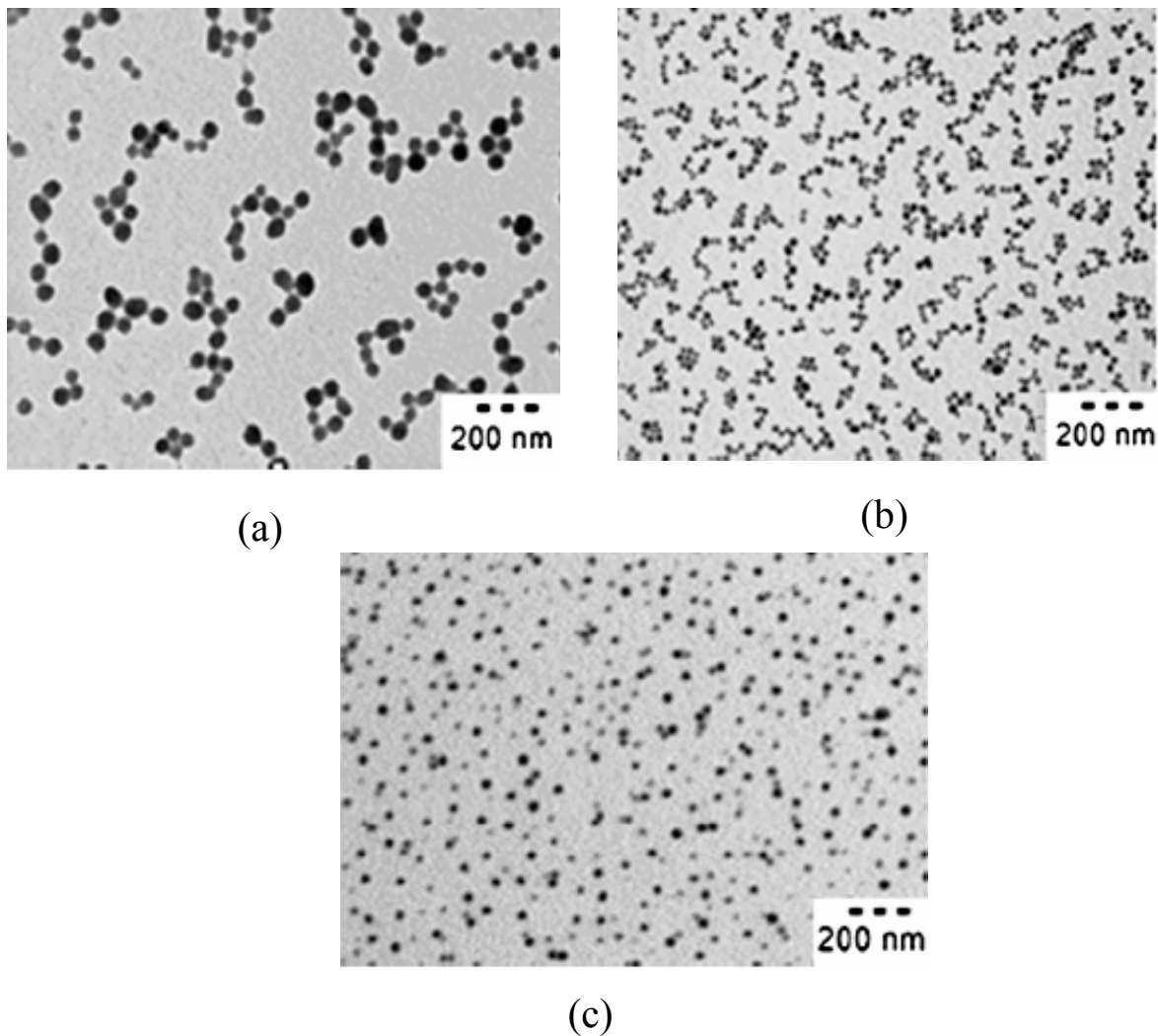


FIGURA 2.11: Micrografias de MET das nanopartículas de quitosana preparadas com (a) 0,2; (b) 0,5 e (c) 0,8 (m/v) de quitosana a  $\text{pH} \approx 4$ .

Com o objetivo de avaliar a característica morfológica das nanopartículas variando-se o  $\text{pH}$ , foram analisadas as micrografias da NP com 0,2% (m/v) de QS no  $\text{pH} 7$ . As micrografias de MET das nanopartículas de QS são mostradas nas FIGURA 2.12a e 2.12b (em  $\text{pH} 7,0$  e  $8,0$  respectivamente).

Pode ser observado que em altos valores de  $\text{pH}$ s, as nanopartículas apresentam maior facilidade de aglomeração. As nanopartículas de QS-PMAA são formadas por interação entre as cargas positivas da quitosana e negativas do ácido.

Por essa razão, como discutido anteriormente, com um aumento do pH alguns fatores contribuem para a aglomeração. O primeiro fator é a insolubilidade da quitosana em pHs básicos, o que ocasiona uma separação de fases no sistema, e um segundo fator é o maior número de carga negativa no sistema, que passa a apresentar forças repulsivas, diminuindo a estabilidade e aumentando a facilidade de aglomeração.

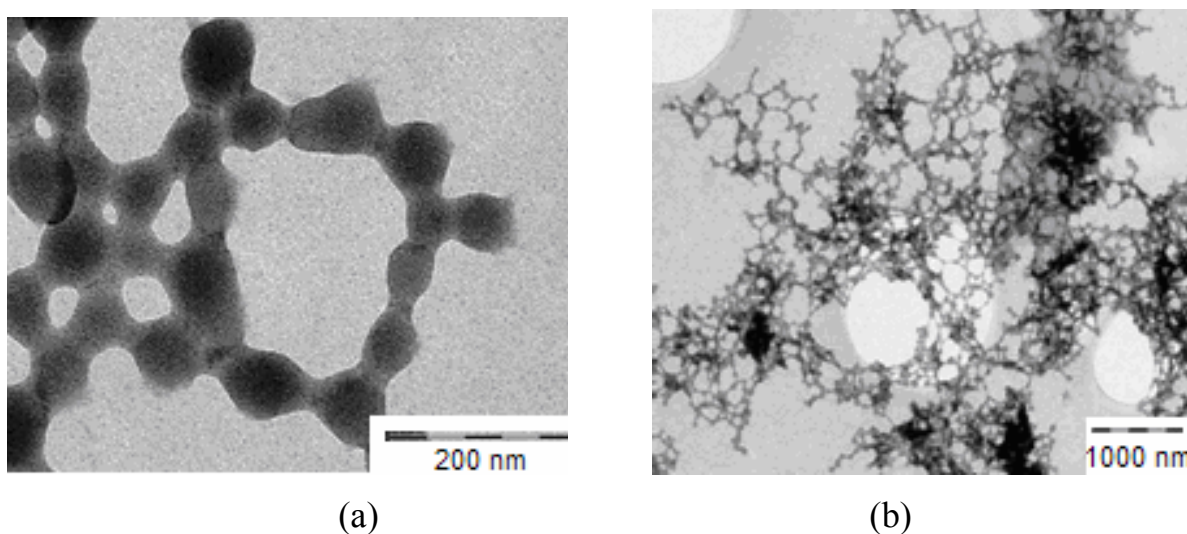


FIGURA 2.12: Micrografias de MET de nanopartículas de Q sintetizadas com 0,2% (m/v) em pH = 4,0 e equilibradas após a síntese em a) pH= 7,0 e b) pH= 8,0.

### 2.3.1.6. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Na FIGURA 2.13 é apresentado um termograma de DSC para os três diferentes tamanhos de partículas e quitosana pura.

A curva de DSC da quitosana pura apresenta dois picos. O primeiro um pico endotérmico em 123 °C, que é atribuído à evaporação da água absorvida pelo material através de ligações de hidrogênio com os grupamentos hidroxilas da quitosana.

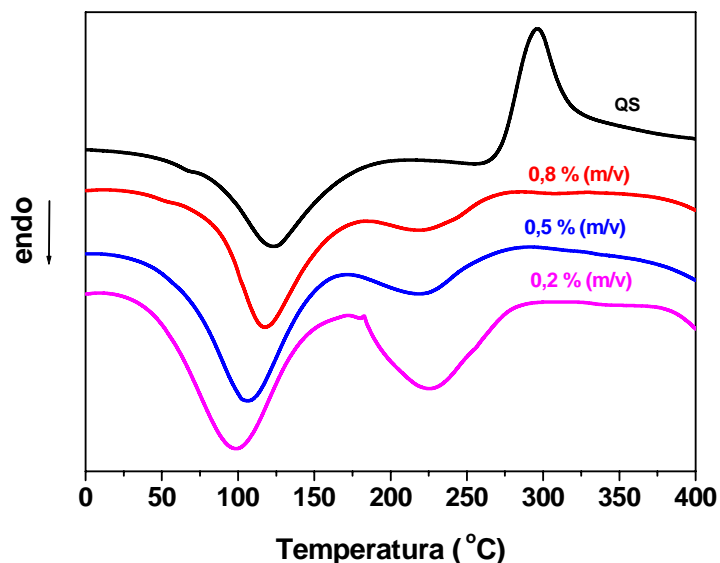


FIGURA 2.13: Curva de DSC para quitosana pura e nanopartículas sintetizadas com 0,2; 0,5 e 0,8% (m/v) de QS. A programação utilizada para todas as análises foi: rampa de aquecimento de  $-20$  até  $450$  °C; razão de  $5$  °C/min sob atmosfera de nitrogênio com vazão de  $50$  mL/min.

Nas demais curvas que descrevem as características das nanopartículas, a temperatura referente a esse pico depende da composição das nanopartículas. Um decréscimo na quantidade de quitosana utilizada na síntese das partículas ocasiona uma diminuição no valor de temperatura referente a esse pico. Ou seja, menor quantidade de quitosana, menor número de hidroxilas que entram em contato com a água, conseqüentemente diminuição na temperatura do pico endotérmico.

O segundo pico, exotérmico em  $295$  °C corresponde ao processo de decomposição. As nanopartículas sintetizadas a partir de solução contendo  $0,2\%$  (m/v) de QS apresentaram pico endotérmico de desidratação em  $98$  °C. A medida que é aumentada a concentração de quitosana é observado um deslocamento nos

valores dos picos de desidratação: para 0,5% (m/v) em 107 °C e 0,8% (m/v) em 117 °C. Assim com o aumento de QS na síntese das NPs ocorre um deslocamento dos valores do pico de desidratação em direção aos valores apresentados para QS pura.

Na literatura **BORGES et al. (2005)** reportam que picos na região de 180 a 290 °C são atribuídos à quebra da interação entre grupamentos  $\text{NH}_3^+$  da QS e  $\text{COO}^-$  do ácido. Portanto, a área total dessa região nos fornece o calor necessário ( $\Delta H$ ) para romper essa interação.

Na TABELA 2.3 são apresentados os valores de  $\Delta H$  para as diferentes nanopartículas sintetizadas. Nas nanopartículas contendo 0,2% (m/v), o valor de  $\Delta H$  é de 188 J g<sup>-1</sup>. Para NP com 0,5% (m/v) obteve-se  $\Delta H$  igual a 64,3 J g<sup>-1</sup>. Já NP sintetizadas a partir de 0,8% (m/v) o valor de  $\Delta H$  é de 36,8 J g<sup>-1</sup>.

TABELA 2.3: Valores de  $\Delta H$  para as diferentes NPs de quitosana.

Nanopartícula	$\Delta H$ (J g <sup>-1</sup> )
0,2 % m/v de QS	188,0
0,5 % m/v de QS	64,3
0,8 % m/v de QS	36,8

Dessa forma nanopartículas sintetizadas com menor quantidade de QS, apresentam maior estabilidade térmica. Isto é devido à maior estabilidade do PMAA e baixa carga superficial quando comparada a NP sintetizada com alta quantidade de QS.

### 2.3.1.7. Termogravimetria (TG)

Análises de TG são eficientes técnicas para avaliar a estabilidade térmica das nanopartículas. Curvas de TG da quitosana e nanopartículas estão demonstradas na FIGURA 2.14.

No início das curvas é mostrada a diferença da eliminação de voláteis em cada amostra. Essa eliminação é praticamente a mesma para as nanopartículas e um pouco maior para QS pura, devido à interação forte de pontes de hidrogênio entre moléculas de quitosana e água.

À medida que a temperatura aumenta a massa se mantém constante até cerca de 240 °C para QS pura. Essa temperatura corresponde ao início da temperatura de degradação ( $T_d$ ).

A temperatura de degradação ( $T_d$ ) para QS e nanopartículas de QS sintetizadas com 0,2 % (m/v) de QS foi de  $240 \pm 2,0$  °C e  $241 \pm 2,3$  °C, respectivamente.

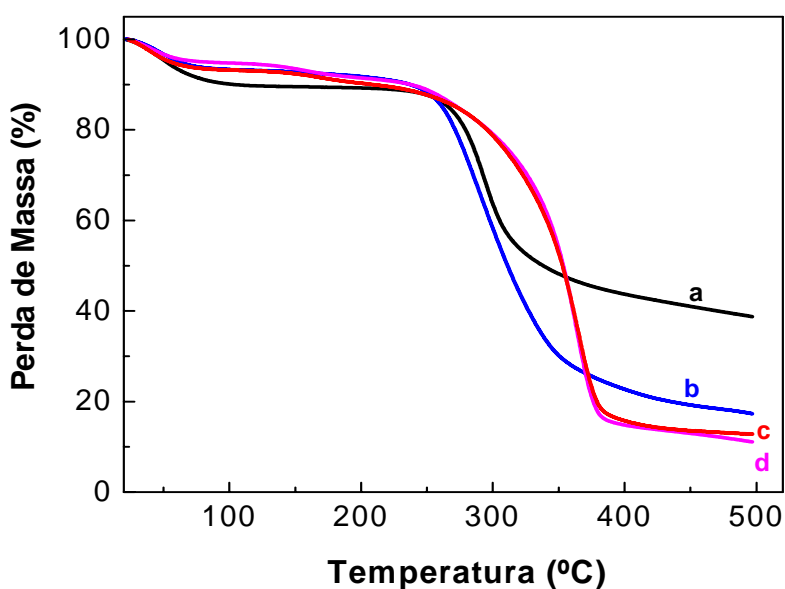


FIGURA 2.14: Curvas de TG para (a) QS, nanopartículas de QS com (b) 0,2; (c) 0,5 e (d) 0,8 % (m/v). As curvas foram obtidas nas seguintes condições: rampa de aquecimento de 20 até 500 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min para cada amostra; vazão de nitrogênio mantida em 60 cm<sup>3</sup>/min.

Com um aumento na quantidade de QS utilizada na síntese das nanopartículas, um aumento na  $T_d$  foi observado. Para nanopartículas sintetizadas com 0,5 e 0,8 % (m/v) de quitosana na síntese os valores de  $T_d$  encontrados foram de  $242 \pm 2,5$  e  $251 \pm 2,3$  °C, respectivamente. Esses resultados indicam que nanopartículas de QS-PMAA são mais estáveis termicamente, que o polímero quitosana puro.

## 2.3.2. Nanopartículas QS-TPP

### 2.3.2.1. Análise de FT-IR

As características moleculares da QS, TPP e nanopartículas de QS-TPP estão demonstradas no espectro de FT-IR representado na FIGURA 2.15.

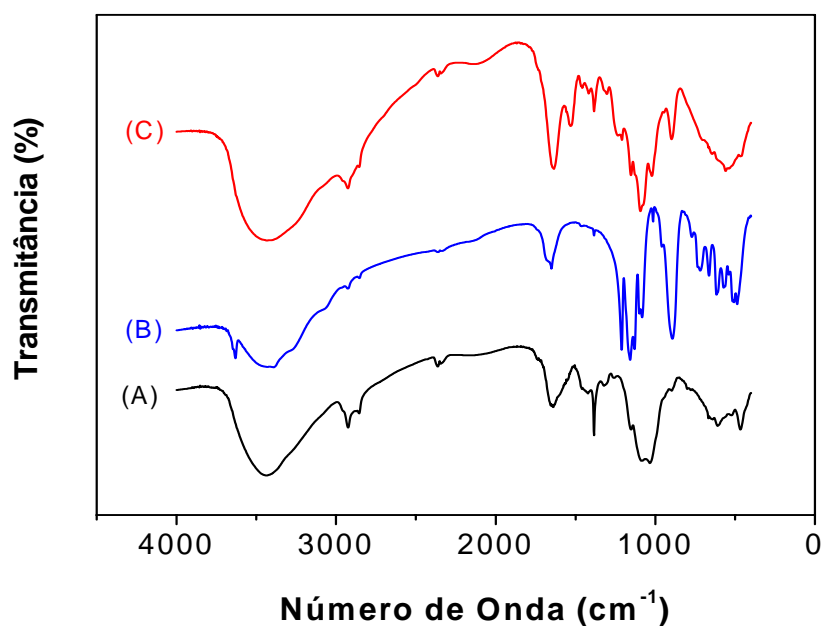


FIGURA 2.15: Espectro de FT-IR da quitosana (A); TPP (B) e nanopartículas QS-TPP(C).

O espectro da quitosana pura (Fig. 13.2a) apresenta picos característicos:  $3435\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento do  $\text{NH}_2$  e grupo OH;  $1649\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento da ligação C=O de amina I;  $1083 - 1020\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento do C-O e  $620\text{ cm}^{-1}$ , devido às vibrações dos anéis piranosídicos, de acordo com a literatura (TONHI e PLEBIS, 2002). No espectro referente as nanopartículas QS-TPP (C) o pico em  $3430\text{ cm}^{-1}$  indica que ocorrem no sistema ligações de hidrogênio (JIA-HUI et al. 1999). O pico em  $1530\text{ cm}^{-1}$  no espectro das nanopartículas é um indicativo da interação entre grupos  $\text{NH}_3^+$  da quitosana e grupos fosfatos do TPP. No espectro das NPs pode ser visto ainda, o estiramento referente ao grupamento P=O, do TPP que aparece em  $1219\text{ cm}^{-1}$ . O aparecimento desse pico no espectro das NPs é um indicativo da formação dessas, uma vez que aparecem tanto características da quitosana quanto do TPP.

### 2.3.2.2. Tamanho médio de Partículas

A variação na concentração dos materiais formadores das nanopartículas influencia no tamanho final dessas partículas. Na TABELA 2.4 é apresentada a influência das concentrações finais de QS e TPP no tamanho das NPs.

Um aumento no tamanho da partícula foi observado com um aumento na concentração de QS e TPP. Com um aumento na concentração de QS, ocorre um pequeno aumento da viscosidade na solução de síntese, o que favorece a formação de partículas maiores (JAWAHAR e BALASUBRAMANIAN, 2006). O líquido mais viscoso dificulta as interações entre os materiais que formam as NPs, favorecendo a formação de partículas maiores, ou seja, que não necessitam de energia favorável à formação. As NPs com tamanho menor (85nm) foram às obtidas com a utilização de menor concentração de QS e TPP na síntese das partículas.



TABELA 2.4: Influência da concentração de QS e TPP no tamanho de partícula.

<b>Concentração de QS (mg mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração de TPP (mg mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tamanho de Partícula (nm)</b>
2,14	0,3	85
2,14	0,6	110
3,15	0,6	221

O efeito da concentração de QS e TPP no tamanho final das NPs e parâmetros que afetam o tamanho de partículas já foram relatados na literatura. **CALVO et al. (1997)** relataram que o tamanho dessas partículas depende de ambas as concentrações, tanto de QS quanto de TPP. **GAN et al. (2005)** estudaram a diferença entre partículas associadas com proteína, tipo albumina do soro bovino (BSA) e partículas sem BSA. Partículas carregadas com BSA apresentam tamanho maior que partículas sem o carregamento. Esse fato ocorre devido à alta massa molar e tamanho das moléculas de proteínas.

### **2.3.2.3. Potencial Zeta**

Para analisarmos a estabilidade dos sistemas coloidais dessas NPs, determinamos os valores de potencial zeta, para as três composições sintetizadas.

Na análise de potencial zeta, verificou-se que as partículas têm carga superficial positiva, em pH ácido (pH  $\approx$  4,5) e que a carga superficial das partículas não variou significativamente com mudanças na composição como mostra a TABELA 2.5.

TABELA 2.5: Influência da concentração de QS e TPP nos valores de potencial zeta.

Concentração de QS (mg mL <sup>-1</sup> )	Concentração de TPP (mg mL <sup>-1</sup> )	Potencial zeta (mV)
2,14	0,3	+ 43
2,14	0,6	+ 40
3,15	0,6	+ 40

De acordo com dados da literatura (**LÓPEZ-LEÓN et al., 2005**), as partículas de QS-TPP apresentam um decréscimo nos valores de potencial zeta com aumento do pH, com ponto isoelétrico próximo do pH = 8,0. Esses dados foram relatados também por outros autores na literatura (**GAN et al., 2005**).

A carga positiva, como relatada anteriormente, é uma característica das NPs de QS. A estabilidade do sistema é comprovada, uma vez que o valor de potencial zeta de um sistema considerado estável eletrostaticamente deve ter um valor (em módulo) maior que 20 mV.

#### **2.3.2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

As micrografias de MET têm sido muito empregadas na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das NPs. A MET pode permitir também a diferenciação entre nanocápsulas e nanoesferas, possibilitando, inclusive, a determinação da espessura da parede das nanocápsulas (**SCHAFFAZICK et al., 2006**).

Na FIGURA 2.16 pode-se avaliar a forma e tamanho das suspensões de nanopartículas QS-TPP através de análise de MET.

Através da análise da micrografia podemos observar que as NPs apresentam tamanho de partícula de cerca de 45nm (devido à análise em sistema seco) e forma esférica. Além disso, comprova que realmente o sistema apresenta partículas de tamanho nanométrico.

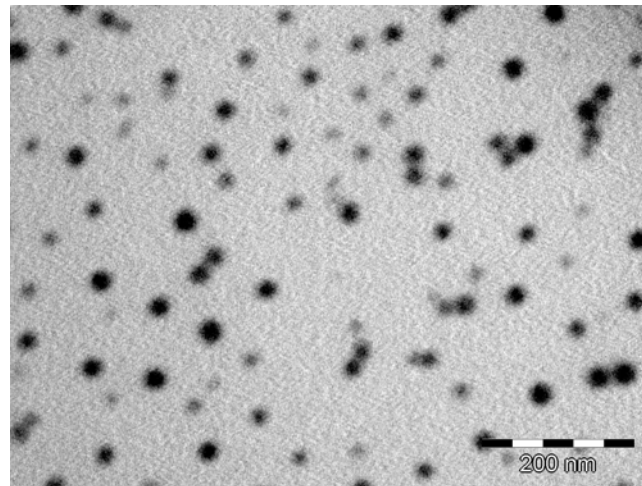


FIGURA 2.16: Micrografia eletrônica de transmissão de nanopartículas sintetizadas a partir de  $3,00 \text{ mg L}^{-1}$  de QS e  $1,2 \text{ mg L}^{-1}$  de TPP (85 nm).

A análise de MET é muito importante em sistemas nanométricos, pois como medidas de tamanho em solução, nos dá uma idéia da quantidade de partículas e tamanho nanométrico do sistema. A única peculiaridade é que, como as medidas de tamanho são realizadas em sistemas secos, após a evaporação da água existente na suspensão, os valores de tamanho analisados representam valores da amostra seca e não equivale aos em solução. Uma vez que a água presente em suspensões de nanopartículas é evaporada, essas sofrem um processo de murchamento, pois uma certa quantidade de água é retida pela partícula, causando uma diminuição de tamanho em relação ao tamanho normal dessa em solução.

## 2.4. Conclusões

As nanopartículas QS-PMAA foram sintetizadas com sucesso, através da polimerização de ácido metacrílico na presença de solução de quitosana. Análises de espectroscopia FT-IR e de  $^{13}\text{C}$  VACP-MAS das NPs, indicaram a presença de sinais atribuídos a grupos da quitosana e de PMAA. O que mostra o sucesso nas sínteses das nanopartículas, através da formação do complexo de polieletrólito.

O tamanho de partícula foi dependente da concentração de quitosana utilizada na preparação das nanopartículas e fortemente influenciada pela variação de pH na solução. Essa variação de tamanho é devido ao grau de ionização e densidade de carga das moléculas de PMAA, que resultam em um aumento no tamanho médio das nanopartículas por efeito de intumescimento.

Análises de potencial zeta viabilizam a aplicação dessas NPs (QS-PMAA) nas mais diversas áreas, pela variação de potencial zeta com o pH que o sistema nos proporciona. Microscopias eletrônicas de transmissão (MET) mostraram que nanopartículas de QS-PMAA apresentaram morfologia homogênea em forma e distribuição de tamanho, com predominância da forma esférica. A partir dos resultados de DSC, nas diferentes condições estudadas, obtiveram-se alguns parâmetros interessantes, da dependência da quantidade de quitosana na síntese com a maior estabilidade das NPs. Maior quantidade de quitosana resulta em NPs com menor estabilidade.

Resultados adquiridos através de análises de TGA indicaram que nanopartículas de QS-PMAA são mais estáveis termicamente que o polímero quitosana puro.

A síntese das nanopartículas de QS-TPP pelo método de gelatinização ionotrópica foi realizada com sucesso.

A partir das análises de FT-IR, atribuiu-se a formação das nanopartículas a gelatinização iônica ocorrida entre o grupamento catiônico da quitosana ( $\text{NH}_3^+$ ) e aniônico do TPP ( $\text{POO}^-$ ). O tamanho médio das partículas é fortemente dependente da concentração de QS e TPP utilizada na síntese.

Não observou-se mudanças significativas nos valores de potencial zeta com variação nas concentrações de QS e TPP. As micrografias de MET demonstraram que as partículas estão distribuídas de forma homogênea em tamanho e forma.

A possibilidade de sintetizar nanopartículas com diferentes tamanhos, variando a concentração do material na síntese é de grande importância, pois isso permite otimizar as propriedades e o campo de aplicação dessas nanopartículas.

**CAPÍTULO III: Síntese e Caracterização de**  
**Filmes de Hidroxipropil Metilcelulose Contendo**  
**Nanopartículas de Quitosana e Poli(ácido**  
**metacrílico)**

### **3.1. Introdução**

A pesquisa em nanotecnologia é uma área multidisciplinar e alguns resultados estão sendo aplicados em produtos já comercializados, após testes (**JANG e LEE, 2008; RIMANN et al., 2008**). O aumento da demanda por produtos de alta qualidade, juntamente com capacidade de vida longa de prateleira, força o setor de alimentos a desenvolver novas estratégias em alimentos (**DOGAN e MCHUGH, 2007; SOTHORNVIT et al., 2009; SOZER e KOKINI, 2009**). Com esses objetivos a indústria vem aplicando vários polímeros biodegradáveis (proteínas, polissacarídeos e lipídios) em filmes comestíveis, que com base na literatura, devem servir como materiais para embalagens (**CHEN et al., 2009; MONEDERO et al., 2009**).

Há cerca de 10 anos, muitos pesquisadores em todo mundo estão focalizando suas pesquisas e desenvolvendo filmes comestíveis e embalagens para alimentos, cada vez mais sofisticadas em termos de qualidade (**KROCHTA e MULDER-JOHNSTON, 1997; SUBRAMANIAN et al., 2007; CONCETTA et al., 2007; LEE et al., 2008; DEL NOBILE et al., 2008**). Com base nessas pesquisas, polissacarídeos como hidroxipropil metilcelulose (HPMC) e quitosana (QS) estão sendo largamente estudados (**BELALIA et al., 2008**).

O derivado de celulose HPMC é um promissor material para ser aplicado em filmes para alimentos. HPMC é um polímero solúvel em água, utilizado na indústria de alimentos como agente gelificante e estabilizante. Entretanto filmes de HPMC apresentam pobres propriedades mecânicas e de barreira de água (**PÉREZ et al., 2008**).

Filmes comestíveis são camadas finas de materiais formados diretamente na superfície do produto, sendo usados para substituir o revestimento de cera de proteção natural e para reduzir a perda de água de frutas e hortaliças. Nem sempre eles podem substituir materiais de embalagem sintética, não

comestível, mas servem como adjunto para proporcionar maior qualidade, estendendo a vida-de-prateleira e possibilitando economia com materiais de embalagem (AZEREDO et al., 2000; SOBRAL, 2000; MIN et al., 2008). Filmes comestíveis e para revestimentos devem ajudar a manter a qualidade dos alimentos depois que a embalagem sintética é aberta, protegendo contra mudanças de umidade, oxigênio e perda de aroma. Os filmes devem apresentar resistência adequada à ruptura e à abrasão permitindo uma boa proteção do alimento sem perder qualidade por manuseio. Eles também devem ser flexíveis o suficiente para se adaptar às eventuais deformações dos alimentos, sem danos mecânicos.

Um problema da agroindústria de alimentos é a perda de qualidade durante o armazenamento, transporte e distribuição de alimentos frescos, pré-cortados e embalados ( $\approx 30\%$  do produto é perdido). Muitas embalagens flexíveis são feitas com plásticos, isto é, materiais sintéticos, que apesar de possuírem excelentes propriedades funcionais, são considerados não-biodegradáveis e estão envolvidos em problemas de gerenciamento de resíduos sólidos municipais. A biodegradação do polietileno, por exemplo, é estimada em 200 anos (TORRES, 1994). Por isso, a produção de embalagens biodegradáveis comestíveis ou não para alimentos é um fato extremamente importante no mundo atual. Por esses fatores, a pesquisa em nanotecnologia aplicada em embalagens é algo de extrema importância e interesse no campo mundial, pois a exigência dos consumidores é cada vez maior, assim como o interesse em trabalhar e desenvolver materiais não prejudiciais ao ambiente, mas para uma maior preservação.

Essa etapa do trabalho tem como objetivo, incorporar nanopartículas de quitosana em filmes de HPMC, a fim de melhorar propriedades mecânicas e de barreira desses filmes, além da obtenção de um filme biodegradável.



## 3.2. Materiais e Métodos

### 3.2.1. Materiais

- Quitosana; a quitosana utilizada foi da Polymar, Fortaleza-Brasil. (MW= 71,3 kDa, grau de desacetilação 94%).
- Persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ); obtido da Aldrich (St. Louis, USA).
- Ácido metacrílico (MAA); obtido da Aldrich (St. Louis, USA).
- Hidroxipropil Metilcelulose (HPMC); obtido apartir da Dow Chemical Co. (Midland, Mich., U.S.A.).

### 3.2.2. Métodos

#### 3.2.2.1. Preparação dos filmes

Para o preparo dos filmes foi empregada a técnica de “*casting*”, que consiste no preparo de solução coloidal composta de água, HPMC com e sem nanopartículas, depositado em um suporte, seguida de secagem conforme mostra a FIGURA 3.1.

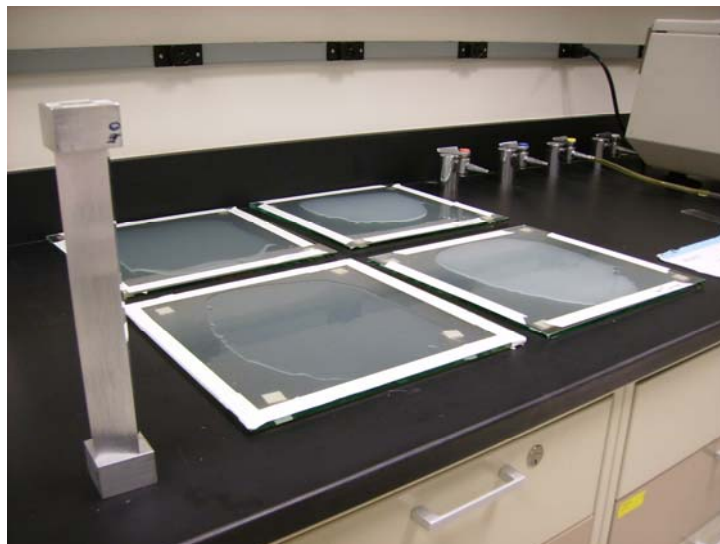


FIGURA 3.1: Fotografia do esquema de preparação do filme de HPMC.

A solução de HPMC (filme controle) foi obtida dissolvendo-se 3,0g de HPMC em 100 mL de água destilada sob agitação magnética por 12 horas. A fim de estudar o efeito do tamanho e concentração de partículas na formação dos filmes, diferentes tamanhos e concentrações de partículas foram adicionadas na solução de HPMC. Depois das soluções filmogênicas preparadas, esta foi acondicionada em temperatura ambiente por 6 horas para degasagem. A solução foi colocada sobre uma placa de vidro (30 x 30 cm) recoberta com um filme de polietileno. As espessuras dos filmes foram ajustadas com uma barra de nível (0,5 mm) e as placas deixadas sobre uma superfície plana em temperatura ambiente por 24 horas. Após os filmes secos, esses foram retirados das placas e alocados em sacos plásticos, para proteção de agentes externos.

### **3.2.2.2. Caracterização dos Filmes**

#### **3.2.2.2.1. Determinação da espessura**

As medidas das espessuras dos filmes foram realizadas utilizando um micrômetro digital (No. 7326, Mitutoyo Manufacturing, Japan) em 5 diferentes pontos ao redor do filme. Os valores obtidos foram utilizados para calcular a permeabilidade de vapor de água e propriedades mecânicas.

#### **3.2.2.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Foi utilizado um microscópio Hitachi S-4700 (Hitachi High-Tech Corp., Tokyo, Japan), para analisar propriedades morfológicas dos filmes contendo nanopartículas. As amostras dos filmes foram depositadas em um porta amostras, contendo fita de carbono (Ted Pella Inc., Redding, CA, U.S.A.) e recobertas com ouro (Denton Vacuum Inc., Moorestown, NJ, U.S.A.) por 45 s em 20 mA. Todas as amostras foram examinadas utilizando 1,5 kV. As magnificações foram de 10, 20 e 60k.

### 3.2.2.2.3. Solubilidade do filme em água

Para determinação da solubilidade do filme em água utilizou-se um procedimento modificado por **GONTARD et al. (1992)**. Aproximadamente 150 mg da amostra foram pesadas e secas em forno ( $100 \pm 2$  °C, 24 h) para obter a massa seca inicial do filme. O filme seco após pesagem foi imerso em 50 mL de água deionizada contendo 0,02 % (mm) de azida de sódio (para prevenir o crescimento de microorganismo) e agitada vagarosamente ( $20 \pm 2$  °C, 24 h). Os filmes em água foram monitorados de tempo em tempo, no final de 24 horas, a parte de filme insolúvel foi separada por centrifugação a 5000 rpm e retirada da solução para secagem ( $100 \pm 2$  °C, 24 h), a fim de determinar a massa seca que não foi solubilizada. A massa de filme que solubilizou foi calculada com base na equação 3.1 e tratada como sendo a percentagem de filme que solubiliza-se em água (**PÉREZ-GAGO e KROCHTA, 2001**):

$$\text{Solubilidade em água (\%)} = \frac{\text{massa seca inicial} - \text{massa do filme não solubilizado}}{\text{massa seca inicial}} \times 100 \quad (3.1)$$

### 3.2.2.2.4. Propriedades Mecânicas

O teste mais comumente realizado para a determinação da resistência mecânica de filmes é o teste de tensão x deformação sob tração. As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas pelos testes de tração. Os filmes foram deixados em ambiente com 30% umidade relativa a 24 °C por 48 horas, antes dos testes de tração. Os filmes foram cortados em forma retangular nas dimensões de acordo com o método ASTM D882-97: 15 mm de largura e 100 mm de comprimento. O equipamento utilizado para a análise foi um Instron Universal Testing Machine (Model 1122, Instron Corp., Canton, Mass., U.S.A.). A

propriedade mecânica dos filmes foi avaliada com base na concentração e tamanho de partículas. As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas com relação à tensão ( $\sigma$ ) e módulo de elasticidade (E) em temperatura ambiente, de acordo com o método ASTM D882-97. A velocidade de tracionamento utilizada foi de 50 mm/min.

A deformação ( $\varepsilon$ ) dos filmes foi determinada pela equação abaixo:

$$\varepsilon = \ln\left(\frac{L}{L_0}\right) \quad (3.2)$$

onde L e  $L_0$  são os comprimentos de alongação do filme durante o experimento e o comprimento inicial do filme, respectivamente.

A tensão ( $\sigma$ ) foi determinada medindo-se a força necessária para romper o filme. Os valores de  $\sigma$  foram calculados utilizando a equação abaixo:

$$\sigma = \frac{F}{S} \quad (3.3)$$

onde F é o valor da força de ruptura exercida e S é a área seccional do filme.

O módulo de elasticidade (E) foi calculado a partir da inclinação inicial da curva obtida tensão-deformação ( $\sigma$  vs  $\varepsilon$ ). As propriedades mecânicas foram avaliadas com base na concentração e tamanho das partículas.

#### **3.2.2.2.5. Permeabilidade ao Vapor de Água (WVP)**

Uma das mais importantes propriedades de um filme comestível é a permeabilidade ao vapor de água (WVP), que é definida pelo "Annual Book of Standards" (ASTM E96-80), como a taxa de transmissão de vapor de água por

unidade de área de um material delgado, de espessura conhecida, induzida por uma diferença de pressão entre duas superfícies específicas, sob condições de temperatura e umidade relativa. Valores de permeabilidade ao vapor de água foram determinados a partir do método modificado ASTM E96-92, utilizado para determinar a umidade relativa (RH) do filme, descrito na literatura por **MCHUGH et al. (1993)**. Para cada tratamento são utilizados quatro filmes (4 replicatas) que são cortados em forma circular (15,5 cm de diâmetro). Na parte interna de placas de Teflon<sup>®</sup> adicionaram-se 6 mL de água destilada. Sobre a água, o filme foi fixado na placa com cola de silicone, outra placa foi colocada sobre a primeira e fixada com quatro parafusos. As placas fora, alocadas em um gabinete com controle de umidade utilizando sulfato de cálcio (0 % RH) (W.A. Hammond Drieritr Co., Xenia, Ohio, U.S.A.). As massas das placas foram pesadas periodicamente e anotadas para o cálculo das propriedades requeridas.

A umidade relativa foi calculada com base nas equações de 3.4 até 3.6:

$$\text{Veloc. de transmissão do vapor de água (WVTR)} = \frac{\text{perda de massa por tempo}}{\text{área do filme}} \quad (3.4)$$

$$\text{WVTR} = \frac{mw.P.D.\ln[(P - p_2)/(P - p_1)]}{R.T.z} \quad (3.5)$$

$$\text{RH}_{\text{underside}} = \frac{p_2}{p_1} \times 100 \quad (3.6)$$

onde mw é a massa molar da água (18 g /g mol), P é a pressão total (1 atm), D é a difusividade de vapor de água através do ar a 298 K (0,102 m<sup>2</sup> /s), p<sub>1</sub> é a pressão saturada de vapor a 298 K (0,0313 m<sup>2</sup>/ s), p<sub>2</sub> é a pressão parcial da face inferior do

filme, R é a constante dos gases ( $82,1 \times 10^{-6} \text{ m}^3 \text{ atm/g mol K}$ ), e z é a altura média atingida pelo gás inerte.

Permeabilidade ao vapor de água (WVP) foi calculada com base na seguinte equação 3.7:

$$\text{WVP} = \frac{\text{WVTR}}{(p_2 - p_3)} y \quad (3.7)$$

onde y é a espessura média dos filmes e  $p_3$  é pressão parcial de vapor do lado superior do filme.

#### **3.2.2.2.6. Permeabilidade ao Oxigênio (O<sub>2</sub>P)**

A taxa de transmissão de oxigênio foi determinada utilizando um aparelho OX-TRAN 2/20 (Modern Controls Inc., Minneapolis, MN) a 25 °C a partir do método padrão D3985 (ASTM, 1995) com uma umidade relativa de  $55 \pm 1\%$ . Cada filme foi fixado em um suporte com uma área de abertura de  $5 \text{ cm}^2$ . As amostras do filme, no instrumento de medida, foram submetidas a 100% de gás oxigênio de um lado e de um gás de arraste contendo 98% de nitrogênio e 2% de hidrogênio do outro lado. O equilíbrio foi programado para 10 horas de experimento. A permeabilidade ao oxigênio foi calculada, dividindo a taxa de transmissão de O<sub>2</sub> pela diferença da pressão parcial de O<sub>2</sub> entre ambos os lados do filme e multiplicando pela média das espessuras dos filmes. Quatro replicatas de cada filme foram avaliadas. A unidade utilizada para as medidas de O<sub>2</sub>P é  $\text{cm}^3 \mu\text{m/m}^2 \text{ d kPa}$ .

#### **3.2.2.2.7. Termogravimetria (TG)**

A temperatura de degradação foi analisada em um TGA Q-500. Utilizou-se uma massa de amostra de 6-7 mg. Os experimentos foram realizados na

faixa de temperatura de 20 – 500 °C com razão de aquecimento de (10 °C min<sup>-1</sup>) para cada amostra. A vazão de nitrogênio foi mantida em 60 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>. O porta amostra utilizado foi de platina. As análises foram realizadas em triplicata.

### **3.2.2.2.8. Análise Estatística**

As análises de variância (ANOVA) foram realizadas utilizando-se o programa Minitab<sup>®</sup> versão 14.12.0 (Minitab Inc., State College, Penn., USA). As diferenças significativas entre as médias foram identificadas através do teste de Tukey (p<0,05).

### **3.2.2.2.9. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**

As temperaturas de transição vítrea (T<sub>g</sub>) dos filmes de HPMC e nanopartículas foram determinadas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) através do equipamento DSC da marca TA Instruments Q100. Aproximadamente 4-6 mg de amostra foram colocadas em placas de alumínio, sob atmosfera de nitrogênio a uma vazão de 50 mL/minuto, com uma razão de aquecimento de 10 °C /minuto até 180 °C. A temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>) foi obtida no ponto de inflexão entre as linhas bases pela variação da capacidade calorífica da amostra.

## **3.3. Resultados e Discussões**

### **3.3.1. Determinação do Tamanho Médio**

De acordo com o capítulo anterior é apresentada a TABELA 3.1 onde aparece a dependência entre a quantidade de quitosana na síntese e o tamanho médio das nanopartículas. Pode ser observado que aumentando a quantidade de quitosana na síntese das nanopartículas, o tamanho médio das NPs apresentam um decréscimo. Estas diferentes partículas foram inseridas nos filmes.

TABELA 3.1: Valores de tamanho médio para as diferentes NPs de quitosana em pH = 4,0.

<b>Nanopartícula</b>	<b>Tamanho médio (nm)</b>
0,2 % m/v de QS	111±4
0,5 % m/v de QS	82±2
0,8 % m/v de QS	60±4

### **3.3.2. Morfologia do Filme**

Visualmente o filme apresentou boas propriedades, apresentando transparência e aspecto táctil não quebradiço.

Antes das análises de morfologia e também das demais análises foram medidas as espessuras dos filmes. As espessuras de praticamente todos os filmes se encontravam entre 0,030 e 0,033 mm.

A morfologia dos filmes de HPMC contendo nanopartículas foi analisada através de microscopia eletrônica de varredura (FIGURA 3.2).

O filme controle foi sintetizado a partir de uma solução de 3% m/v de HPMC (hidroxipropil metilcelulose) em água (FIGURA 3.2a).

Como pode ser observado o filme controle apresenta alto grau de porosidade. Na FIGURA 3.2b é apresentada a micrografia das nanopartículas de QS-PMAA preparadas com 0,2% m/v, uma homogeneidade de tamanho e forma é observada.

Na FIGURA 3.2c é apresentada uma maior compactação do filme de HPMC com adição das nanopartículas de QS-PMAA. As nanopartículas passam a ocupar os poros desses filmes aumentando assim sua compactação. O efeito desse aumento na compactação do filme pode ser analisado nos resultados dos próximos capítulos.



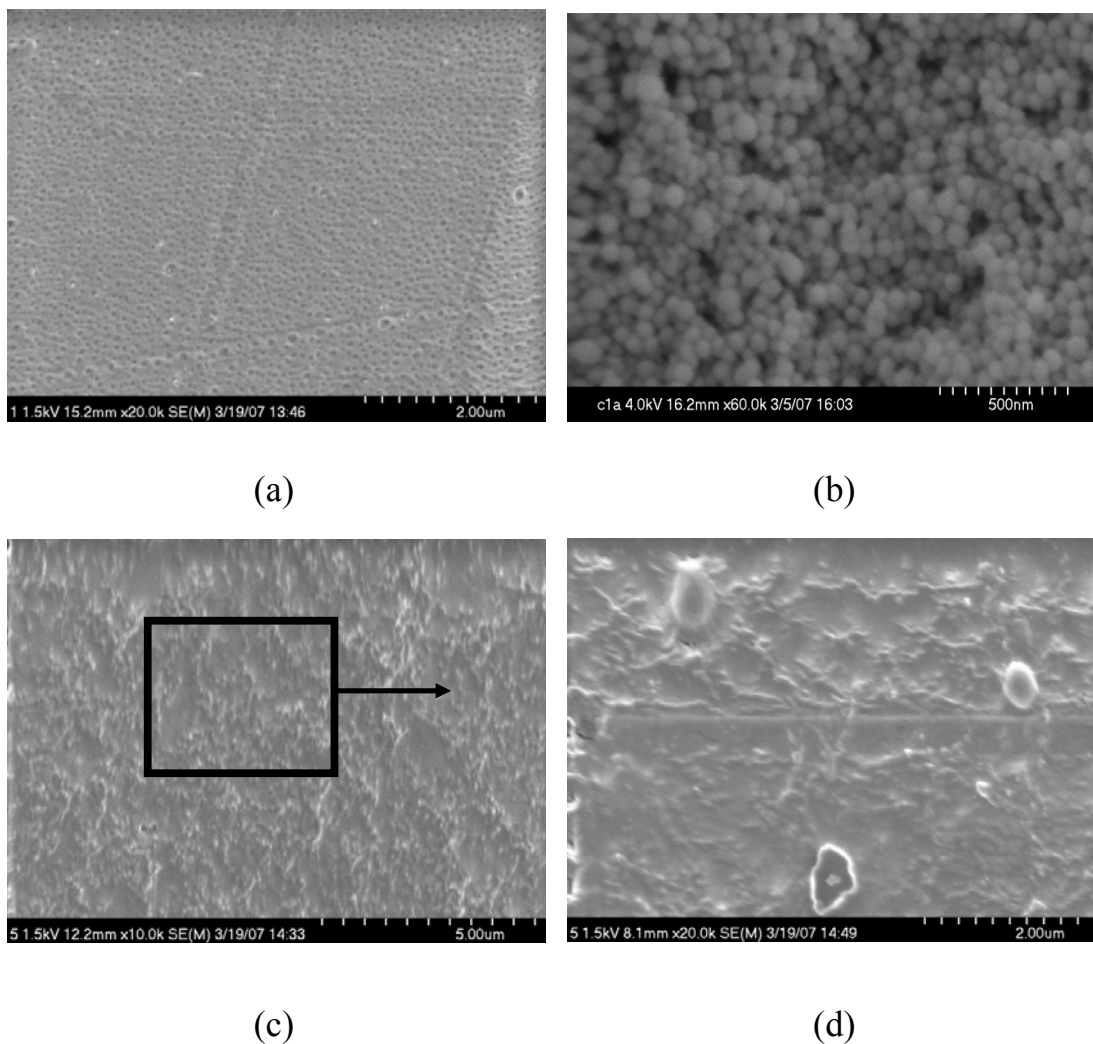


FIGURA 3.2: Micrografias de MEV: (a) filme controle (somente HPMC); (b) QS-PMAA nanopartículas com 0,2 % (m/v) de quitosana; (c) filme de HPMC contendo 6,3 % de nanopartículas com 110 nm; (d) o mesmo que (c) em 20.000 X de magnificação.

### 3.3.3. Solubilidade do filme em água

A solubilidade em água é uma propriedade importante dos filmes baseados em HPMC. Algumas aplicações podem precisar de filmes que apresentem certa insolubilidade, ou seja, que sejam resistentes na presença de água. A TABELA 3.2 apresenta a solubilidade dos filmes com e sem nanopartículas. A

diferença na solubilidade pode ser devido à diferença no tamanho das partículas incorporadas no filme de HPMC. Na TABELA os valores de concentração apresentados são em relação à quantidade de NPs ou quitosana, em relação à de HPMC. Ou seja, filmes com 6,3 % de QS-PMAA apresentam 0,2g de quitosana em solução de nanopartículas mais 3g de HPMC. Assim também, para as outras formulações.

TABELA 3.2: Solubilidade em água dos filmes com e sem nanopartículas incluso.

<b>% QS-PMAA em filmes de HPMC</b>	<b>Solubilidade (%)</b>
6,3 (sem nanopartículas) <sup>A</sup>	100 <sup>c</sup>
14,3 (sem nanopartículas) <sup>A</sup>	100 <sup>c</sup>
20,7 (sem nanopartículas) <sup>A</sup>	99,7 <sup>c</sup>
6,3 (contendo nanopartículas de 110 nm) <sup>B</sup>	94,5 <sup>a</sup>
14,3 (contendo nanopartículas de 82 nm) <sup>B</sup>	96,4 <sup>b</sup>
20,7 (contendo nanopartículas de 59 nm) <sup>B</sup>	97,3 <sup>c</sup>

- (A) MAA: Somente ácido metacrílico na água para solubilizar a quitosana.
- (B) QS-PMAA: Nanopartículas de quitosana em diferentes tamanhos.
- \*Diferentes letras na coluna dos valores de solubilidade indicam significância a  $P < 0,05$ .

Ou seja,  $a \neq b \neq c$ .

As três primeiras linhas da TABELA 3.2 apresentam os dados de filmes sintetizados somente com quitosana solubilizada em ácido metacrílico. Os filmes que contêm somente quitosana (QS-MAA), ou seja, sendo MAA o ácido metacrílico, apresentam uma maior solubilidade em água. De acordo com dados de ANOVA a adição de nanopartículas significativamente ( $p < 0,05$ ) decresce a

solubilidade dos filmes de HPMC. É observado que a solubilidade dos filmes decresce significativamente com o aumento no tamanho de partículas.

Esse fato é muito importante na área de filmes, pois em muitos alimentos a água provoca decréscimo na qualidade e tempo de conservação. A baixa solubilidade dos filmes é um fator desejável em muitas aplicações em alimentos.

### 3.3.4. Propriedades mecânicas

A FIGURA 3.3 apresenta uma curva típica tensão deformação para os filmes.

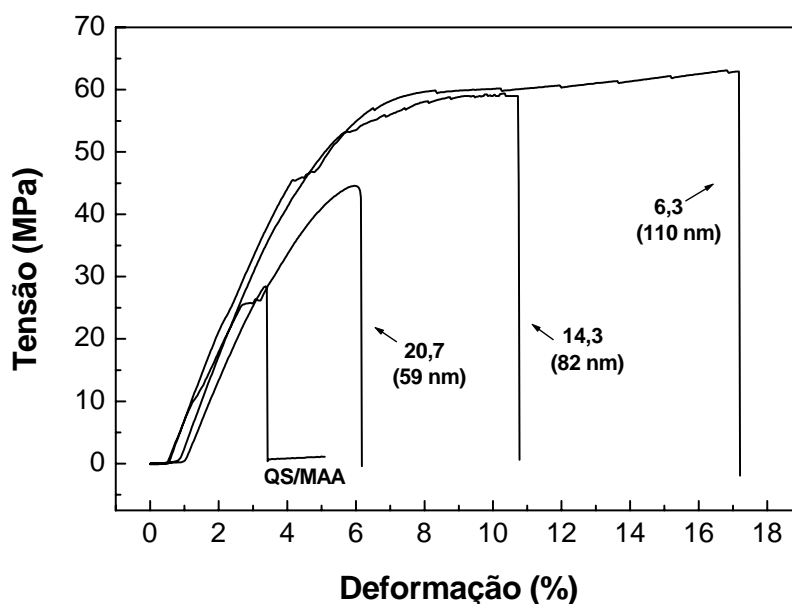


FIGURA 3.3: Curva de tensão-deformação para filmes de HPMC com 6,3 % (110 nm), 14,3% (82 nm) e 20,7% (59 nm) de nanopartículas QS-PMMA adicionadas e com uma curva de filme contendo somente quitosana sem nanopartículas (QS-MAA).

A utilização de embalagens é fortemente dependente das propriedades mecânicas e de barreira dos materiais. Tensão, alongação e módulo elástico são parâmetros que estão relacionados com as propriedades mecânicas dos filmes e suas estruturas químicas. Os filmes de HPMC que contêm nanopartículas com tamanho maior, apresentam alto valor de tensão de ruptura. Os filmes com tamanho de partícula de 59 nm (6,3) apresentam menor resistência mecânica, pois sua tensão de ruptura é menor que para os outros filmes. Um fator importante é que os filmes que não apresentam nanopartículas em sua composição (QS/MAA) possuem menor resistência mecânica que os demais, comprovando assim, melhora nas propriedades dos filmes de HPMC com a adição de nanopartículas.

Na FIGURA 3.4 pode ser observado o efeito do tamanho das partículas e da concentração dessas na resistência dos filmes.

Quando nanopartículas com 59 nm são incluídas nos filmes de HPMC, a tensão dos filmes aumenta significativamente de  $28,3 \pm 1,0$  para  $58,0 \pm 1,8$  MPa. Esse aumento na tensão, é devido ao aumento na concentração de nanopartículas na solução. Para os filmes contendo nanopartículas com 82 nm, a tensão aumenta de  $28,3 \pm 1,0$  para  $58,4 \pm 2,0$  MPa. Com o aumento na concentração das nanopartículas (110 nm) de 0 para 6,3%, é observado um aumento nos valores de tensão de  $28,3 \pm 1,0$  para  $66,9 \pm 2,1$  MPa. O aumento na resistência dos filmes, que contêm nanopartículas inclusas, é devido a maior compactação que essas partículas causam no filme, resultando no reforçamento da sua matriz. As nanopartículas nos filmes atuam como agentes de reforçamento do filme. Na literatura, o mesmo efeito tem sido observado em diferentes matrizes. Por exemplo, **AVÉROUS et al. (2001)** observou esse efeito com fibras de celulose reforçando amido termoplástico, **ANGLÈS et al. (1999)** observou reforçamento de compósito de polipropileno reforçados com resíduos de fibras de madeira.

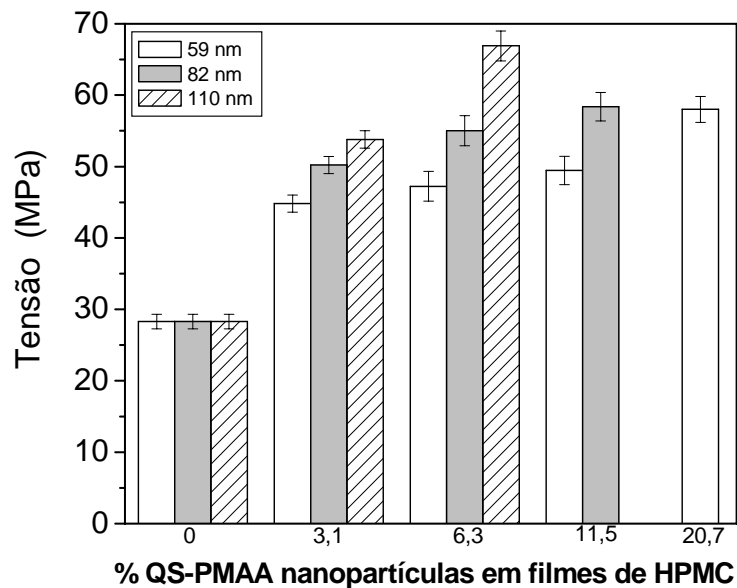


FIGURA 3.4: Tensão dos filmes de HPMC com diferentes concentrações e tamanhos de nanopartículas. Os valores médios são apresentados e as barras indicam os erros das medidas.

Os valores de tensão para os filmes sintetizados somente com HPMC (sem nanopartículas) foram de  $30,7 \pm 1,8$ ,  $39,7 \pm 1,6$  e  $38,5 \pm 1,4$  MPa para 6,3, 14,3 e 20,7 % da concentração de quitosana QS-MAA, respectivamente, como mostrado na TABELA 3.3.

Em adição, a tensão para os filmes de HPMC contendo somente PMAA (sem quitosana ou nanopartícula) foi de  $27,8 \pm 1,2$  MPa. Assim, o aumento na tensão foi significativo com a adição de nanopartículas nos filmes. Dados de ANOVA indicam que a adição de nanopartículas aumenta a tensão dos filmes de HPMC, tornando-os mais resistentes.

A dependência da tensão com o tamanho de partícula, para duas diferentes concentrações (6,3 e 3,1 %) de nanopartículas está representada na FIGURA 3.4. A tensão é fortemente dependente da variação do tamanho de partícula que foi inserido no filme e sintetizado com o polissacarídeo HPMC. Os

valores de tensão aumentam com o aumento do tamanho de partículas, em ambas as concentrações. Em adição, nos filmes sintetizados com 6,3 % de nanopartículas, um maior aumento significativo nos valores de tensão com o aumento do tamanho das partículas foi observado. Nessa formulação, os poros dos filmes são mais compactos que os filmes com uma menor concentração. As nanopartículas com tamanhos maiores ocupam os espaços vazios nos poros do filme de HPMC, aumentando o colapso dos poros nos filmes, resultando em um aumento nas propriedades de ruptura dos filmes, tornando esses mais resistentes.

TABELA 3.3: Tensão para filmes de HPMC com diferentes concentrações e tamanhos de partículas.

<b>% QS-PMAA em filmes de HPMC</b>	<b>Tamanho de partículas (nm)</b>	<b>Tensão (MPa)</b>
6,3	sem nanopartícula	30,7 ± 1,8 <sup>a</sup>
14,3	sem nanopartícula	39,7 ± 1,6 <sup>b</sup>
20,7	sem nanopartícula	38,5 ± 1,4 <sup>b</sup>
6,3	110	66,9 ± 2,1 <sup>d</sup>
14,3	82	58,4 ± 2,0 <sup>c</sup>
20,7	59	58,0 ± 1,8 <sup>c</sup>

\*As diferentes letras nas colunas indicam significância a  $P < 0,05$ . Ou seja,  $a \neq b \neq c$ .

A porcentagem de alongação aumenta significativamente com o aumento no tamanho de partícula, observado na TABELA 3.4. Através de uma análise de variância, concluiu-se que um aumento na concentração de nanopartículas com o mesmo tamanho de partícula, aumenta o módulo de elasticidade. Aumentando somente a concentração de nanopartículas, nos filmes

com tamanhos de 59 nm e 82 nm, observou-se que não houve variação na alongação dos filmes.

O aumento na alongação provoca melhora na tenacidade dos filmes. Os dados da TABELA mostram também que os filmes não perderam a elasticidade, com a adição das nanopartículas de QS-PMAA.

Análises de ANOVA mostraram que as adições de nanopartículas apresentaram uma grande influência nas propriedades finais do filme, demonstrando claramente o efeito de reforçamento dos filmes provocado pelas nanopartículas.

TABELA 3.4: Efeito da formulação e tamanho de partículas no módulo de elasticidade, e % de alongação nos filmes de HPMC.

<b>% QS-PMAA nos filmes de HPMC</b>	<b>Tamanho de Partícula (nm)</b>	<b>Módulo de elasticidade (MPa)</b>	<b>Elongação (%)</b>
0	(sem nanopartícula)	900 ± 34 <sup>a</sup>	8,1 ± 0,7 <sup>a</sup>
3,1	59	1212 ± 150 <sup>b</sup>	8,8 ± 1,0 <sup>a</sup>
3,1	82	1249 ± 120 <sup>b</sup>	9,7 ± 2,1 <sup>ab</sup>
3,1	110	1240 ± 92 <sup>b</sup>	11,1 ± 1,0 <sup>b</sup>
6,3	59	1245 ± 140 <sup>b</sup>	8,3 ± 1,0 <sup>a</sup>
6,3	82	1472 ± 112 <sup>c</sup>	10,7 ± 0,8 <sup>b</sup>
6,3	110	1426 ± 59 <sup>c</sup>	16,8 ± 1,6 <sup>c</sup>
11,5	59	1313 ± 75 <sup>bc</sup>	8,1 ± 1,0 <sup>a</sup>
14,3	82	1389 ± 41 <sup>c</sup>	11,3 ± 0,8 <sup>b</sup>
20,7	59	1364 ± 45 <sup>c</sup>	8,1 ± 0,8 <sup>a</sup>

\*As diferentes letras nas colunas indicam significância a  $P < 0,05$ . Ou seja,  $a \neq b \neq c$ .

Um dos desafios dos filmes biodegradáveis estudados atualmente é alcançar um tempo de vida útil controlada, ou seja, o material deve manter-se estável e manter suas propriedades durante o armazenamento.

Sendo assim, após um período de sete meses foram medidos novamente os valores das resistências dos filmes. Na TABELA 3.5 são apresentados os dados de tensão máxima dos filmes após sete meses de estocagem.

TABELA 3.5: Tensão para filmes de HPMC com diferentes concentrações e tamanhos de partículas, após sete meses de estocagem.

<b>% QS-PMAA nos filmes de HPMC</b>	<b>Tamanho de Partícula (nm)</b>	<b>Tensão (MPa) após 7 meses de estocagem</b>
6,3	110	60,8± 2,0
14,3	82	55,0± 1,1
20,7	59	49,3± 2,1

Com isso foi observado que os filmes apresentaram estabilidade e conservação das propriedades de tensão ao longo de sete meses.

### **3.3.5. Permeabilidade ao Vapor da Água (WVP)**

Em adição as propriedades mecânicas, as propriedades de barreira do vapor de água dos filmes é um fator importante para várias aplicações na indústria de alimentos.

A permeação de água através do filme controle de HPMC foi de  $0,79 \pm 0,03$  g mm/ kPa h m<sup>2</sup>. A permeabilidade decresceu quando nanopartículas foram adicionadas na matriz do filme de HPMC. O efeito da concentração e tamanho das nanopartículas sobre WVP dos filmes é apresentado na FIGURA 3.5.



Por exemplo, a permeabilidade decresceu para  $0,64 \pm 0,04$ ;  $0,59 \pm 0,06$  e  $0,47 \pm 0,07$  para filmes com 20,7% (59 nm); 14,3% (82 nm) e 6,3% (110 nm) de nanopartículas QS-PMAA, respectivamente. **DOGAN e MCHUGH, (2007)** mostraram um decréscimo no coeficiente de difusão da água com adição de fibras de celulose nos filmes de HPMC. Esse efeito é similar ao efeito das nanopartículas na redução da difusividade da água.

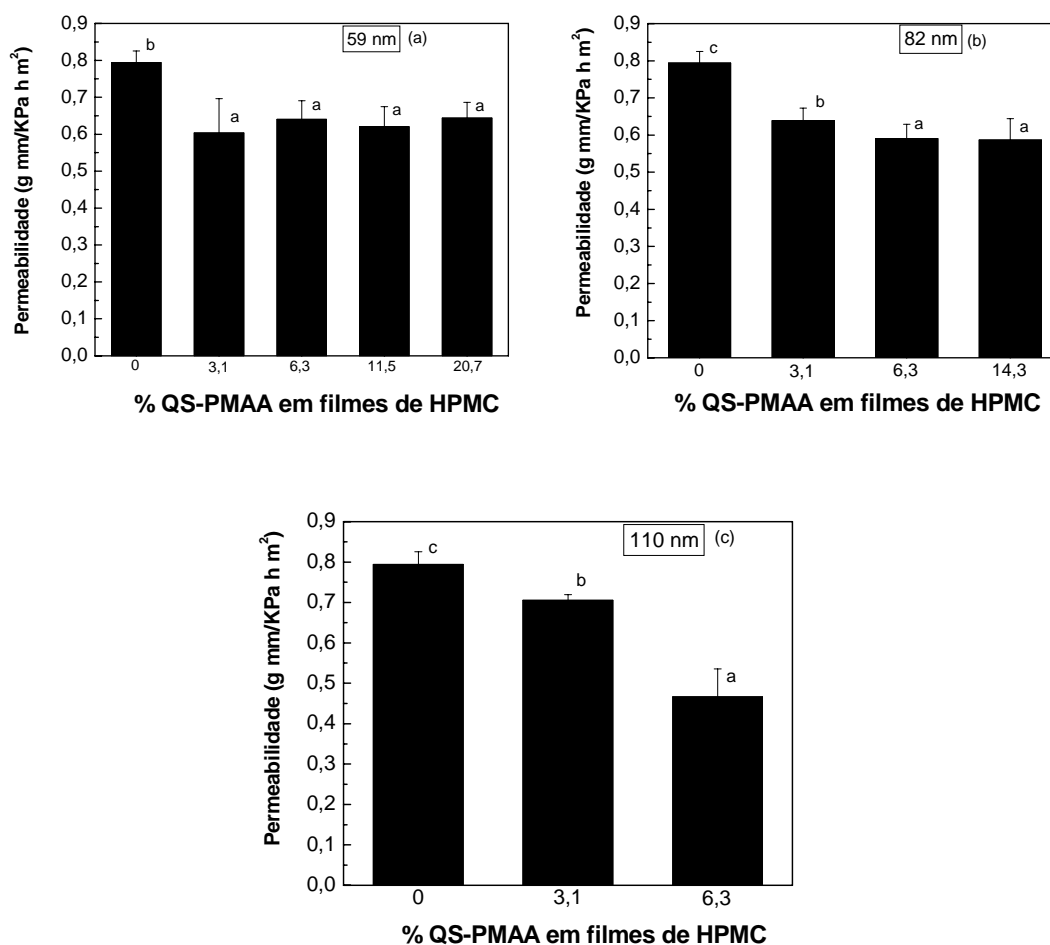


FIGURA 3.5: Dependência da permeabilidade dos filmes de HPMC com a concentração de nanopartículas para diferentes tamanhos de partículas: (a) 59 nm; (b) 82 nm e (c) 110 nm. Diferentes letras sobre as barras indicam significância a  $P < 0,05$ . Ou seja,  $a \neq b \neq c$ .

Uma das causas desse decréscimo na permeabilidade com a inserção das NPs é o caminho mais tortuoso que a água tem que percorrer para permear. Um esquema dessa permeação está representado na FIGURA 3.6. Outros fatores também podem influenciar, como aqueles associados à interface matriz-partícula.

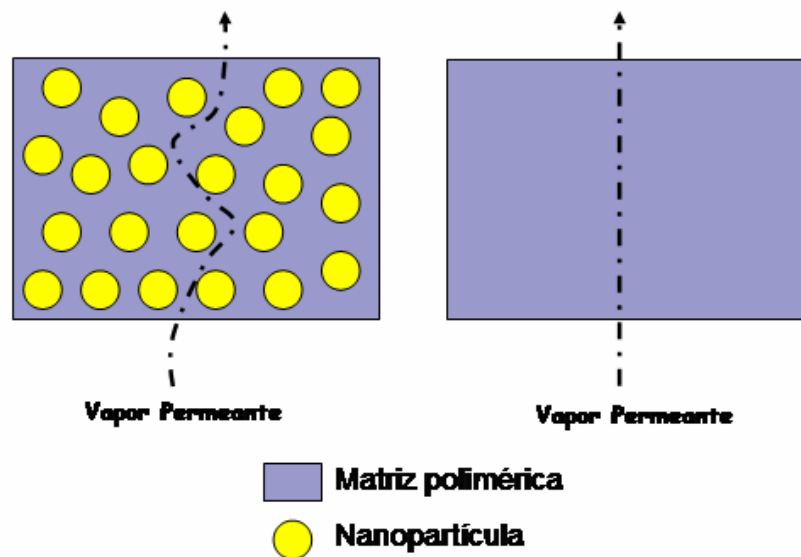


FIGURA 3.6: Representação esquemática do modelo de permeação proposto.

Nas FIGURAS 3.5a e 3.5b não são observadas mudanças na permeação da água dos filmes, com variação da concentração de QS-PMAA em 59 nm e em 82 nm. Por outro lado, dados de permeabilidade mostram que os filmes com nanopartículas de 110 nm (FIGURA 3.5c), mostram decréscimo significativo na permeabilidade, com o aumento da concentração de nanopartículas nos filmes. Esse efeito é resultado do decréscimo do coeficiente de solubilidade e de difusividade da água nos filmes que possuem alta concentração de nanopartículas com 110 nm. A permeação de moléculas de água através desses filmes é dificultada, pela maior presença no filme de partículas com tamanhos maiores.

Este efeito é devido a maior agregação (e talvez devido ao preenchimento dos poros causado pelas nanopartículas) das partículas menores, ou seja, quanto maior a quantidade de partículas menores, maior a interação das que já existiam no sistema o que não altera os valores de permeabilidade. Com as partículas maiores (110 nm), a adição de uma maior concentração de partículas gera uma distribuição mais homogênea. Talvez um dos efeitos possa ser uma maior repulsão existente entre essas partículas, com tamanhos maiores. O que favorece uma maior dispersão, dificultando a permeação do vapor de água (FIGURA 3.7).

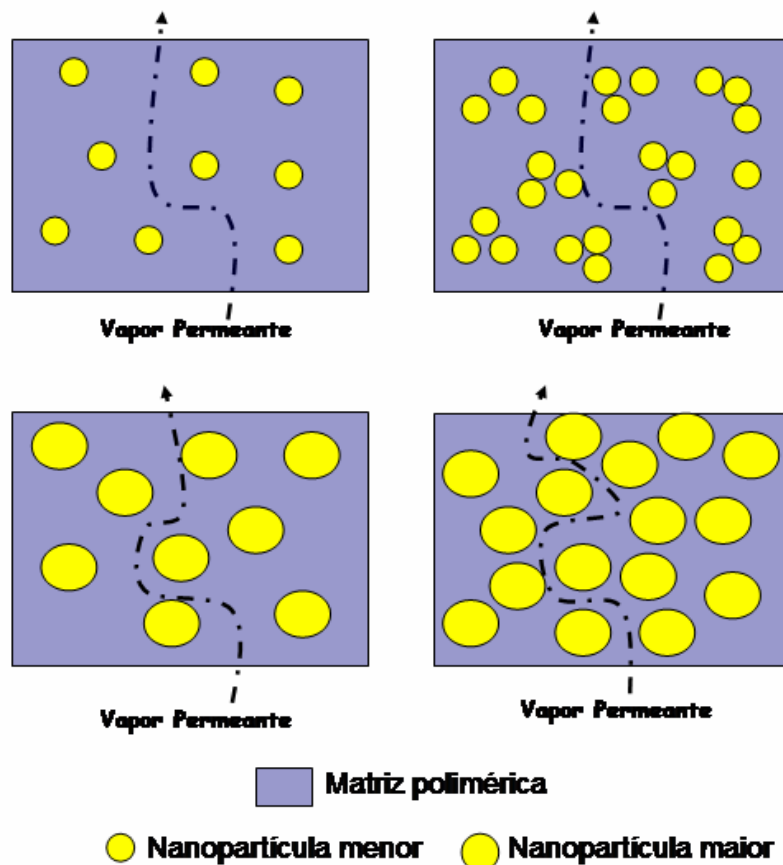


FIGURA 3.7: Representação esquemática do modelo de permeação proposto.

### 3.3.6. Permeabilidade ao Oxigênio (O<sub>2</sub>P)

O resultado das análises de permeabilidade dos filmes de HPMC com e sem nanopartículas, estão apresentados na TABELA 3.6. A O<sub>2</sub>P do filme de HPMC controle foi de  $182,3 \pm 0,5 \text{ cm}^3 \mu\text{m}/\text{m}^2 \text{ d kPa}$ . Com a adição de nanopartículas nos filmes com tamanhos de 59, 82 e 110 nm, os valores de O<sub>2</sub>P decresceram para 110,0; 136,1 e 142,3 respectivamente.

A adição de nanopartículas afeta a permeação de oxigênio através do filme. Esse fato mostra que, filmes de HPMC que contem nanopartículas em sua matriz são boas barreiras para oxigênio. De acordo com dados da análise de ANOVA a adição de nanopartículas é significativa ( $p < 0.05$ ) para o decréscimo da permeação de oxigênio pelo filme. Outro fato interessante é que, a permeação do gás diminui com a diminuição no tamanho de partícula incluso no filme.

TABELA 3.6: Permeabilidade ao oxigênio para filmes de HPMC contendo nanopartículas inclusas.

<b>Tamanho de partículas em filmes de HPMC</b>	<b>Permeabilidade ao O<sub>2</sub> (cm<sup>3</sup> μm / m<sup>2</sup> d k Pa)</b>
(sem nanopartícula)	$182,3 \pm 0,5^d$
110 nm (0,2% QS)	$142,3 \pm 4,0^c$
82 nm (0,5% QS)	$136,1 \pm 1,0^b$
59 nm (0,8% QS)	$110,7 \pm 0,9^a$

\* Diferentes letras nas colunas indicam diferença significativa entre os resultados a  $P < 0,05$ . Ou seja,  $a \neq b \neq c$

O O<sub>2</sub> para permear tem que abrir espaço entre a matriz, pois é um vapor mais apolar, necessita de maior volume livre entre as cadeias e menor densidade coesiva. Já o vapor de água força a abertura entre as cadeias, é mais polar, não é afetado por

maior densidade coesiva e menor volume livre. Devido a isso, filmes com partículas menores apresentam maior solubilidade em água, maior permeabilidade ao vapor de água e menor permeabilidade ao O<sub>2</sub>.

### 3.3.7. Análise da degradação

A mobilidade de uma cadeia polimérica determina as características físicas do produto, seja este um plástico duro e frágil, borrachoso e tenaz, ou um fluido viscoso. A mobilidade é função da agitação dos átomos nas moléculas, sendo esta diretamente proporcional à temperatura. Portanto as características térmicas do polímero, principalmente no caso de materiais utilizados em embalagens, é de extrema importância. Uma vez que esses materiais poderão em escala industrial serem produzidos em temperatura elevada, a fim de diminuir o tempo de processamento, desde que se saiba de antemão que a temperatura de degradação do material não será atingida.

A TABELA 3.7 mostra valores da temperatura de degradação (Td) para filmes de HPMC, com e sem nanopartículas, obtidos através de curvas de TG.

TABELA 3.7: Temperatura de degradação dos filmes de HPMC e HPMC com nanopartículas.

<b>Filme</b>	<b>Tamanho de partícula (nm)</b>	<b>Td (°C)</b>
HPMC	sem nanopartículas	232
HPMC + nanopartículas (0,2% QS)	110	350
HPMC + nanopartículas (0,5% QS)	82	362
HPMC + nanopartículas (0,8% QS)	59	369

Os filmes que contêm somente HPMC apresentam temperatura de degradação térmica em 232 °C. Nos filmes que apresentam nanopartículas em sua composição, a temperatura de degradação térmica aumenta para 350 (110 nm), 362 (82 nm) e 369 °C (59 nm). Esse fato é muito importante para o processamento de filmes na indústria, pois a temperatura de degradação influencia na temperatura de processamento dos filmes.

### **3.3.8. Estudos de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**

A Tg apresentada pelos filmes de HPMC puros está representada no gráfico da FIGURA 3.8.

O principal objetivo da técnica de análise por DSC é registrar temperaturas de transição, através da comparação de temperaturas da amostra e de uma referência que é totalmente inerte dentro da faixa de temperatura ensaiada. Observando como esta diferença de temperatura varia com o aquecimento a uma taxa constante, é possível registrar as transições importantes, como a temperatura de transição vítrea (Tg) e a temperatura de início de degradação, que resultam em picos endotérmicos ou exotérmicos no gráfico de quantidade de calor versus temperatura (**REGIANE, 2000**).

A Tg é o valor médio da faixa de temperatura que, durante o aquecimento de um material polimérico, permite que as cadeias da fase amorfa adquiram mobilidade. Abaixo da Tg, o polímero não tem energia interna suficiente para permitir o deslocamento de uma cadeia em relação à outra por mudanças conformacionais. Ele está no estado vítreo, em que se apresenta duro, rígido e quebradiço. Acima da Tg a cadeia polimérica sofre rotação e movimentos difusionais, estando o polímero no estado elástico (**CANEVAROLO, 2002**).

Como qualquer outra transição física, esta também é consequência de um aumento da temperatura do sistema (**REGIANE, 2000**).

De acordo com a FIGURA 3.8 a Tg do filme de HPMC puro está em torno de 169 °C.

Para os filmes contendo nanopartículas com 110 nm o valor médio da Tg foi de 185 °C e para os filmes contendo nanopartículas de 59 nm foi de 170 °C. Devido à inserção das partículas na matriz do filme, como essa apresenta uma grande área superficial, uma quantidade grande de segmentos do polímero tem interação com a superfície das partículas.

A interação dificulta o movimento das cadeias poliméricas, com o acréscimo da temperatura o que favorece um aumento nos valores da Tg. Pelo aumento da rigidez dentro das cadeias poliméricas.

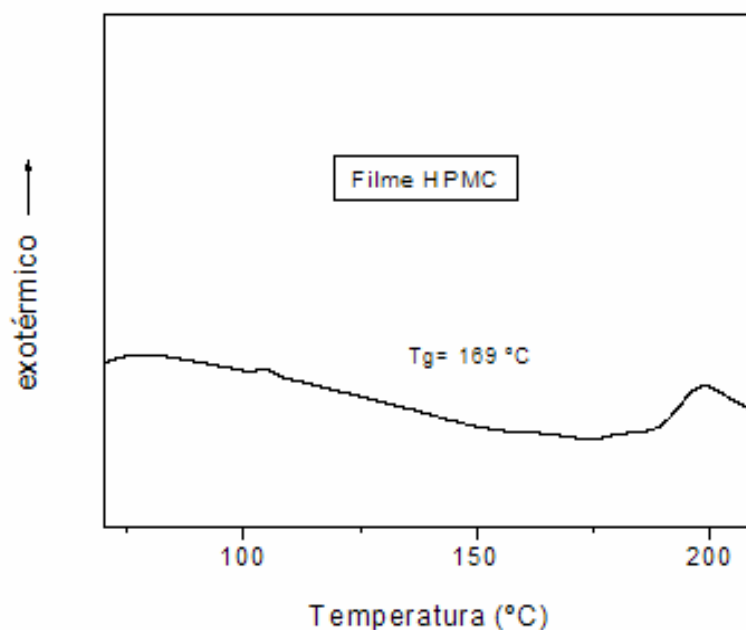


FIGURA 3.8: Curva de DSC para filme de HPMC puro. A curva foi obtida nas seguintes condições: vazão de nitrogênio de 50 mL min<sup>-1</sup>, razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>, porta amostra de alumínio com tampa.

Outro fator que contribui para elevar a Tg é a presença de grupos volumosos na matriz de HPMC, como no nosso caso as NPs. A presença desses grupos tende a ancorar a cadeia polimérica, exigindo maiores níveis de energia para que a cadeia adquira mobilidade, isto é, aumentando a Tg do polímero.

### **3.4. Conclusões**

Em conclusão, esse estudo foi o primeiro a investigar a incorporação de nanopartículas de quitosana em filmes de HPMC. O estudo sugere que filmes de HPMC com nanopartículas de quitosana inclusas oferecem grande potencial para serem aplicados em alimentos no futuro. Foram observadas as reduções em WVP e O<sub>2</sub>P, e aumento nas propriedades mecânicas dos filmes de HPMC com a incorporação de nanopartículas. A resistência mecânica dos filmes foi mantida por um período de até sete meses, prazo em que foi realizada nova medida da propriedade do material.

A presença das nanopartículas nos filmes pode ser observada em imagens de MEV, através da mudança na compactação do filme. Além disso, um fato interessante é um pequeno aumento na estabilidade térmica nos filmes com a presença de nanopartículas, que foi observado pelo aumento na temperatura de degradação. Os valores de Tg dos filmes aumentam com a inserção de nanopartículas de quitosana.

Por fim, com o auxílio da nanotecnologia esse trabalho auxilia no início dos estudos que podem buscar a melhoria de qualidade de vários tipos de filmes de interesse comercial para utilização como embalagens de alimentos.



**CAPÍTULO IV: Síntese e Caracterização de**  
**Filmes de Hidroxipropil Metilcelulose Contendo**  
**Nanopartículas de Quitosana e Tripolifosfato**  
**de Sódio.**

## **4.1. Introdução**

Recentemente, surgiu um grande interesse no desenvolvimento de filmes comestíveis. Principalmente devido à demanda por alimentos de alta qualidade, preocupações ambientais em relação ao descarte de embalagens não renováveis e oportunidades para criar novos mercados para matérias-primas formadoras de filme, provenientes de produtos agrícolas (**WU et al., 2002; SEBTI et al., 2007; DENAVI et al., 2009**).

Filmes comestíveis são filmes preparados com polissacarídeos, proteínas, lipídios e derivados. Entre as proteínas que podem formar filmes estão a zeína do milho, o glúten do trigo, as proteínas do leite e da soja, entre os polissacarídeos estão os derivados de celulose, amido, alginatos, pectinas e diferentes gomas e entre os lipídios, estão ceras, ácidos graxos e monoglicerídeos (**SOTHORNVIT et al., 2007; NO et al., 2007; OLIVAS e BARBOSA-CANOVAS, 2008**).

As vantagens dos filmes comestíveis e/ou biodegradáveis que tem despertado interesse em função de suas possibilidades são: controlar a migração de vapor de água; permeabilidade ao oxigênio e dióxido de carbono. Além disso, existe a possibilidade de incorporação de aditivos nos filmes (antioxidantes, aromas, agentes antimicrobianos e nanomateriais) melhorando com isso a qualidade do produto (**KESTER e FENNEMA, 1986; LAGARÓN et al., 2005; SINHA RAY e BOUSMINA, 2005; BERTUZZI et al., 2007; SORRENTINO et al., 2007**).

A utilização dos filmes como embalagem nos alimentos exige que os mesmos possuam adequada barreira à umidade e gases, propriedades mecânicas que garantam a integridade durante o manuseio, transporte e consumo (**GARCIA et al., 2009; HAMBLETON et al., 2009**).

Com base nisso o objetivo dessa etapa é preparar filmes contendo nanopartículas (NPs) de quitosana (QS) e TPP (tripolifosfato de sódio), que são materiais aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso em alimentos e incorporar essas Nps em filmes de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), polissacarídeo comestível já utilizado na indústria de alimentos. Com a incorporação das nanopartículas busca-se a obtenção de filmes com propriedades melhores que os filmes de HPMC puro.

## **4.2. Materiais e Métodos**

### **4.2.1. Materiais**

- Quitosana; a quitosana utilizada foi da Polymar, Fortaleza-Brasil. (MW= 71,3 kDa, grau de desacetilação 94%).
- Tripolifosfato de Sódio (TPP); obtido da Aldrich (St. Louis, USA).
- Ácido acético; obtido da Aldrich (St. Louis, USA).
- Hidroxipropil Metilcelulose (HPMC); obtido apartir da Dow Chemical Co. (Midland, Mich., U.S.A.).

### **4.2.2. Métodos**

#### **4.2.2.1. Preparação dos filmes**

Para o preparo dos filmes foi empregada a técnica de “casting”, como descrito no capítulo anterior. Os filmes com nanopartículas de QS-TPP foram obtidos através da adição de 3,0 g de HPMC em 100 mL de solução de nanopartícula (recentemente sintetizada, capítulo II). Após a adição a solução foi deixada sob agitação magnética por 12 horas. Depois das soluções filmogênicas preparadas, esta foi acondicionada em temperatura ambiente por 6 horas para degasagem. A solução foi colocada sobre uma placa de vidro (30 x 30 cm) recoberta com um filme de polietileno e o filme foi obtido. As espessuras dos

filmes foram ajustadas com uma barra de nível (0,5 mm) e as placas deixadas sobre uma superfície plana em temperatura ambiente por 24 horas. Após os filmes secos, esses foram retirados das placas e alocados em sacos plásticos.

#### **4.2.2.2. Caracterização dos Filmes**

##### **4.2.2.2.1. Determinação da espessura**

As medidas das espessuras dos filmes foram realizadas utilizando um micrômetro digital (No. 7326, Mitutoyo Manufacturing, Japan) em 5 diferentes pontos ao redor do filme. Os valores obtidos foram utilizados para calcular os valores de permeabilidade ao vapor de água e propriedades mecânicas.

##### **4.2.2.2.2. Propriedades Mecânicas**

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas pelos testes de tração. Os filmes foram deixados em ambiente com 30% umidade relativa a 24 °C por 48 horas, antes dos testes de tração, como os do capítulo anterior (item 3.2.2.2.4). Os filmes foram cortados em forma retangular nas dimensões de acordo com o método ASTM D882-97: 15 mm de largura e 100 mm de comprimento. O equipamento utilizado para a análise foi um Instron Universal Testing Machine (Model 1122, Instron Corp., Canton, Mass., U.S.A.). As propriedades mecânicas dos filmes, avaliadas em função do tamanho de partículas foram avaliadas com relação à tensão ( $\sigma$ ) e módulo de elasticidade (E) em temperatura ambiente. A velocidade de tracionamento utilizada foi de 50 mm/min.

A deformação ( $\varepsilon$ ) dos filmes foi determinada pela equação (4.1):

$$\varepsilon = \ln\left(\frac{L}{L_0}\right) \quad (4.1)$$

onde L e L<sub>0</sub> são os comprimentos de alongação do filme durante o experimento e o comprimento inicial do filme, respectivamente.

A tensão ( $\sigma$ ) foi determinada medindo-se a força necessária para rasgar o filme. Os valores de  $\sigma$  foram calculados utilizando a equação (4.2):

$$\sigma = \frac{F}{S} \quad (4.2)$$

onde F é o valor da força de ruptura exercida e S é a área seccional do filme.

O módulo de elasticidade (E) foi calculado a partir da inclinação inicial da curva obtida tensão-deformação ( $\sigma$  vs  $\epsilon$ ). As propriedades mecânicas foram avaliadas em função da concentração e tamanho das partículas.

#### **4.2.2.2.3. Permeabilidade ao Vapor de Água (WVP)**

Valores de permeabilidade ao vapor de água foram determinados a partir do método modificado ASTM E96-92, utilizado para determinar a umidade relativa (RH) do filme, descrito na literatura por **MCHUGH et al. (1993)**. Para cada tratamento são utilizados quatro filmes (4 replicatas) que foram cortados em forma circular (15,5 cm de diâmetro). Na parte interna de placas de Teflon® adicionou-se 6 mL de água destilada. Sobre a água, o filme foi fixado na placa com cola de silicone, outra placa foi colocada sobre a primeira e fixada com quatro parafusos. As placas foram alocadas em um gabinete com controle de umidade utilizando sulfato de cálcio (0 % RH) (W.A. Hammond Drieritr Co., Xenia, Ohio, U.S.A.). As massas das placas foram pesadas periodicamente e anotadas para o cálculo da % RH e valores de WVP.

Permeabilidade ao vapor de água (WVP) foi calculada com base na seguinte equação 4.3:

$$\text{WVP} = \frac{\text{WVTR}}{(p_2 - p_3)} y \quad (4.3)$$

onde  $y$  é a espessura média dos filmes e  $p_3$  é pressão parcial de vapor do lado superior do filme.

#### **4.2.2.2.4. Permeabilidade ao Oxigênio (O<sub>2</sub>P)**

A taxa de transmissão de oxigênio foi determinada utilizando um aparelho OX-TRAN 2/20 (Modern Controls Inc., Minneapolis, MN) a 25 °C a partir do método padrão D3985 (ASTM, 1995), com uma umidade relativa de  $55 \pm 1\%$ . Cada filme foi fixado em um suporte com uma área de abertura de 5 cm<sup>2</sup>. As amostras do filme, no instrumento de medida, foram submetidas a 100% de gás oxigênio de um lado e de um gás de arraste contendo 98% de nitrogênio e 2% de hidrogênio do outro lado. O equilíbrio foi programado para 10 horas de experimento. A permeabilidade ao oxigênio foi calculada, dividindo a taxa de transmissão de O<sub>2</sub> pela diferença da pressão parcial de O<sub>2</sub> entre ambos os lados do filme e multiplicando pela média das espessuras dos filmes. Quatro replicatas de cada filme foram avaliadas. A unidade utilizada para as medidas de O<sub>2</sub>P é cm<sup>3</sup> μm/m<sup>2</sup> d kPa.

#### **4.2.2.2.5. Termogravimetria (TG)**

A temperatura de degradação foi analisada em um TGA Q-500. Utilizou-se uma massa de amostra de 6-7 mg. Os experimentos foram realizados na faixa de temperatura de 20 – 500 °C com razão de aquecimento de (10 °C min<sup>-1</sup>)

para cada amostra. A vazão de nitrogênio foi mantida em  $60 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ . O porta amostra utilizado foi de platina. As análises foram realizadas em triplicata.

#### **4.2.2.2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

O microscópio eletrônico Hitachi S-4700 (Hitachi, Toronto, Ontario, Canada) foi utilizado para analisar a morfologia dos filmes contendo NPs. As amostras foram fixadas em corpos de prova de alumínio, com ajuda de fita de carbono (Ted Pella Inc., Redding, CA, USA) e recobertas com ouro (Denton Vacuum Inc., Moorestown, NJ, USA), por 45s a 20 mA. Todas as amostras foram examinadas com uma voltagem de 1,5 kV com ampliações de 40,000 x e 60,000 x.

#### **4.2.2.2.7. Análise Estatística**

As análises de variância (ANOVA) foram realizadas utilizando-se o programa Minitab® versão 14.12.0 (Minitab Inc., State College, Penn., USA). As diferenças significativas entre as médias foram identificadas através do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Esse recurso foi adotado para avaliar a significância da diferença entre as médias.

#### **4.2.2.2.8. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**

As análises de DSC foram realizadas de acordo com o procedimento apresentado no Capítulo III.

O equipamento utilizado foi da marca TA Instruments, modelo Q100. Aproximadamente 4-6 mg de amostra foram colocadas em painéis de alumínio, sob atmosfera de nitrogênio a um vazão de 50 mL/minuto, com uma razão de aquecimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{minuto}$  até  $180 \text{ }^\circ\text{C}$ . A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) foi obtida no ponto de inflexão entre as linhas bases pela variação da capacidade calorífica da amostra.

### **4.3. Resultados e Discussões**

#### **4.3.1. Propriedades Mecânicas**

Os filmes foram obtidos com sucesso pelo método proposto. A aparência desses foi satisfatória, uma vez que se apresentou transparente e com boa maleabilidade para manuseio. Com base nisso, partiu-se para análises das propriedades a serem pesquisadas.

Para manter a integridade e a propriedades de barreira, os filmes devem ser capazes de resistir ao estresse normal encontrado durante sua aplicação subsequente. Normalmente, uma alta resistência mecânica é requerida, mas os valores de deformação devem ser ajustados de acordo com a aplicação (CALLEGARIN et al., 1997). Segundo CALLEGARIN et al., (1997), as propriedades mecânicas dos filmes dependem das interações entre os componentes, ou seja, da formação de ligações moleculares fortes ou numerosas entre as cadeias.

O efeito da adição de nanopartículas de QS-TPP nas propriedades mecânicas dos filmes de HPMC pode ser avaliado na FIGURA 4.1.

Pode ser observado que a incorporação de NPs nos filmes de HPMC modifica significativamente a resistência do filme. A tensão de ruptura da matriz dos filmes de HPMC sem nanopartícula inclusa é de  $28,3 \pm 1,0$  MPa. Com a introdução de NPs com tamanho médio de 85 nm a tensão aumentou para  $62,6 \pm 1,0$  MPa. A adição de nanopartículas na matriz apresentou um efeito reforçante, o que foi coerente com trabalhos da literatura publicados previamente para outros sistemas nanoestruturados (PEREIRA DE ABREU et al., 2007).

O aumento na concentração de solvente (água) provoca uma redução das interações moleculares entre as cadeias adjacentes, aumentando a interação entre as macromoléculas e o solvente (VRENTAS e DUDA, 1978; SOBRAL, 2000). Dessa forma, com a adição de nanopartículas ocorre um aumento das interações moleculares entre as cadeias adjacentes, devido à diminuição na



concentração de solvente. Com o aumento das interações, entre as partículas e o material formador do filme, um maior reforçamento do filme é observado. **(FACKHOURI, 2002; JAWAHAR e BALASUBRAMANIAN, 2006)** .

O estudo revela que com a inserção de partículas menores de QS-TPP, nos filmes ocorre uma interação dessas partículas com a matriz de HPMC. Essas partículas são assim distribuídas de forma homogênea e com a evaporação da água durante a formação do filme, o compósito formado QS-TPP/HPMC é estabilizado. As partículas maiores nesse caso causam uma diminuição nas propriedades mecânicas devido à interação não homogênea na matriz. Segundo **DEBEAUFORT e VOILLEY (1995)**, um filme com estrutura heterogênea apresenta descontinuidades na rede, que aumentam a fragilidade do filme, devido a pontos preferenciais de quebra.

Uma segunda explicação é que partículas maiores possuem maior quantidade de grupamento do tripolifosfato, assim como em meio ácido esses grupamentos também estão protonados como a matriz de HPMC pode estar ocorrendo uma repulsão entre os materiais o que prejudica as propriedades mecânicas do filme. Outros fatores podem atuar também, como agregação das partículas na matriz.

Análises de ANOVA mostraram que a adição de nanopartículas apresentou uma grande influência nas propriedades finais do filme, demonstrando claramente o efeito de reforçamento dos filmes provocado pelas nanopartículas.

A elongação corresponde à máxima variação no comprimento da amostra antes da quebra ou ruptura, ou seja, mede a capacidade de esticar.

A percentagem de elongação do filme varia quando NPs são adicionadas na matriz do filme. Elongação é geralmente obtida no ponto de ruptura e é expressa como porcentagem de aumento do comprimento original da amostra. Essa variação nos valores de elongação pode ser observada na TABELA 4.1. O

aumento na elongação aumenta a tenacidade dos filmes. Assim é observado que filmes contendo NPs com tamanho médio de 85 nm apresentam maior tenacidade que os filmes sem NPs. Esse fato é devido a menor rigidez que esse a matriz com inserção desse tipo de NP apresentou.

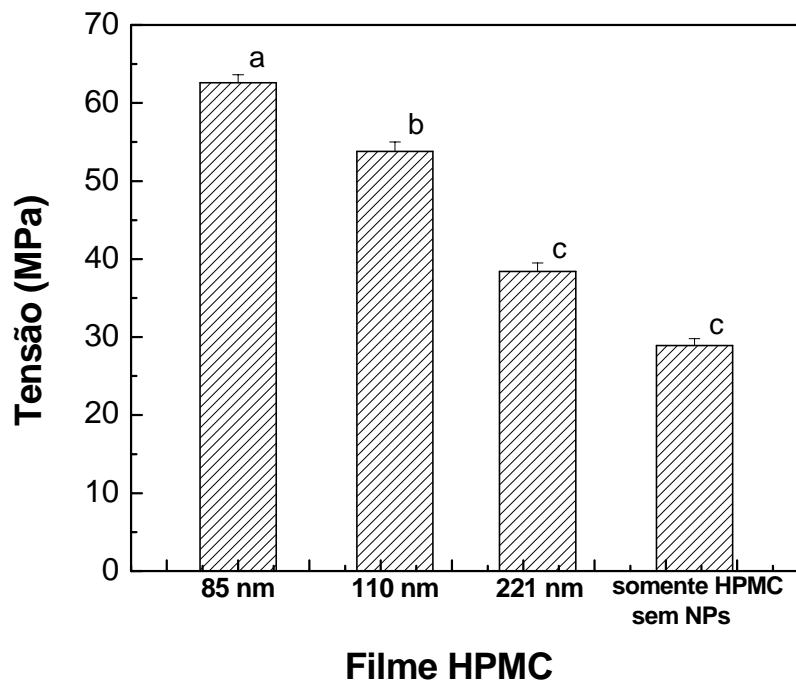


FIGURA 4.1: Efeito da incorporação de nanopartículas na tensão de filmes de HPMC. As colunas mostram os valores médios e as barras de erro indicam os desvios. As diferentes letras nas colunas indicam significância a  $P < 0,05$ . Ou seja,  $a \neq b \neq c$ .

O módulo de elasticidade ou módulo de Young mede a rigidez do filme. De acordo com a TABELA 4.1 o módulo de elasticidade não apresentou variação significativa com os diferentes tamanhos de NPs. O que se observou foi um pequeno acréscimo com a adição de NPs.

TABELA 4.1: Efeito da presença e tamanho de partículas, no módulo de elasticidade e alongação dos filmes contendo nanopartículas de QS-TPP.

<b>Tamanho de partícula (nm)</b>	<b>Módulo de elasticidade (MPa)</b>	<b>Elongação (%)</b>
(sem nanopartícula)	900 ± 34 <sup>a</sup>	8,1 ± 0,7 <sup>a</sup>
85	1264 ± 65 <sup>b</sup>	11,1 ± 1,0 <sup>c</sup>
110	1190 ± 93 <sup>b</sup>	5,2 ± 2,1 <sup>a</sup>
221	1204 ± 64 <sup>b</sup>	5,7 ± 1,0 <sup>a</sup>

\* As diferentes letras nas colunas indicam significância a  $P < 0,05$ . Ou seja,  $a \neq b \neq c$ .

Como no capítulo anterior, foram medidos os valores de resistência dos filmes após um período de sete meses (TABELA 4.2).

TABELA 4.2: Tensão para filmes de HPMC com diferentes concentrações e tamanhos de partículas, após sete meses de estocagem.

<b>Tamanho de Partícula (nm)</b>	<b>Tensão (MPa) após 7 meses de estocagem</b>
85	57,6± 1,5
110	46,7± 1,0
210	33,1± 2,0

Com essas medidas comprovou-se que esses filmes também mantiveram suas propriedades de tensão sem alteração com o armazenamento.

### 4.3.2. Permeabilidade ao Vapor de Água (WVP)

Muitos estudos na área da ciência de alimentos têm se empenhado na produção de embalagens comestíveis, que apresentam propriedades de atuar como barreira para a transferência de água através dessa embalagem (**HONG e KROCHTA, 2004; KIM et al. 2003; PÉREZ-GAGO e KROCHTA, 2001**). Um dos problemas com filmes compósitos na indústria de alimentos está relacionado com a alta permeabilidade ao vapor de água. A permeabilidade em filmes é controlada por difusividade e solubilidade de água da matriz do filme.

Com o uso de nanociência, novas formas de organização dessa matriz podem prevenir a migração de vapor de água através dela. Com base nisso, na TABELA 4.3 é apresentado os valores de WVP para filmes de HPMC e nanopartículas com diferentes tamanhos.

TABELA 4.3: Efeito da presença e tamanho de partícula no WVP dos filmes de HPMC.

<b>Tamanho de Partícula (nm)</b>	<b>WVP (g mm K<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>)</b>	<b>RH (parte de baixo do filme) (%)</b>
(sem nanopartícula)	0,794 ± 0.03 <sup>c</sup>	78,2 ± 0,7 <sup>a</sup>
85	0,331 ± 0.06 <sup>a</sup>	79,6 ± 0,3 <sup>a</sup>
110	0,451 ± 0.05 <sup>a</sup>	79,4 ± 0,5 <sup>a</sup>
221	0,587 ± 0.05 <sup>b</sup>	79,5 ± 0,9 <sup>a</sup>

\* As diferentes letras nas colunas indicam significância a  $P < 0,05$ . Ou seja,  $a \neq b \neq c$ .

Os valores de WVP dos filmes podem ser representativos como método de comparação entre eles, se for utilizada a mesma direção da força para a difusão do vapor de água para cada filme (**McHUGH et al. 1993**). A umidade relativa (RH) da face inferior do filme foi mantida semelhante para todos os filmes ( $79,2 \pm 0,6 \%$ ) da TABELA 4.3.

De acordo com análises de variância, observou-se que a presença de nanopartículas de QS-TPP nos filmes, provoca um decréscimo nos valores de WVP desses filmes. Esse fato é muito importante no campo da nanotecnologia. O valor de WVP para filmes sem nanopartículas é de  $0,794 \text{ g mm kPa}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-2}$ . O decréscimo nos valores de WVP é atribuído à formação de ligações de hidrogênio entre a quitosana e a matriz de HPMC, o que influencia na difusão do vapor de água. A estrutura dos filmes contendo nanopartículas é mais compacta o que dificulta a difusão do vapor através do filme. Além disso, há a influência do aumento dos obstáculos encontrados pelo vapor ao atravessar a matriz do filme, ou seja, o caminho para permear se torna mais tortuoso.

Nanopartículas com tamanho pequeno induzem um maior decréscimo nos valores de WVP, quando comparado com os valores calculados para partículas maiores. Isso ocorre, porque com a adição de partículas de tamanho menor nos filmes, essas apresentam maior habilidade em ocupar os espaços vazios, os poros, do filme. O que resulta em filmes com maior potencialidade de utilização como barreira ao vapor de água. Ou seja, essas partículas menores nesse caso não têm a característica de se agregarem e sim de total dispersão na matriz.

No trabalho descrito por **LOTTI et al. (2008)** é observado que filmes nanocompósitos (HDPE + argila organofílica) apresentaram um decréscimo significativo nas propriedades de barreira (vapor e oxigênio) em comparação ao filme de HDPE puro. A eficiência do reforço e controle da permeabilidade provocado por celulose microcristalina em tamanho nanométrico incorporada em

filmes de HPMC, é relatada por **DOGAN e MCHUGH, (2007)**. **RHIM et al., (2006)** estudaram a influência de nanoestruturas nos valores de WVP de filmes de quitosana. Os valores de WVP dos filmes de quitosana são de  $1,31 \pm 0,07 \text{ g mm K}^{-1} \text{ Pa}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-2}$ . Dependendo do tipo de NP os valores de WVP nos filmes nanocompósitos decrescem significativamente em 25-30%. Isto é atribuído à presença de camadas dispersas de nanopartículas na matriz polimérica, o que contribui para que o vapor de água percorra o filme por um caminho mais tortuoso em torno das nanopartículas, aumentando, assim, a dificuldade da difusão. Uma vantagem do nosso sistema é que o decréscimo nos valores de WVP chegaram a 60% (QS-TPP com 85 nm de tamanho) quando comparado com o filme sem NPs.

#### **4.3.3. Permeabilidade ao Oxigênio (O<sub>2</sub>P)**

O resultado das análises de permeabilidade dos filmes de HPMC com e sem nanopartículas, foram avaliados com base nos parâmetros citados nos métodos experimentais. A O<sub>2</sub>P do filme de HPMC controle foi de  $182,34 \pm 1,11 \text{ cm}^3 \mu\text{m}^2 \text{ d kPa}$ . Com a adição de nanopartículas nos filmes com tamanhos de 85; 110 e 210 nm, os valores de O<sub>2</sub>P decresceram para  $179,5 \pm 1,0$ ;  $175,7 \pm 1,2$  e  $175,0 \pm 1,2 \text{ cm}^3 \mu\text{m}^2 \text{ d kPa}$  respectivamente.

Com a adição de nanopartículas de QS-TPP a permeação de oxigênio através do filme não é alterada consideravelmente. Esses resultados podem ou não ser considerados bons, uma vez que se a finalidade de utilização do filme não necessitar de grande melhoria nas propriedades de barreira contra gás oxigênio, o filme pode ser utilizado sem nenhum problema. Em alguns casos a única preocupação é com propriedades mecânicas do HPMC, sendo assim a utilização desse filme sem alteração na permeabilidade de gás oxigênio não é descartada.

#### 4.3.4. Degradação Térmica

Esta técnica foi utilizada para avaliar a estabilidade térmica dos filmes de HPMC, considerando a possibilidade de utilizá-los como coberturas, envoltório ou como embalagens de alimentos, que podem ser submetidos a processos térmicos durante a preparação, processamento ou mesmo no consumo (BARRETO, 2003).

Na FIGURA 4.2 são apresentadas as curvas de TG dos filmes de HPMC contendo as nanopartículas de QS-TPP.

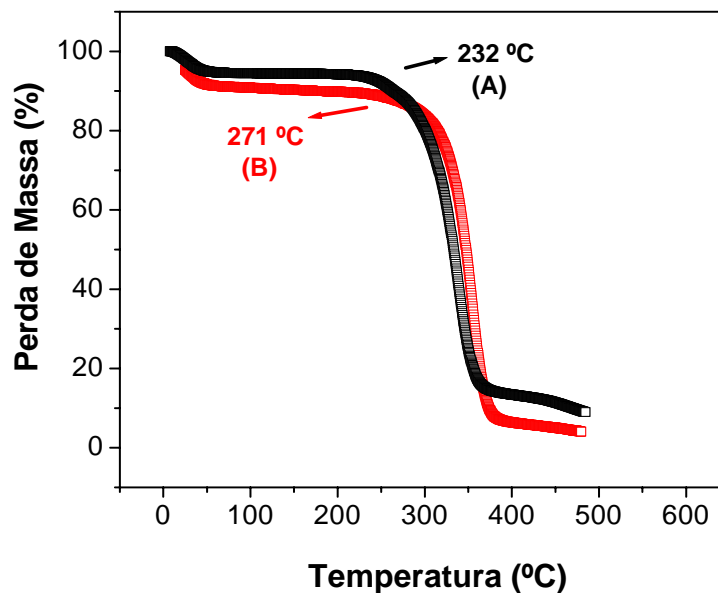


FIGURA 4.2: Curva TG dos filmes de HPMC (A) e do filme de HPMC com NPs de 110 nm (B). As análises foram realizadas em atmosfera de nitrogênio com vazão de  $60 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ , amostra com massa de 6-7 mg e porta amostra de platina.

O início das curvas representa a diferença na eliminação de voláteis pelos materiais. Como todas as amostras foram preparadas e analisadas da mesma forma, a diferença na eliminação de voláteis é representativa. A amostra de filme de HPMC que contém NP apresenta uma eliminação maior de volátil, que a

amostra que contém somente HPMC. Uma das possibilidades é que esses voláteis sejam água adsorvida na estrutura do filme. Assim o filme com NPs possuem maior capacidade de reter vapor de água. Esse fato está de acordo com os dados do item anterior, onde mostra que filmes com NPs apresentam menor capacidade de permeação de água.

À medida que a temperatura aumenta a massa se mantém constante até cerca de 232 °C para o filme de HPMC puro. Com a adição de NPs a massa se mantém constante até cerca de 271 °C, para filmes com NPs de 110 nm.

Essas temperaturas correspondem ao início da temperatura de degradação (Td). A temperatura de degradação foi similar para todos os filmes que contém NPs, como pode ser observado na TABELA 4.4.

TABELA 4.4: Temperaturas de degradação de filmes de HPMC sem e com nanopartículas.

<b>Filme</b>	<b>Tamanho de Partícula (nm)</b>	<b>TD (°C)</b>
HPMC	Sem nanopartícula	232
HPMC + nanopartícula	85	279
HPMC + nanopartícula	110	271
HPMC + nanopartícula	221	276

A adição de nanopartículas nos filmes modificou sua característica térmica. A presença das NPs aumentou a estabilidade térmica dos filmes. Esse fato é relevante para a síntese por “*casting*” desses filmes. Uma máquina de escala laboratorial, para a preparação de filmes comestíveis, pode operar em escala piloto



para secagem dos filmes calibrada em 100-132° C, que leva cerca de 12 min para a secagem (DU et al. 2008).

#### 4.3.5. Morfologia dos Filmes

Vários estudos envolvendo a avaliação de biofilmes têm utilizado a micrografia eletrônica de varredura (MEV) como ferramenta, buscando correlacionar as propriedades dos mesmos com a estrutura morfológica (SOUZA, 2001). Em função da grande profundidade de foco e da alta resolução, tais análises podem permitir a visualização da estrutura do filme e dos constituintes adicionados (CARVALHO, 2002).

MEV foi utilizada para avaliar a morfologia dos filmes de HPMC puro e dos filmes que contêm NPs. Na FIGURA 4.3 é apresentada a micrografia do filme de HPMC puro (FIG.4.3a) e filme de HPMC com NP (FIG.4.3b).

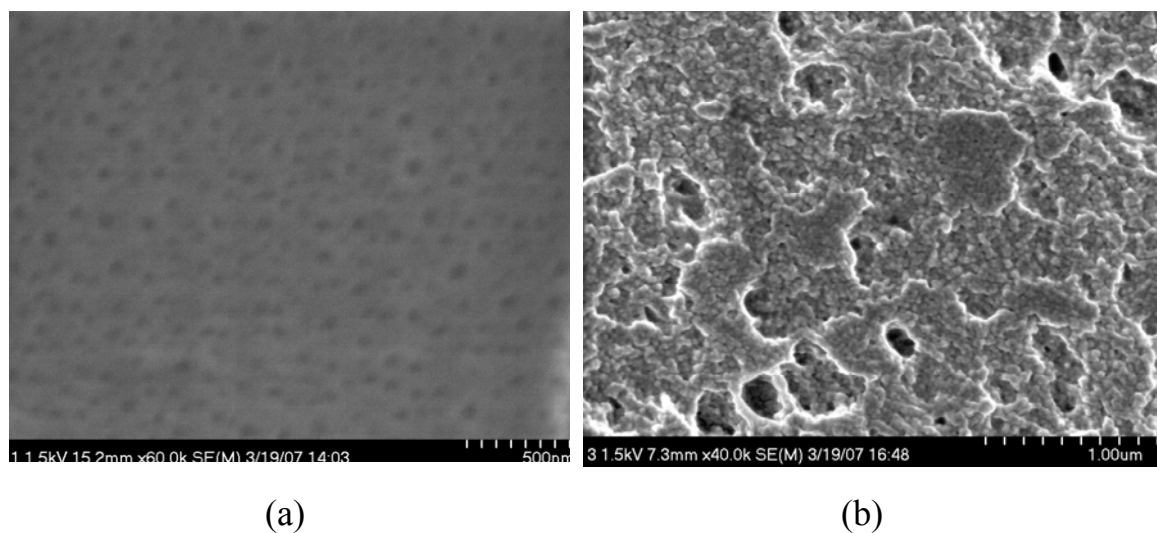


FIGURA 4.3: Micrografias eletrônicas de varredura de filmes de HPMC puro (a) e filme de HPMC contendo nanopartícula de QS-TPP com 221 nm (b).

O filme controle preparado a partir da solução contendo 3% (m/v) de HPMC em água apresenta alto grau de porosidade distribuída através do filme.

Com a adição de nanopartículas de quitosana no filme (FIG. 4.3b) foi observado que o filme apresentou maior compactação e rugosidade na sua superfície. Devido a essa compactação, foram observados anteriormente diferentes valores de WVP e propriedades mecânicas para filmes com e sem nanopartículas.

#### **4.3.6. Estudos de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**

A FIGURA de DSC para cálculo da Tg dos filmes de HPMC puro, está representada no Capítulo III na FIGURA 3.6.

A Tg dos filmes de HPMC puro está em torno de 169 °C. Para os filmes contendo nanopartículas de QS-TPP os valores da Tg não apresentaram grande variação. Com a adição de nanopartículas com 85, 110 e 221 nm os valores de Tg calculados foram de 174, 172 e 168 °C, respectivamente. Apesar de um leve aumento, os valores permaneceram sem muita variação. Uma maior temperatura de Tg foi apresentada para nanopartículas com menor tamanho. Talvez a interação dessas com matriz do polímero HPMC seja mais favorecida, o que pode ser explicado pela maior tensão apresentada por esses filmes nas análises de propriedades mecânicas. Os fatores que influenciam nesse pequeno aumento são também os que foram discutidos no capítulo anterior (item 3.3.8): aumento da rigidez das cadeias moleculares, novos grupos volumosos, aqui representados pelas NPs, inseridos no filmes, entre outros fatores.

#### **4.4. Conclusões**

Os filmes elaborados com HPMC e nanopartículas de QS-TPP, apresentaram-se manuseáveis e visivelmente homogêneos.

A presença de NPs melhora significativamente as propriedades de barreira (WVP) e propriedades mecânicas dos filmes. A resistência mecânica dos filmes foi preservada por um período de sete meses. A diferença de tamanho das nanopartículas também resultou em filmes com diferença nessas propriedades. As nanopartículas menores foram as que apresentaram filmes melhores (menor transferência de vapor de água através do filme e melhor propriedade mecânica).

A temperatura de degradação térmica aumentou nos filmes contendo nanopartículas de 232 °C para 271 °C. A importância disso, é que a presença de NPs nos filmes de HPMC resulta em filmes com uma maior termo-estabilidade.

As imagens de MEV revelaram que os filmes de HPMC contendo NPs, apresentaram estrutura mais densa e compacta que os filmes puros. Os valores de transição vítrea não apresentaram diferença significativa nos filmes com nanopartículas inclusas.

Assim, o uso de nanotecnologia pode melhorar a funcionalidade desses filmes na aplicação como em alimentos que necessitam de embalagens com baixa permeabilidade de água e maior resistência.

## **CAPÍTULO V: Considerações Finais**

## 5.1. Conclusões Gerais

- O principal resultado alcançado pelo presente trabalho foi sintetizar nanopartículas de quitosana e aplicar essas na melhoria das propriedades de filmes sintetizados a partir de hidroxipropil metilcelulose.

- As nanopartículas de quitosana foram sintetizadas com sucesso, utilizando os métodos aplicados de polimerização em molde e gelatinização ionotrópica.

- A obtenção de nanopartículas de tamanhos diferentes para posterior comparação de propriedades foi efetiva para ambas as sínteses.

- Obteve-se com êxito, filmes de HPMC contendo nanopartículas de quitosana.

- As propriedades mecânicas e de barreira dos filmes de HPMC foram significativamente melhoradas com a inserção de nanopartículas de ambas as sínteses.

- Os filmes com as melhores propriedades, foram obtidos a partir da incorporação de nanopartículas obtidas pelo método de polimerização em molde, utilizando 0,2% m/v de quitosana na síntese inicial. Essas nanopartículas apresentam maior estabilidade e melhores propriedades dos filmes onde foram inseridas.

- O estudo contribuiu para o desenvolvimento de metodologia de inclusão da nanotecnologia no setor de embalagens para alimentos.

## **5.2. Sugestões para trabalhos futuros**

As conclusões finais deste trabalho sugerem propostas para trabalhos futuros.

Uma das propostas é a continuidade do estudo das propriedades mecânicas e de barreira dos filmes, utilizando como variável a espessura e tempo de secagem dos filmes, e a análise toxicológica destes sistemas.

Outra possibilidade de trabalho futuro é a realização de testes da estabilidade das propriedades dos filmes com o tempo de armazenamento, e a comparação com filmes contendo outros tipos de nanoestruturas.

Outra proposta consiste na realização de testes com o recobrimento de frutos pelas embalagens, e monitoramento do tempo de conservação desse fruto. Além de frutos e hortaliças, outros tipos de alimentos poderiam ser beneficiados pelo revestimento c/ os filmes estudados, especialmente produtos que requeiram embalagem com boa barreira à umidade, como biscoitos, produtos desidratados, queijos, etc. Testes de biodegradabilidade dos filmes também podem ser feitos.

## **CAPÍTULO VI: Referências Bibliográficas**

AHN, J.-S.; CHOI, H.-K. & CHO, C.-S. "A novel mucoadhesive polymer prepared by template polymerization of acrylic acid in the presence of chitosan". *Biomaterials*, **22**: 923, 2001.

AJUN, W.; YAN, S.; LI, G. & LI HUILI. "Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and in vitro release study". *Carbohydr. Polym.*, **75**: 566, 2009.

AMASS, W.; AMASS, A. & TIGHE, B. "A review of biodegradable polymers: Uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies". *Polym. Int.*, **47**: 89, 1998.

ANGLÉS, M.N.; SALVADO, J. & DUFRESNE, A. "Steam-exploded residual softwood-filled polypropylene composites". *J. Appl. Polym. Sci.*, **74**: 1962, 2001.

ASTM. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. D882 - 97. In: Annual Book of American Standard Testing Methods, ASTM, Philadelphia, PA, 1997.

ASTM. Standard test methods for water vapor transmission of materials. E96 - 92. In: Annual book of ASTM standards: American society for testing and materials. Philadelphia, PA, 1990.

AUDIC, J.L. & CHAUFER, B. "Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate". *Eur. Polym. J.*, **41**: 1934, 2005.

AVÉROUS, L.; FRINGANT, C. & MORO, L. "Plasticized starch-cellulose interactions in polysaccharide composites". *Polymer*, **42**: 6565, 2001.

AZEREDO, H.M.C. de. "Películas comestíveis em frutas conservadas por métodos combinados: potencial da aplicação". *Boletim do CEPPA*. Curitiba, **21**: 267, 2003.

AZEREDO, H.M.C.; FARIA, J.A.F. & AZEREDO, A.M.C. "Embalagens Ativas para Alimentos". *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **20**: 337, 2000.

AZHGOZHINOVA, G.S.; GÜVEN, O.; PEKEL, N.; DUBOLAZOV, A.V.; MUN G.A. & NURKEEVA, Z.S. "Complex formation of linear poly (methacrylic acid) with uranyl ions in aqueous solutions". *J. Colloid Interface Sci.*, **278**: 155, 2004.

BALASUBRAMANIAM, V.M.; CHINNAN, M.S.; MALLIKARJUNAN, P. & PHILLIPS, R. D. "The effect of edible film on oil uptake and moisture retention of a deep fat fried poultry product". *J. Food Process Eng.*, **20**: 1729, 1997.

BELITZ, H.D. & GROSCH, W.; Química de los Alimentos, 2a ed., Zaragoza, Espanha, Editorial Acríbia S.A., 1992.

BERTUZZI, M.A., ARMADA, M. & GOTTIFREDI, J.C. "Physicochemical characterization of starch based films". *J. Food Eng.*, **82**: 17, 2007.



BODNAR, M.; HARTMANN, J. F. & BORBELY, J. "Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles". *Biomacromolecules*, **6**: 2521, 2005.

BORATO, C.E.; LEITE, F.L.; MATTOSO, L.H.C.; GOY, R.C.; CAMPANA FILHO, S.P.; VASCONCELOS, C.L.; TRINDADE NETO, C.G.; PEREIRA, M.R., FONSECA, J.L.C. & OLIVEIRA JR., O. N. "Layer-by-layer films of poly(o-ethoxyaniline), chitosan and chitosan-poly(methacrylic acid) nanoparticles and their application in an electronic tongue". *IEEE T. Dialects. El. In.*, **13**: 1101, 2006.

BORGES, O.; BORCHARD, G.; VERHOEF, J.C.; DE SOUSA, A. & JUNGINGER, H.E. "Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system". *Int. J. Pharm.*, **299**: 15, 2005.

BORGES, O.; TAVARES, J.; SOUSA, A. DE, BORCHARD, G.; JUNGINGER, H. E. & CORDEIRO-DA-SILVA, A. "Evaluation of the immune response following a short oral vaccination schedule with hepatitis B antigen encapsulated into alginate-coated chitosan nanoparticles". *Eur. J. Pharm. Sci.*, **32**: 278, 2007.

CALLEGARIN, F.; GALLO, J-A. Q.; DEBEAUFORT, F. & VOILLEY, A. "Lipids and Biopackaging". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**: 1183, 1997.

CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J. L. & ALONSO, M. J. "Development of positively charged colloidal drug carriers: Chitosan coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions". *Colloid Polym. Sci.*, **275**: 46, 1997.

CALVO, P.; REMUNÑAN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J.L. & ALONSO, M.J. "Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers". *J. Appl. Polym. Sci.*, **63**: 125, 1997.

CAMPANA-FILHO, S.P. & DESBRIÈRES, J. "Chitin, chitosan and derivatives. in Natural polymers and agrofibers composites". Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP, 2000, 41 p.

CANEVAROLO, J. R. S. V. *Ciência dos polímeros*. São Carlos; Artliber Editora, 2002.

CAO, N.; YANG, X. & FU, Y. "Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films". *Food Hydrocolloid*, **23**: 729, 2009.

CARVALHO, J.S. *Caracterização de Filmes de Caseína e Caseína Acilada*. Ribeirão Preto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1996. Dissertação de Mestrado.

CARVALHO, R.A. "Elaboração e caracterização de filmes à base de gelatina modificada enzimática e quimicamente". Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2002.

CHANDRA, R. & RUSTGI, R. Biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.*, New York, **23**: 1273, 1998.

CHAVES, A. “Nanociência e Nanotecnologia”. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/nanotecnologia/nano17.html>, Acesso em: 25 jun. 2008.

CHEN, C-H.; KUO, W-S. & LIH-SHIUH, L. “Effect of surfactants on water barrier and physical properties of tapioca starch/decolorized hsian-tso leaf gum films”. *Food Hydrocolloids*, **23**: 714, 2009.

CHIEN, P.; SHEU, F. & YANG, F. “Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit”. *J Food Eng.*, **78**: 225, 2007.

COMA, V.; MARTIAL-GROS, A.; GARREAU, S.; COPINET, A.; SALIN, F. & DESCHAMPS, A. “Edible anti-microbial films based on chitosan matrix”. *J. Food Sci.*, **67**: 1162, 2002.

COMA, V.; SEBTIA, I.; PARDONB, P.; PICHAVANTB, F.H. & DESCHAMPSA, A. “Film properties from crosslinking of cellulosic derivatives with a polyfunctional carboxylic acid”. *Carbohyd. Polym.* **51**: 265, 2003.

CONCETTA, V.L.G.; LOREDANA, M. & RING, S. “Extraction and Characterization of Foeniculum vulgare Pectins and Their Use for Preparing Biopolymer Films in the Presence of Phaseolin Protein”. *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 1237, 2007.

DEBEAUFORT, F. & VOILLEY, A. “Effect of surfactants and drying rate on barrier properties of emulsified edible films”. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **30**: 183, 1995.

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J-A. & VOILLEY, A. “Edible films and coatings: tomorrow’s packagings: a review”. **38**: 4, 299, 1998.

DEL NOBILE, M.A.; CONTE, A.; CANNARSI, M. & SINIGAGLIA, M. “Use of biodegradable films for prolonging the shelf life of minimally processed lettuce”. *J. Food Eng.*, **85**: 317, 2008.

DENAVI, G.; TAPIA-BLÁCIDO, D.R.; AÑÓN, M.C.; SOBRAL, P.J.A.; MAURI, A.N. & MENEGALLI, F.C. “Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films”. *J. Food Eng.*, **90**: 341, 2009.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L. & DEBEVERE, J. “Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables”. *Food Microbiol.* **21**: 703, 2004.

DOGAN, N. & MCHUGH, T.M. “Effects of microcrystalline cellulose on functional properties of hydroxypropyl methylcellulose microcomposite films”. *J. Food Sci.*, **72**: 16, 2007.

DOUGLAS, K.L.; PICCIRILLO, C.A. & TABRIZIAN, M. “Effects of alginate inclusion on the vector properties of chitosan-based nanoparticles”. *J. Controlled Release*, **115**: 354, 2006.

DU, W.; NIU, S-S.; XU, Y-L.; XU, Z-R. & FAN, C-L. “Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions”. *Carbohydr. Polym.*, **75**: 385, 2009.

DU, W.-X., OLSEN, C.W., AVENA-BUSTILLOS, R.J., MCHUGH, T.H., LEVIN, C.E. & FRIEDMAN, M. “Antibacterial activity against *E. coli* O157:H7, physical properties, and storage stability of novel carvacrol-containing edible tomato films”. *J Food Sci.*, **73**: 378, 2008.

ELSABEE, M.Z.; ABDOU, E.S.; NAGY, K.S.A. & EWEIS, M. “Surface modification of polypropylene films by chitosan and chitosan/pectin multilayer”. *Carbohydr. Polym.*, **71**: 187, 2008.

EVA, A.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. & GAVARA, R. “Evolution of selected volatiles in chitosan-coated strawberries (*Fragaria* × *ananassa*) during refrigerated storage”. *J. Agric. Food Chem.*, **57**: 974, 2009.

FAKHOURI, F.M. “Coberturas comestíveis aplicadas na preservação de goiabas in natura (*Psidium guajava* L.)”. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2002.

GAN, Q.; WANG, T.; COCHRANE, C. & MCCARRON, P. “Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery”. *Colloids Surf., B*, **44**: 65, 2005.

GARCÍA, M.A., PINOTTI, A., MARTINO, M. & ZARITZKY, N. “Electrically treated composite FILMS based on chitosan and methylcellulose blends”. *Food Hydrocolloids*, **23**: 722, 2009.

GENNADIOS, A. & WELLER, C.L. “Edible films and coatings from wheat and corn proteins”. *Food Techn.*, **44**: 63, 1990.

GODBILLOT, L.; DOLE, P.; JOLY, C.; ROGÉ, B. & MATHLOUTHI, M. “Analysis of water binding in starch plasticized films”. *Food Chem.*, **96**: 380, 2006.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. & CUQ, J.L. “Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology”. *J. Food Sci.*, **57**: 190, 1992.

HAMBLETON, A., FABRA, M.J., DEBEAUFORT, F., DURY-BRUN, C. & VOILLEY, A. “Interface and aroma barrier properties of iota-carrageenan emulsion –based films used for encapsulation of active food compounds”. *J. Food Eng.*, in press, 2009.

HIRANO, S.; NAKAHIRA, T.; NAGAGAWA, M. & KIM, S.K. “The preparation and applications of functional fibers from crab shell chitin”. *J. Biotechnol.*, **70**: 373, 1999.

HIREMATH, A.C., SHERIGARA, B, S, PRASHANTHA, K., RAI, K. S. & KUMAR, S.P. "Studies on the miscibility of hydroxypropyl methylcellulose and polyvinyl pyrrolidone) blends". *Indian J. Chem. Techn.*, **9**: 312, 2002.

HONG, S.I. & KROCHTA, J.M. "Whey protein isolate coating on LDPE film as a novel oxygen barrier in the composite structure". *Packag. Technol. Sci.*, **17**: 13, 2004.

HOSNY, E.A.; ABDEL HADY, S.S. & NIAZY, E.M. "Effect of film composition and various penetration enhancers concentrations on prazosin release from acrylic polymeric films". *Pharm. Acta Helv.*, **72**: 247, 1998.

HU, Y.; JIANG, X.; DING, Y.; GE, H.; YUAN, Y. & YANG, C. "Synthesis and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles". *Biomaterials*, **23**: 3193, 2002.

HUNTER R.J. Zeta pontetial in colloid science. Principles and applications, 3rd Edition, Academic Press Inc., San Diego, 1988.

JANES, K.A. & ALONSO, M. J. "Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: Preparation and characterization". *J. Appl. Polym. Sci.*, **88**: 2769, 2003.

JANG, K.-I. & LEE, H. G. "Stability of Chitosan Nanoparticles for L-Ascorbic Acid during Heat Treatment in Aqueous Solution". *J. Agric. Food Chem.*, **56**: 1936, 2008.

JAWAHAR, P.; BALASUBRAMANIAN, M. Preparation and properties of polyester-based nanocomposite gel coat system. *Journal of Nanomaterials*, **ID 21656**: 1, 2006.

JIA-HUI, Y.; YU-MIN, D., & HUA, Z. "Blend films of chitosan-gelatin". Journal of 402 Wuhan University. (Natural Science Edition), **45**: 440, 1999.

JONES, D.S. & MEDLICOTT, N.J. "Casting solvent controlled release of chlorhexidine from ethylcellulose films prepared by solvent evaporation". *Int. J. of Pharm.*, **114**: 257, 1995.

KESTER, J.J. & FENNEMA, O.R. "Edible films and coatings: a review". *Food Techn.*, **40**: 47, 1986.

KIM, K.M., MARX, D.B., WELLER, C.L. & HANNA, M.A.J. "Influence of sorghum wax, glycerin, and sorbitol on physical properties of soy protein isolate films". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **80**: 71, 2003.

KROCHTA, J.M. & MULDER-JOHNSTON, C. "Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities". *Food Technol.*, **51**: 61, 1997.

KROCHTA, J.M.; BALDWIN, E.A. & NISPEROS-CARRIEDO, M.O. "Edible Coatings and Films to Improve Food Quality". Lancaster, Pennsylvania, USA, Technomic Publishing Co., 1994.

KUMAR, M.N.V.R. "A review of chitin and chitosan applications". *React. Funct. Polym.*, **46**: 1, 2000.

LABUZA, T.P. & CONTRERAS, M.R. "Prediction of moisture protection requirements for foods". *Cereal Foods World*, **26**: 335, 1981.

LAGARÓN, J.M.; CABEDO, L.; CAVA, D.; FEIJOO, J.L.; GAVARA, R. & GIMENEZ, E. "Improving packaged food quality and safety. Part 2: nanocomposites". *Food Addit. Contam.*, **22**: 994, 2005.

LE HELLYE, M.; FORTIN, N.; GUILLOTEAU, J.; SOUM, A.; LECOMMANDOUX, S. & GUILLAUME, S.M. "Biodegradable polycarbonate-b-polypeptide and polyester-b-polypeptide block copolymers: Synthesis and nanoparticle formation towards biomaterials". *Biomacromolecules*, **9**: 1924, 2008.

LEE, J-W.; SON, S-M. & HONG, S.-I. "Characterization of protein-coated polypropylene films as a novel composite structure for active food packaging application". *J. Food Eng.*, **86**: 484, 2008.

LIU, C.-G.; DESAI, K.G.H.; CHEN, X.-G. & PARK H.-J. "Preparation and characterization of nanoparticles containing trypsin based on hydrophobically modified chitosan". *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 1728, 2005.

LÓPEZ-LEÓN, T.; CARVALHO, E.L.S.; SEIJO, B.; ORTEGA-VINUESA, J.L. & BASTOS-GONZÁLEZ, D. "Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior". *J. Colloid Interface Sci.*, **283**: 344, 2005.

LOTTI, C., ISAAC, C.S., BRANCIFORTI, M.C., ALVES, R.M.V., LIBERMAN, S. & BRETAS, R.E.S. "Rheological, mechanical and transport properties of blown films of high density polyethylene nanocomposites". *Eur. Polym. J.*, **44**: 1346, 2008.

MACLEOD, G.S.; FELL, J.T. & COLLETT, J.H. "Studies on the physical properties of mixed pectin/ethylcellulose films intended for colonic drug delivery". *Int. J. Pharm.*, **157**: 53, 1997.

MARCOS, B.; AYMERICH, T.; MONFORT, J.M. & GARRIGA, M. "High-pressure processing and antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham". *Food Microb.*, **25**: 177, 2008.

MCHUGH, T.H.; AVENA-BUSTILLOS, R. & KROCHTA, J.M. "Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects". *J. Food Sci.*, **58**: 899, 1993.

MIN, S.; RUMSEY, T. R. & KROCHTA, J. M. "Diffusion of the antimicrobial lysozyme from a whey protein coating on smoked salmon". *J. Food Eng.*, **84**: 39, 2008.

MONEDERO, F.M.; FABRA, M.J.; TALENS, P. & AMPARO C. “Effect of oleic acid–beeswax mixtures on mechanical, optical and water barrier properties of soy protein isolate based films”. *J Food Eng.*, **91**: 509, 2009.

MOURA, M. R. de; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C. “Preparation of chitosan with controlled nanoparticle sizes”. *J. Colloid Interface Sci.*, **321**: 477, 2008.

MOURA, M. R. de; AOUADA, F. A.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; McHUGH, T.H.; KROCHTA, J.M. & MATTOSO, L.H.C. “Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles”. *J. Food Eng.*, **92**: 448, 2009.

MOURA, M. R. de; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; McHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. & MATTOSO, L. H. C. “Properties of novel hydroxypropyl methylcellulose films containing chitosan nanoparticles”. *J. Food Sci.*, **73**: 31, 2008.

NASCIMENTO, A.; LARANJEIRA, M.C.; FAVERE, V.T. & JOSUE, A. “Impregnation and release of aspirin from chitosan/poly(acrylic acid) graft copolymer microspheres”. *J. Microencapsulation*, **18**: 679, 2001.

NO, H. K. & MEYERS, S. P. “Preparation of Chitin and Chitosan”, in: Chitin Handbook, R. A. A. Muzzarelli & M. G. PETERS (eds.), European Chitin Society, 1997 and ROBERTS, G. A. F. “Chitin Chemistry”, The Macmillan Press, London, 1992.

NO, H. K., PARJ, N. Y., LEE, S. H. & MEYERS, S. P. “Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights”. *Int. J. Food Microbiol.*, **74**: 65, 2002.

NO, H.K., MEYERS, S.P., PRINYAWIWATKUL, W. & XU, Z. “Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review”. *J. Food Sci.*, **72**: 87, 2007.

OLIVAS, G.I. & BARBOSA-CANOVAS, G.V. “Alginate-calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity”. *LWT-Food Sci. Technol.*, **41**: 359, 2008.

PANYAM, J. & LABHASETWAR, V. “Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue”. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **55**: 329, 2003.

PEKEL, N., YOSHII, F., KUME, T. & GÜVEN, O. “Radiation crosslinking of biodegradable hydroxypropyl methylcellulose”. *Carbohydr. Polym.*, **55**: 139, 2004.

PEREIRA DE ABREU, D.A.; PASEIRO, P.L.; ÂNGULO, I. & CRUZ, J.M. “Development of new polyolefin films with nanoclays for application in food packaging”. *Eur. Polym. J.*, **43**: 2229, 2007.

PÉREZ, O.E.; SÁNCHEZ, C.C.; PILOSOFF, A.M.R. & PATINO J. M. R. “Dynamics of adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at the air–water interface”. *Food Hydrocolloids*, **22**: 387, 2008.

PÉREZ-GAGO, M.B. & KROCHTA, J.M. “Denaturation time and temperature effects on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films”. *J. Food Sci.*, **66**: 705, 2001.

PÉREZ-GAGO, M.B. & KROCHTA, J.M. “Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein-beeswax emulsion films”. *J. Agr. Food Chem.*, **49**: 996, 2001.

PIRES, T. C. (Ed) “Parcerias Estratégicas/ Centro de Gestão e Estudos Estratégicos”, n.18, Brasília: CGEE , 2004.

POHLMEIER, A. & HABER-POHLMEIER, S. “Ionization of short polymethacrylic acid: titration, DLS, and model calculations”. *J. Colloid Interface Sci.*, **273**: 369, 2004.

POLOWINSKI, S. “Template polymerisation and co-polymerization”. *Prog. Polym. Sci.*, **27**: 537, 2002.

QURRAT-UL-AIN, S.S.; KHULLER, G.K. & GARG, S.K. “Alginate-based oral drug delivery system for tuberculosis: pharmacokinetics and therapeutic effects”. *J. Antimicrob. Chemoth.*, **51**: 931, 2003.

RAGHAVAN, D. “Characterization of biodegradable plastics”. *Polym.-Plast. Technol.*, **34**: 41, 1995.

REGIANE, A. M. Eletrólitos sólidos poliméricos a base de polissacarídeos: síntese e caracterização. 2000. Doutorado em Ciências na área de físico-químico. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

RHIM, J.-W., HONG, S.-I., PARK, H.-M. & NG, P.K.W. “Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposites films with antimicrobial activity”. *J. Agr. Food Chem.*, **54**: 5814, 2006.

RIMANN, M.; LÜHMANN, T.; TEXTOR, M.; GUERINO, B.; OGIER, J. & HALL, H. “Characterization of PLL-g-PEG-DNA Nanoparticles for the Delivery of Therapeutic DNA”. *Bioconjugate Chem.*, **19**: 548, 2008.

ROBERTS, G.A.F. “Chitin Chemistry”, the Macmillan Press, London (1992) and GOOSEN, M. E. A. “Application of chitin and chitosan”, Technomic Publishing Company, Lancaster, 1996.

ROSA, D.S., FRANCO, B.L.M. & CALIL, M.R. “Biodegradabilidade e propriedades Mecânicas de Novas Misturas Poliméricas”. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **11**: 82, 2001.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L. & POHLMANN, A.R. “Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos”. *Quim. Nova*, **26**: 726, 2006.

SEBTI, I.; CHOLLET, E.; DEGRAEVE, P.; NOEL, C. & PEYROL E. “Water sensitivity, antimicrobial, and physicochemical analyses of edible films based on HPMC and/or chitosan”. *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 693, 2007.

SHAHIDI, F. & ARACHCHI, J.K.V. “Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci. Tech.*, **10**: 37, 1999.

SHAW, D.J. Introdução a Química dos Colóides e de Superfícies, 1a Edição, Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 1995.

SILVA, S.S.; GOODFELLOW, B.J.; BENESCH, J.; ROCHA, J.; MANO, J.F. & REIS, R.L. “Morphology and miscibility of chitosan/soy protein blended membranes”. *Carbohydr. Polym.*, **70**: 25, 2007.

SINHA RAY, S. & BOUSMINA, M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: in greening the 21<sup>st</sup> century materials world. *Prog. Mater. Sci.*, **50**: 962, 2005.

SOARES, R.M.D.; LIMA, A.M.F.; OLIVEIRA, R.V.B.; PIRES, A.T.N. & SOLDI, V. “Thermal degradation of biodegradable edible films base don xanthan and starches from different sources”. *Polym. Degrad. Stab.*, **90**: 449, 2005.

SOBRAL, P.J.A. “Influência da espessura de biofilmes à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais”. *Pesq. Agropec. Bras.*, **35**: 1251, 2000.

SOBRAL, P.J.A. “Proteínas de origem animal na tecnologia de biofilmes”. Tese de Livre Docência. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de São Paulo, 2000.

SOLOMONS, T.W.G. *Química Orgânica*. 6a ed. LTC, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, 1996.

SORRENTINO, A., GORRASI, G. & VITTORIA, V. “Potential perspectives of bio - nanocomposites for food packaging applications”. *Trends Food Sci. Technol.*, **18**: 84, 2007.

SOTHORNVIT, RUNGSINEE.; RHIM, J-W. & HONG, S-I. “Effect of nano-clay type on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/clay composite films”. *J Food Eng.*, **91**, 468, 2009.

SOUZA, S.M.A. “Elaboração e caracterização de filmes comestíveis biodegradáveis a base de proteínas miofibrilares de origem bovina. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2001.



SOZER, N. & KOKINI, J.L. “Nanotechnology and its applications in the food sector”. *Trends Biotechnol.*, **27**: 82, 2009.

SRINIVASA, P.C.; RAMESH, M.N. & THARANATHAN, R.N. “Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films”. *Food Hydrocolloids*, **21**: 1113, 2007.

SUBRAMANIAN, S. & SAMPATH, S. “Adsorption of Zein on Surfaces with Controlled Wettability and Thermal Stability of Adsorbed Zein Films”. *Biomacromolecules*, **8**: 2120, 2007.

TANG, E.S.K.; HUANG, M. & LIM, L.Y. “Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles”. *Int. J. Pharm.*, **265**: 103, 2003.

TAPIA-BLÁCIDO, D.; SOBRAL, P.J. & MENEGALLI, F.C. “Development and characterization of biofilms based on Amaranth flour (*Amaranthus caudatus*)”. *J. Food Eng.* **67**: 215, 2005.

TONHI, E. & PLEPIS, A. M. G. “Preparation and characterization of collagen-chitosan blends”. *Quim. Nova*, **25**: 943, 2002.

TORRES, J.A. & KAREL, M. “Microbial stabilization of intermediate food surfaces. III. Effects of surface preservative concentration and surface pH control on microbial stability of an intermediate moisture cheese analog”. *J. Food Process Pres.*, **9**: 107, 1985.

TORRES, J.A. “Edible films and coatings from proteins”. In: HETTIARACHY, N.S. & ZIEGLER, G.R. (Ed.). Protein functionality in food systems. New York : M. Dekker, 1994.

VICENTINI, N.M. & CEREDA, M.P. “Uso de fécula de mandioca em pós-colheita de pepino (*Cucumis sativus* L.)”. *Brazilian Journal of Food Technology*, **2**: 87, 1999.

VRENTAS, J.S. & DUDA, J.L. “A free volume interpretation of the influence of glass transition on diffusion in amorphous polymers”. *J. Appl. Polym. Sci.*, **22**: 2325, 1978.

WARD, I.M. & HARDLEY, D.W. An introduction to the mechanical properties of solid polymers. Ed John Wiley & Sons, Great Britain, 1998.

WHISTLER, R.L. & MILLER, J.N. *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*. By the American Association of Cereal Chemists, 1997.

WU, Y.; GUO, J.; YANG, W.; WANG, C. & FU, S. “Preparation and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) polymer magnetic microspheres”. *Polymer*, **47**: 5287, 2006.

WU, Y.; WELLER, C. L.; HAMOUZ, F.; CUPPET, S. L. & SCHNEPF, M. “Development and applications of multicomponent edible coatings films: a review”. *Advances in Food Science and Nutrition Research*, **44**: 347, 2002.

WU, Y.; YANG, W.; WANG, C.; HU, J. & FU, S. "Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate". *Int. J. Pharm.*, **295**: 235, 2005.

XIAO, F.; ZHAO, F.; ZHANG, Y.; GUO, G. & ZENG, B. "Ultrasonic electrodeposition of gold platinum alloy nanoparticles on ionic liquid chitosan composite film and their application in fabricating nonenzyme hydrogen peroxide sensors". *J. Phys. Chem. C*, **113**: 849, 2009.

YAKIMETS, I.; PAES, S.S.; WELLNER, N.; SMITH, A.C.; WILSON, R.H. & MITCHELL, J.R. "Effect of water content on the structural reorganization and elastic properties of biopolymer films: a comparative study". *Biomacromolecules*, **8**: 1710, 2007.