



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS**



**FABIANE CERQUEIRA DE ALMEIDA**

**DESENVOLVIMENTO DE BLENDS DE AMIDO DE MANDIOCA E ISOLADO  
PROTEICO DE FEIJÃO-CAUPÍ CONTENDO OU NÃO NANOPARTÍCULAS DA  
MESMA MATRIZ AMILÁCEA**

SALVADOR

2018

**FABIANE CERQUEIRA DE ALMEIDA**

**DESENVOLVIMENTO DE BLENDS DE AMIDO DE MANDIOCA E ISOLADO  
PROTEICO DE FEIJÃO-CAUPÍ CONTENDO OU NÃO NANOPARTÍCULAS DA  
MESMA MATRIZ AMILÁCEA**

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Janice Izabel Druzian

Co-orientador: Dr. Ederlan de Souza Ferreira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia – Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

SALVADOR



2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Almeida, Fabiane Cerqueira de  
Desenvolvimento de blendas de amido de mandioca e  
isolado proteico de feijão-caupí contendo ou não  
nanopartículas da mesma matriz amilácea / Fabiane  
Cerqueira de Almeida. -- Salvador, 2018.  
81 f. : il

Orientadora: Janice Izabel Druzian.  
Coorientador: Ederlan de Soza Ferreira.  
Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciência de  
Alimentos) -- Universidade Federal da Bahia,  
Universidade Federal da Bahia, 2018.

1. Isolado proteico. 2. Feijão-caupí (*Vigna  
unquiculata*). 3. Nanopartículas de amido. 4.  
Ultrassom. 5. Filmes de amido. I. Druzian, Janice  
Izabel. II. Ferreira, Ederlan de Soza. III. Título.

 UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA   
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

## TERMO DE APROVAÇÃO

FABIANE CERQUEIRA DE ALMEIDA

### DESENVOLVIMENTO DE BLENIDAS DE AMIDO DE MANDIOCA E ISOLADO PROTEICO DE FEIJÃO-CAUPÍ CONTENDO OU NÃO NANOPARTÍCULAS DA MESMA MATRIZ AMILÁCEA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 27 de março de 2018.

#### BANCA EXAMINADORA



---

Dr<sup>a</sup>. Janice Izabel Druzian  
Universidade Federal da Bahia  
Orientadora



---

Dr<sup>a</sup>. Bruna Aparecida Souza Machado  
Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial



---

Dr<sup>a</sup>. Carolina Oliveira de Souza  
Universidade Federal da Bahia

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença constante, por guiar meus passos e me amparar em todos os momentos dessa caminhada.

Aos meus pais Fernando e Ana, pela confiança, por acreditar em meus sonhos e por caminharem sempre ao meu lado. À vocês, gratidão e meu amor eterno.

À minha irmã Daniele, pela constante presença e fé depositada em mim, pela confiança, paciência e companhia em todos os momentos.

Aos meus tios (Vânia, Mário, Fátima e Idelson) e primas (Isabela, Carolina e Luiza) pelo constante apoio e orações, por se fazerem presentes em minha vida. Aos amigos e familiares que sempre acreditaram em mim e torcem pelo meu sucesso.

À Ane Caroline, obrigada pela amizade, companhia, incentivo e principalmente pela constante torcida.

À minha orientadora prof<sup>a</sup> Dra Janice Druzian pela confiança, ensinamentos, orientações e por acreditar em minha capacidade, externando em mim a busca pelo conhecimento.

Ao meu co-orientador prof. Dr Ederlan de Souza Ferreira, pela paciência, ensinamentos e a quem externo a minha admiração pela atuação profissional, influência que levo para minha vida profissional.

À família LAPAAC, pessoas incríveis que levo no coração para sempre. Obrigada pelo apoio, pela ajuda, pelas análises, pelo aprendizado e todos os momentos de alegria. Especialmente Fabiana, Mariana e Biane, minha gratidão e amizade sempre.

A todos os amigos do LAPESCA, que de alguma forma participaram deste trabalho, incentivando, ensinando e mostrando o caminho a seguir, especialmente Carolina e Jamille, pela paciência e ensinamentos singular para construção deste trabalho.

A equipe do LabNq no ICS pela disponibilidade e auxílio no uso de equipamentos para produção das nanopartículas e ao CIEnAm pelas sequências de análises das nanopartículas.

À Faculdade UNINASSAU Pituba, pela oportunidade, permitindo-me ensinar e aprender com meus alunos. Agradecimento especial à Luciana (coordenadora de Nutrição) e Éder (coordenador de Farmácia), pela confiança depositada em meu trabalho.

Aos meus alunos, minha inspiração diária. Contem comigo sempre!

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos pela oportunidade e aos professores pelos ensinamentos.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram em todos os momentos da minha vida.

***Obrigada!***

*“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.*

**Albert Einstein**

## RESUMO

Filmes de amido têm mostrado boas perspectivas em substituição aos polímeros sintéticos, mas apresentam fracas propriedades mecânicas e de barreiras. Neste estudo foram avaliados os efeitos da incorporação de isolado proteico de feijão-caupí (0-1,5% m/v) e nanopartículas de amido de mandioca (3% m/m<sub>amido</sub>), obtidas por ultrassom, sobre as propriedades dos nanocompósitos a base de amido de mandioca (4% m/v). Foram testadas condições que tivesse maior eficiência na extratibilidade de isolado proteico da farinha do feijão-caupí, sendo efetivo com a solução de NaOH 0,05 mol L<sup>-1</sup> na proporção 1:30 m/v com 30 minutos de agitação, e o isolado proteico apresentou 72,5% de proteína e 90% de solubilidade entre pH 8-12. As nanopartículas de amido de mandioca obtidas por ultrassom apresentaram rendimento de 97,85%, com aplicação imediata aos filmes amido:proteína. A curva termogravimétrica mostrou uma redução da T<sub>onset</sub>, porém, na máxima concentração proteica, a perda de massa é semelhante à do filme controle (91,30 e 91,39g, respectivamente), com estabilidade térmica até 250-350 °C. Na presença de nanopartículas de amido, a estabilidade térmica se manteve em comparação à formulação sem proteína com a formulação controle. O módulo de elasticidade e a tensão máxima aumentaram proporcionalmente à concentração de isolado proteico (R<sup>2</sup> = 0,99 e R<sup>2</sup> = 0,93, respectivamente), com redução do alongamento (R<sup>2</sup> = -0,96). Na presença de nanopartículas, a tensão máxima apresentou aumento linear (R<sup>2</sup> = 0,99) e o alongamento reduziu, conforme modelo de regressão polinomial (R<sup>2</sup> = 0,97). A permeabilidade ao vapor de água foi afetada significativamente (p < 0,05), reduzindo progressivamente a medida em que se aumenta a concentração de isolado proteico. Os nanocompósitos de amido:proteína:nanopartículas de amido resultaram em filmes mais resistentes mecanicamente, com boa estabilidade térmica e perspectiva para aplicação como filmes biodegradáveis.

**Palavras-Chave:** Isolado proteico, feijão-caupí (*Vigna unguiculata*), nanopartículas de amido, ultrassom e filmes de amido.



## ABSTRACT

Starch films have shown good prospects in place of synthetic polymers but have poor mechanical properties and barriers. In this study, the effects of the incorporation of protein isolate of cowpea (0-1.5 % m/v) and cassava starch nanoparticles (3 % m/m starch), obtained by ultrasound on the properties of the nanocomposites a cassava starch base (4 % w/v). It was tested conditions that had greater efficiency in the extractibility of protein isolate of cowpea flour, being effective with the NaOH solution  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  in the proportion 1:30 m/v with 30 minutes of agitation, and the isolate protein showed 72.5 % protein and 90 % solubility between pH 8-12. The nanoparticles of cassava starch obtained by ultrasound showed a yield of 97.85 %, with immediate application to the starch:protein films. The thermogravimetric curve showed a reduction of  $T_{\text{onset}}$ , but at the maximum protein concentration, the loss of mass is similar to that of the control film (91.30 and 91.39 g, respectively), with thermal stability up to 250-350 °C. In the presence of starch nanoparticles, the thermal stability was maintained in comparison to the protein-free formulation with the control formulation. The modulus of elasticity and the maximum stress increased proportionally to the protein isolate concentration ( $R^2 = 0.99$  and  $R^2 = 0.93$ , respectively), with reduction of the elongation ( $R^2 = -0.96$ ). In the presence of nanoparticles, the maximum tension presented linear increase ( $R^2 = 0.99$ ) and the elongation reduced, according to the polynomial regression model ( $R^2 = 0.97$ ). The permeability to water vapor was significantly affected ( $p < 0.05$ ), progressively reducing the concentration of protein isolate. The nanocomposites of starch:protein:starch nanoparticles resulted in more mechanically resistant films with good thermal stability and perspective for application as biodegradable films.

**Keywords:** *Protein isolate, cowpea (Vigna unguiculata), extractability, starch nanoparticles, ultrasound and starch film.*

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 1** - Estrutura química da amilose (A) e da amilopectina (B).

**Figura 2** - Micrografias por microscopia eletrônica de varredura (SEM) de diferentes grânulos de amido.

**Figura 3** - Representação das cadeias de amilopectina dos tipos A, B e C (A). Regiões amorfas e cristalinas no grânulo de amido (B).

**Figura 4** - Estrutura química do glicerol.

**Figura 5** - Microscopia eletrônica de varredura do amido de pinhão (A e B), amido submetido à hidrólise ácida (C e D) e amido submetido ao ultrassom (E e F).

**Figura 6** - Mecanismo de agregação de nanopartículas adaptado por Ostwald.

### CAPÍTULO II

**Figure 1** - Effect of pH (1-12) on the solubility of the protein fraction extracted from cowpea (distilled water solution, 1:30 m/v, for 30 minutes).

**Figure 2** - Distribution of particle sizes (12.5 to 5551.0 nm) and Zeta potential of cassava starch obtained by ultrasound associated with percentage of intensity, according to the storage process (E). E1 - suspension not freeze-dried and analyzed immediately after obtaining by ultrasound; E2 - non-lyophilized suspension and analyzed after 24 hours under refrigeration; E3 - suspension not lyophilized and analyzed after 120 hours under refrigeration; E4 - non-lyophilized suspension, stored at -80 °C for 7 days, and analyzed after rapid thawing; E5 - lyophilized suspension after preparation and resuspended under manual stirring in distilled water; and E6 - lyophilized suspension after preparation and mechanically resuspend overnight in distilled water.

**Figure 3** - Behavior of water solubility of cassava starch nanocomposite films:glycerol without addition of nanoparticle and containing 3.0 % (m/v) of cassava starch nanoparticle, as a function of the concentration of the bean protein isolate.

**Figure 4** - Water vapor permeability - WVP (A), modulus of elasticity (B), tensile force (C) and elongation (D) of cassava starch nanocomposite films:glycerol, whether or not containing cassava starch nanoparticles, as a function of the concentration of protein isolate.

**Figure 5** - TG and dTG of cassava starch, protein isolate, starch nanoparticles (A and B) and nanocomposite film formulations (C and D).

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1** - Classificação das proteínas em função da solubilidade.

**Tabela 2** - Composições das frações proteicas da farinha descorticada desengordurada do caupí, cultivar “BR 14-Mulato”.

**Tabela 3** - Composição centesimal ( $\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ ) do feijão-caupí em base seca.

**Tabela 4** – Estudos referentes ao desenvolvimento de filmes poliméricos de amido e/ou proteína, reforçados ou não com nanocristais/nanopartículas.

### CAPÍTULO II

**Table 1** - Experimental planning for the preparation of nanocomposite films based on starch with different concentrations of protein isolate and nanoparticles.

**Table 2** - Effect of different parameters on the protein extraction of cowpea.

**Table 3** - Physicochemical properties of control films (F1) and cassava starch nanocomposites: glycerol with variable concentrations of protein isolate, containing or not 3.0 % of starch nanoparticles.

**Table 4** - Barrier and traction properties of control films and cassava starch nanocomposites: glycerol, with or without 3.0 % starch nanoparticles, and variable concentrations of protein isolate.

**Table 5** - Thermogravimetric parameters of raw materials and nanocomposite films obtained through the TG and dTG curves.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1. Geral.....	16
2.2. Específicos .....	16
<b>3. CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
3.1. Materiais utilizados no desenvolvimento de filmes flexíveis .....	18
3.2. Materiais poliméricos naturais .....	20
3.2.1. Amido .....	20
3.2.2. Proteínas.....	24
3.3. Blendas poliméricas amido:proteína .....	28
3.4. Plastificantes .....	30
3.5. Nanopartículas para reforço em filmes.....	32
3.6. Técnicas para caracterização dos nanocompósitos .....	35
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>37</b>
<b>4. CAPÍTULO II – Mechanical and barrier properties of cowpea protein isolate films with/without nanoparticles of cassava starch-based .....</b>	<b>49</b>
Abstract.....	50
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>51</b>
<b>2. EXPERIMENTAL .....</b>	<b>53</b>
2.1. Materials .....	<b>543</b>
2.2. Preparation of cowpea flour and extraction of protein isolate .....	54
2.3. Production of cassava starch nanoparticles by ultrasound .....	54
2.4. Distribution of Zeta size and potential of starch nanoparticles during storage ...	55
2.5. Preparation of nanocomposite films .....	56
2.6. Characterization of nanocomposite films.....	57

2.6.1. Moisture, water activity (Aw) and water solubility .....	57
2.6.2. Permeability to water vapor of films (PVA) .....	58
2.6.3. Thickness and mechanical tensile properties of films.....	58
2.6.4. Thermogravimetric analysis (TGA) .....	59
2.7. Statistical analysis .....	59
<b>3. RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>59</b>
3.1. Selection of variables for protein isolate extraction .....	59
3.2. Yield, storage, size and zeta potential of starch nanoparticles .....	63
3.3. Moisture, water activity and water solubility of films.....	65
3.4. Barrier, traction and thermogravimetric properties of films.....	67
<b>4. CONCLUSIONS .....</b>	<b>73</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>74</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o uso de polímeros sintéticos cresceu consideravelmente, aumentando a produção e tornando sua abrangência generalizada. Isso se deve principalmente ao fato de apresentarem impermeáveis, duráveis, flexíveis, de fácil processamento e baixo custo. Outra característica é que os plásticos sintéticos são inertes, e por esta razão, são amplamente utilizados para embalar alimentos. No entanto, o descarte destes polímeros ainda é um problema ambiental, já que a maioria não são biodegradáveis, e alguns tipos de polímeros podem levar até 100 anos para se degradar na natureza. Outra característica negativa associado ao seu uso é o descarte indiscriminado que vem gerando danos irreversíveis ao meio ambiente (ALBERTI et al., 2015; GONZÁLEZ; IGARZABAL, 2015; ROCHA, et al., 2014).

Em contrapartida, os consumidores vêm adotando uma postura consciente sobre os danos que o uso indiscriminado desses polímeros pode causar ao meio ambiente, assumindo um estilo mais crítico em relação às opções de consumo. Paralelo a este posicionamento, a evolução tecnológica demonstra que o planeta possui recursos disponíveis através de matérias-primas mais eficientes em favor do desenvolvimento sustentável (PACHECO, 2000; SILVA et al., 2012).

Sob esta perspectiva, surge a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias que utilizem materiais biodegradáveis, especialmente as relacionadas às embalagens, a exemplo de filmes preparados a partir de matrizes biodegradáveis. Estes filmes podem ser usados como barreira a elementos externos e, conseqüentemente, podem proteger o produto embalado de danos físicos e biológicos e aumentar a sua vida útil (HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008). No entanto, a seleção de materiais para a produção dos filmes deve ser criteriosa, pois a sua composição poderá interferir nas propriedades mecânicas, térmicas e de barreira (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010). Dentre os componentes mais utilizados estão os polissacarídeos e as proteínas, por serem provenientes de fontes renováveis e apresentarem boa capacidade de manter a estrutura dos filmes (AVÉROUS; POLLET, 2012).

O amido é o polissacarídeo utilizado como matriz em diversos filmes biodegradáveis por apresentar ampla distribuição, caráter renovável, baixo custo e a

aplicação na produção de filmes se baseia nas propriedades químicas, físicas e funcionais da amilose para formar géis e na sua capacidade para formar filmes (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010). No entanto, os filmes elaborados a base de amido apresentam limitações em suas propriedades, tais como: hidrofobicidade, fracas propriedades mecânicas e de barreira, fragilidade e indesejáveis propriedades térmicas (ANGELLIER et al., 2006; COSTA et al., 2017). Desta forma, a aplicação de plastificantes tem sido utilizada para promover melhor flexibilidade. Dentre os mais utilizados, o glicerol tem se mostrado o melhor agente para polímeros solúveis em água, pois seus grupos hidroxilas são responsáveis por interações inter e intramoleculares com as cadeias poliméricas, fornecendo uma estrutura mais flexível aos filmes (COSTA et al., 2017; SOUZA et al., 2011).

As proteínas isoladas das leguminosas têm se destacado sobre outras matrizes por fornecer suporte na estrutura de filmes, além disso, a produção de leguminosas apresentam baixo custo. Em particular, o feijão proporciona boa perspectiva como matriz polimérica, devido à alta produção no Brasil, prevista em 3.124 mil toneladas na safra 2016/2017, sendo o feijão-caupí bastante consumido na região Norte e Nordeste, com 9,5% da área cultivada (MAPA, 2017). Esta leguminosa apresenta excelente fonte proteica, variando de 18% a 35% (ELHARDALLOU et al., 2015; FROTA; SOARES; ARÊAS, 2008; NEVES et al., 2003) todavia, ainda não houve aplicação desta matriz polimérica em filmes biodegradáveis.

No entanto, os filmes produzidos apenas à base de amido e de proteínas apresentam pobres propriedades mecânicas e alta permeabilidade a vapores de água, particularmente aqueles que apresentam caráter hidrofílico (THARANATHAN, 2003). Para melhorar estas propriedades, alguns autores sugerem a incorporação de agentes de reforço, como por exemplo, nanopartículas extraídas de matrizes biodegradáveis, melhorando suas propriedades mecânicas e de barreira (ROCHA et al., 2014), como manutenção do fator biodegradabilidade.

As nanopartículas de amido são promissoras na incorporação em filmes, mesmo em baixas concentrações, e ao ser utilizadas como reforço em filmes de amido e proteína promovem boa miscibilidade e adesão interfacial entre os componentes, já que a estrutura química da matriz e da nanopartícula são

semelhantes (LIN et al., 2011). Os nanocompósitos são materiais formados por partículas, com pelo menos um componente nanométrico, utilizadas como reforço de matrizes poliméricas, tendo propriedades influenciadas pela constituição, distribuição e interação entre as matérias-primas, podendo alcançar resistência e rigidez (MARINELLI et al., 2008).

A grande disponibilidade das fontes citadas, associado ao baixo custo, justifica a utilização destas na obtenção de filmes reforçados com nanopartículas, apresentando caráter renovável, propriedades adequadas associadas ao seu tipo de aplicação, quando comparados aos materiais sintéticos. Diversos estudos trazem o desenvolvimento de filmes biodegradáveis à base de diferentes fontes de amido associado ao glicerol e nanomateriais, no entanto, até o momento, não haviam pesquisas voltadas ao uso de proteínas de origem vegetal e bionanopartículas de reforço obtidas por ultrassom, como matrizes poliméricas na produção de filmes que apresente melhores propriedades de reforço.

Diante do exposto, este estudo buscou viabilizar a incorporação de materiais poliméricos reforçados mecanicamente, como um material inovador e de grande interesse industrial, como forma de agregar valor às cadeias produtivas do amido de mandioca e do feijão-caupí, contribuindo assim, para o avanço científico e tecnológico dessa área de interesse.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Desenvolver e caracterizar blendas de amido de mandioca e isolado proteico de feijão-caupí reforçados ou não com nanopartículas de amido, a fim de avaliar os efeitos das incorporações da proteína e da partícula nas propriedades dos biomateriais resultantes.

### 2.2. Específicos

- Selecionar parâmetros de extração da proteína para a produção de isolado proteico de feijão-caupí;
- Produzir nanopartículas de amido de mandioca por ultrassom e avaliar o tempo de estocagem;
- Avaliar e definir as concentrações das matrizes poliméricas de amido e de isolado proteico na composição das blendas e das nanopartículas incorporadas aos nanocompósitos;
- Desenvolver nanocompósitos por *casting* a partir de diferentes concentrações de isolado proteico e na presença ou ausência de nanopartícula;
- Avaliar os efeitos da incorporação do isolado proteico e das nanopartículas de amido nas propriedades mecânicas, térmicas e de barreira dos nanocompósitos produzidos.

**CAPÍTULO I**

---

**Revisão de Literatura**

### 3. CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Materiais utilizados no desenvolvimento de filmes flexíveis

A embalagem é definida como o recipiente, o pacote ou o envoltório destinado a garantir a conservação e facilitar o transporte e manuseio dos alimentos (BRASIL, 2002). Em complemento, são funções da embalagem, conter, proteger, comunicar e conferir conveniência, nas etapas de armazenamento e distribuição, além de ser veículo de informação ao consumidor (SOUZA et al., 2017), sendo muito importante na conservação do alimento embalado, mantendo qualidade e segurança, atuando como barreira contra fatores responsáveis pela deterioração química, física e microbiológica (JORGE, 2013).

A embalagem dinamiza o setor de produção e consumo, tornando o produto acessível em nível mundial, viabilizando o entendimento da população global no que concerne à alimentação, e agregam valor aos produtos de empresas que atuam neste setor. Em 2014, a indústria de embalagem brasileira teve faturamento estimado de 55,1 bilhões de reais e o plástico representa a maior participação com produção correspondente a 39,07% do total (ABRE, 2014). Esta mesma pesquisa retrata que as exportações diretas do setor de embalagem tiveram um faturamento de 523,2 milhões de dólares, com as embalagens plásticas representando 38,25% do total exportado.

São vários os tipos de materiais utilizados para embalar alimentos, como metal, plástico, vidro, papel, madeira, entre outros, variando de acordo o tipo de produto e o mercado a que se destina (SOUZA et al., 2017). No entanto, diversos materiais não são biodegradáveis ou levam anos para se degradar, impactando em danos ao meio ambiente.

Existem vários materiais biopoliméricos de ocorrência natural para uso em formulações de filmes, as quais são compatíveis entre si e com outros aditivos, onde a formação do filme envolve associações inter e intramoleculares e o grau de coesão depende de fatores como a estrutura do polímero, temperatura e a presença de moléculas plastificantes (THARANATHAN, 2003).

Nesse contexto, torna-se desafio para as indústrias de embalagens garantir a segurança do produto, atender ao público destinado e se manter num

mercado competitivo. Os polímeros são componentes prioritários na indústria de embalagens, onde o plástico é o mais difundido como material para embalagem por apresentar boa resistência mecânica, térmica e de barreira (JORGE, 2013), bem como ser de fácil processamento, baixo custo e alta durabilidade, o que delonga centenas de anos para se decompor, já que sua origem advém da indústria petroquímica, o que o torna um material não biodegradável e não renovável (ZHANG et al. 2007). Estes fatores vêm levando o consumidor a assumir uma atitude mais crítica sobre o uso indiscriminado de recursos que possam causar danos ao meio ambiente. Uma das soluções imediatas para este impacto é a reciclagem destes polímeros, um mercado crescente, mas que encontra desafios em sua aplicação, pois algumas embalagens são difíceis de separar seus componentes poliméricos. Outra ação praticada é a incineração, porém pode ocorrer a formação de gases tóxicos, necessitando de rigoroso controle para sua aplicação (SOARES et al., 2002).

Sob esta perspectiva, a preocupação e exigência do mercado, o custo-benefício e os impactos ambientais produzidos por estes polímeros sintéticos, associados à evolução tecnológica, têm despertado interesse em pesquisas para o desenvolvimento de materiais ambientalmente sustentáveis. A intenção de reduzir o impacto ambiental causado pelos polímeros sintéticos tem impulsionado as pesquisas no desenvolvimento de filmes biodegradáveis com matrizes renováveis, mantendo ou melhorando as propriedades mecânicas e de barreira.

Neste contexto, destaca-se o amido e a proteína que são promissoras matrizes na produção dos filmes, já que o amido é um polissacarídeo abundante no mundo e as proteínas possuem estrutura de alto potencial para interações intermoleculares (MALI; GROSSMANN, 2003; ROCHA et al., 2014). Juntos, o amido e a proteína são considerados fontes renováveis, de baixo custo e ampla produção mundial.

O amido é um polímero amplamente utilizado como matriz em filmes por ser biodegradável, de fonte natural e renovável, apresenta baixo custo de produção e está mundialmente distribuído. Além disso, apresentam possibilidades de modificação química e física, permitindo produzir filmes e revestimentos resistentes (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010). No entanto, filmes contendo apenas

amido apresentam fracas propriedades mecânicas e de barreira, necessitando que sejam incorporados aditivos para melhorar essas limitações (VEIGA-SANTOS et al., 2007).

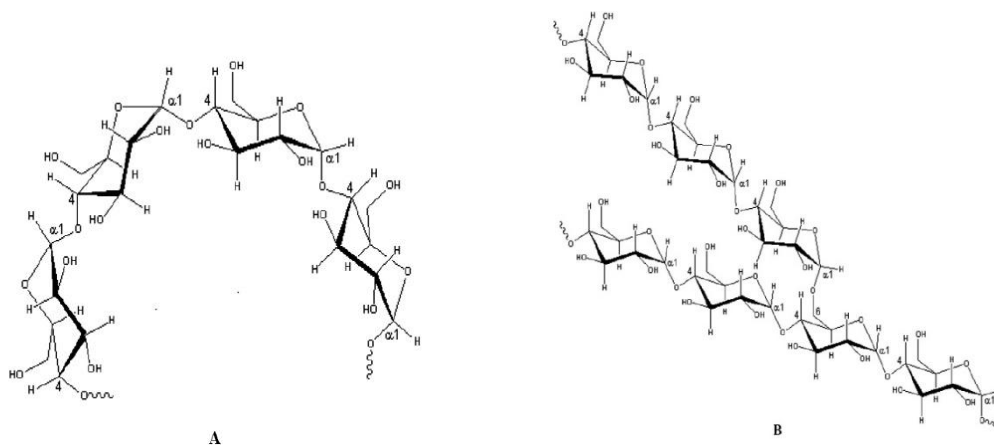
A obtenção de filmes está baseada no potencial de solubilização dos polímeros, com a incorporação de aditivos na intenção de produzir uma solução filmogênica (HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008). Dentre estes aditivos, destacam-se os plastificantes, uma molécula de baixa volatilidade e de natureza química similar à do polímero usado na constituição do filme (REIS et al., 2011). Os plastificantes têm a capacidade de reduzir interações entre moléculas, bem como aumentar a flexibilidade do filme (ROCHA et al., 2014).

## **3.2. Materiais poliméricos naturais**

### **3.2.1. Amido**

O amido está amplamente distribuído em diversas fontes vegetais, atuando como um carboidrato de reserva, abundante em cereais (40 a 90% do peso seco), leguminosas (30 a 50% do peso seco), tubérculos (65 a 85% do peso seco) e frutas imaturas ou verdes (40 a 70% do peso seco), além de ser a fonte mais importante na alimentação humana, representando em torno de 90% dos polissacarídeos da dieta (DENARDIN; SILVA, 2009).

Em sua organização molecular, o amido exibe um caráter parcialmente cristalino ou semicristalino, variando de 20 a 45% o grau de cristalinidade. O amido é classificado como um homopolissacarídeo constituído por dois polímeros de glicose: amilose (Figura 1A) e amilopectina (Figura 1B). Em diferentes variedades de amido, o conteúdo de amilose varia entre 72 e 82%, e o de amilopectina de 18 a 28% (LE CORRE; BRAS; DUFRESNE 2010).

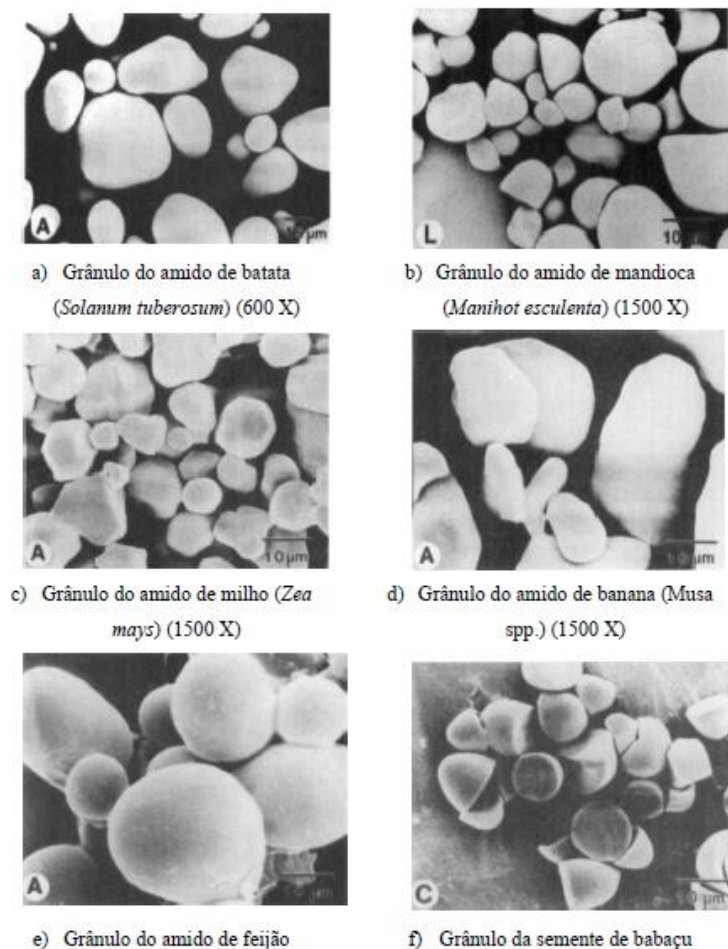


**Figura 1** - Estrutura química da amilose (A) e da amilopectina (B). Fonte: adaptado de Denardin e Silva (2009).

A amilose é um polímero linear constituído por unidades de  $\alpha$ -D-glicopiranosose ligadas em  $\alpha$ -(1-4), com peso molecular de 250.000 Daltons, enquanto que a amilopectina é formada por uma cadeia ramificada formada por unidades de  $\alpha$ -D-glicopiranosose ligadas em  $\alpha$ -(1-4) e  $\alpha$ -(1-6), sendo esta fração a mais importante, estrutural e funcionalmente, pois sozinha é suficiente para formar o grânulo (DENARDIN; SILVA, 2009). Variações nas proporções entre estes componentes e em suas estruturas e propriedades podem resultar em grânulos de amido com propriedades físico-químicas e funcionais muito diferentes, que podem afetar as suas aplicações industriais (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

A parte linear das moléculas de amilopectina formam estruturas helicoidais duplas, estabilizadas por ligações de hidrogênio entre grupamentos hidroxila, dando origem às regiões cristalinas dos grânulos. A região amorfa é composta pelas cadeias de amilose e pelas ramificações da amilopectina (SOUZA; ANDRADE, 2000).

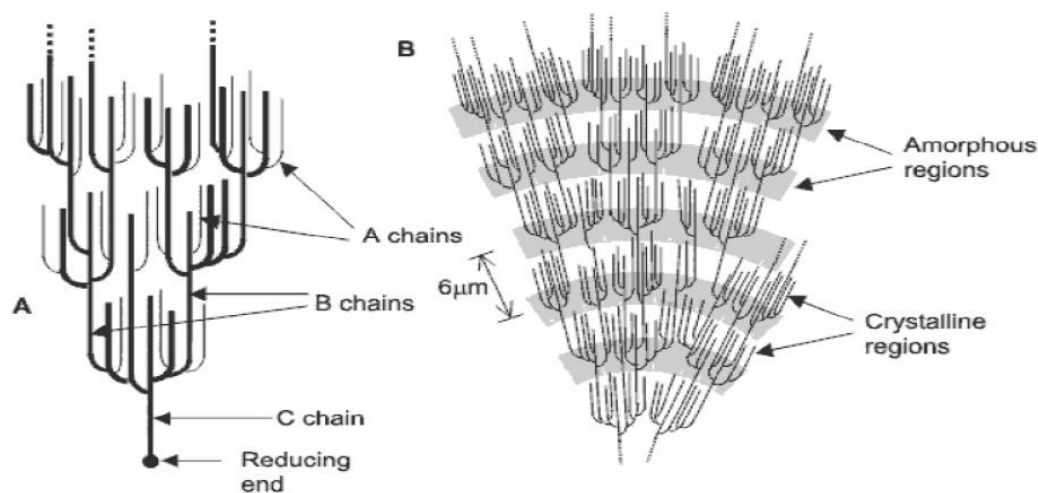
Nas plantas, o amido encontra-se na forma de grânulos, onde o formato (redondo, oval, poliédrico) e a distribuição do tamanho das partículas (unimodal, bimodal, trimodal) dos grânulos depende da origem botânica (Figura 2).



**Figura 2** - Micrografias por microscopia eletrônica de varredura (SEM) de diferentes grânulos de amido. Fonte: adaptado de Lemos (2017).

Os polímeros de amilopectina são responsáveis pela expansão do grânulo de amido, por possuir alta capacidade de absorção de água, sendo facilmente dissolvida a temperatura de 95 °C. Por conta dessa expansão, as moléculas de amilopectina não tendem a recristalização, confirmando seu poder de retenção de água (MOURA, 2008).

As cadeias de amilopectina estão organizadas (Figura 3A) sugerindo uma classificação de cadeias do tipo A não-redutora de glicoses por ligações  $\alpha$ 1-4, sem ramificações, unidas a uma cadeia tipo B por meio de ligações  $\alpha$ 1-6, podendo conter cadeias tipo A e tipo B. A cadeia tipo C é única e composta por ligações  $\alpha$ 1-4 e  $\alpha$ 1-6, com grupamento terminal redutor (DENARDIN; SILVA, 2009). A organização molecular dos grânulos de amido confere uma característica cristalina demonstrado na Figura 3B.



**Figura 3** - Representação das cadeias de amilopectina dos tipos A, B e C (A). Regiões amorfas e cristalinas no grânulo de amido (B). Fonte: adaptado de Denardin e Silva (2009).

As principais fontes comerciais de amido são o milho, a batata, o arroz, o trigo e a mandioca, sendo este último bastante estudado para a produção de embalagens biodegradáveis. O amido de mandioca apresenta características físico-químicas de grande interesse industrial e oferece menor dano ao meio ambiente por ser totalmente degradado por microrganismos e enzimas capazes de hidrolisar o carboidrato em unidades de glicose (SANTANA, 2015).

Para obter um material termoplástico a base de amido, sua estrutura granular semicristalina precisa ser destruída para dar origem a uma matriz polimérica homogênea e essencialmente amorfa (MALI, GROSSMANN; YAMASHITA, 2010). No entanto, grânulos de amido são insolúveis em água fria, devido às fortes ligações de hidrogênio que as mantêm. Mas, o aquecimento de suspensões de amido em temperatura elevada provoca o processo irreversível da gelatinização, onde os grânulos sofrem mudanças como a perda da cristalinidade, absorção de água e o inchaço dos grãos, necessário para produção da solução filmogênica (JIMÉNEZ et al., 2012). Para tanto, o amido sofre ainda a retrogradação, propriedade que acontece devido ao resfriamento, onde as moléculas de hidrogênio ou grupos de moléculas começam a se associar formando uma estrutura ordenada e cristalina (COSTA, 2013; FRANCO et al., 2002; LOBO; SILVA, 2003). Mudanças no amido provenientes dos processos de gelatinização e retrogradação podem



determinar as características de filmes biodegradáveis (COSTA, 2013; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

Na elaboração de filmes pode-se utilizar a técnica de *casting*, onde a solução filmogênica é vertida em placas, de forma a controlar a espessura dos filmes, porém variações são inevitáveis (GODBILLOT et al., 2006; MULLER; YAMASHITA; LAURINDO, 2008). Mali, Grossmann e Yamashita (2010) relatam que após a gelatinização térmica dos grânulos em excesso de água, amilose e amilopectina se dispersam na solução aquosa e, durante a secagem, se reorganizam, formando uma matriz contínua, dando origem aos filmes.

As condições de secagem em que são submetidos os filmes por *casting* influenciam na estrutura cristalina dos filmes a base de amido e nas propriedades mecânicas e de barreira. Os filmes são secos em temperatura em torno de 30 a 40 °C e a umidade relativa durante a secagem influencia diretamente no grau de cristalinidade, o que pode gerar alterações nos filmes durante o armazenamento e utilização (COSTA, 2016; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

Outro fator de importância nesta técnica é o controle da espessura, pois este parâmetro afetará análises como as propriedades mecânicas e a permeabilidade ao vapor de água, e quanto maior for a espessura, mais resistentes à mecânica e menos permeabilidade ao vapor de água terão os filmes. Desta forma, um controle rigoroso deve ser feito na quantidade de solução dispersa nas placas e em possíveis desníveis na estufa utilizada para secagem (COSTA, 2013; COSTA, 2016; SOBRAL, 2000).

### **3.2.2. Proteínas**

Dentre os biopolímeros de interesse para produção de filmes, as proteínas aparecem como uma aplicação promissora para proteção e preservação de produtos. Diversas proteínas, como zeína de milho, glúten de trigo, albumina de soro, caseína, colágeno, e outras, vêm sendo estudadas como agentes potenciais na formação de filmes (CONDÉS et al., 2015).

As leguminosas são consideradas excelentes fontes de proteína, principalmente em grãos contidos em vagens, ricos em tecido fibroso. São cultivadas em nível mundial abrangendo 600 gêneros em aproximadamente 19.000 espécies,

no entanto, cerca de 20 espécies apresentam significado econômico. As sementes de leguminosas contêm cerca de 20% a 30% de proteína em sua composição, porém apresentam baixa digestibilidade.

Desta forma, juntamente com os cereais, formam a principal fonte proteica da dieta do ser humano (NEVES; LOURENÇO; SILVA, 2001; NEVES et al., 2003). Os gêneros mais utilizados na alimentação são *Pisum*, *Vicia*, *Lens*, *Dolichos*, *Vigna*, *Cajanus* e *Phaseolus*, e acumulam, no cotilédone, grandes quantidades de proteínas durante o desenvolvimento da planta, para o exercício de funções catalíticas e estruturais e de reserva nutricional (LOURENÇO, 2000). De acordo com a solubilidade as proteínas podem ser classificadas conforme Tabela 1.

**Tabela 1** - Classificação das proteínas em função da solubilidade.

<b>Proteínas</b>	<b>Solubilidade</b>	<b>Exemplos</b>
Albuminas	Solúveis em água	Ovoalbumina Lactoalbumina
Globulinas	Solúveis em soluções salinas	Miosina Lactoglobulina
Prolaminas	Solúveis em soluções alcoólicas	Gliadina (trigo) Zeína (milho)
Glutelinas	Solúveis em soluções ácidas e alcalinas diluídas	Glutenina (trigo, arroz)
Escleroproteínas	Insolúveis nos solventes anteriores	Colágeno Queratina

Fonte: Adaptado de Sgarbieri, 1996.

A solubilidade de uma proteína poderá ser modificada pela influência de vários fatores como pH, força iônica, constante dielétrica do solvente e temperatura. Em geral, as proteínas são solúveis em baixos ou elevados valores de pH, onde o excesso de cargas de mesmo sinal produz repulsão das moléculas, contribuindo para uma maior solubilidade. Já no ponto isoelétrico (pH 3,5 a 6,5), as proteínas compensam intrinsecamente as suas cargas, as moléculas não se repelem, o que reduz a solubilidade e formam precipitados (LOURENÇO, 2000). A concentração salina tem influência significativa na solubilidade das proteínas, que são mais solúveis em baixas concentrações de sais, isto porque os íons salinos tendem a se associar às proteínas contribuindo para maior hidratação ou repulsão das moléculas de proteína, favorecendo a solubilidade da proteína *salting in*. Em contrapartida, em elevadas concentrações salinas, os íons salinos formam uma capa de hidratação competindo pela água com a proteína, desidratando-as, e devido às forças

eletrostáticas e não polares formam o efeito denominado *salting out* (SGARBIERI, 1996).

Nas leguminosas, a fração majoritária de proteínas é constituída pelas albuminas e globulinas (Tabela 2), esta última compreende um percentual de até 80% na composição das leguminosas.

**Tabela 2** - Composição das frações proteicas da farinha descorticada desengordurada do caupí, cultivar "BR 14-Mulato"

Fração	% Proteína/Farinha	% Proteína/Total de proteína
Farinha descorticada	29,32	100
Solúveis em sal	22,86 ± 1,68	77,94 ± 5,71
Albumina	2,97 ± 0,46	10,11 ± 1,57
Globulina total	12,31 ± 0,45	41,99 ± 1,54
Prolamina**	-	-
Glutelina	2,29 ± 0,30	7,81 ± 1,049
Resíduo final	1,88 ± 0,15	6,4 ± 0,52

\*Utilizou-se como base de cálculo 29,32% de proteína na farinha decorticada e desengordurada.

\*\*Não foi quantificada. Resultados representam médias ± desvio padrão de três determinações. Fonte: Adaptado de Neves et al., 2003.

As globulinas de leguminosas são classificadas de acordo com seu coeficiente de sedimentação em ultracentrifugação em unidades de Svedberg, e as frações 7S e 11S são as mais importantes contribuindo com mais de 70% do total de proteínas que compõem a maioria das leguminosas (ESKIN; SHAHIDI, 2015). As globulinas 7S, denominadas vicilinas, representam o maior componente quantitativo nos gêneros *Phaseoleae* e *Vigna unguiculata* (LOURENÇO, 2000).

Dessa forma, o conteúdo proteico e a relação globulina:albumina são variáveis e sofrem influências de fatores como espécie, variedade e de agentes associados ao cultivo, sendo necessária a caracterização das propriedades das proteínas de leguminosas (NEVES; LOURENÇO; SILVA, 2001). Diversas são as fontes de leguminosas estudadas: soja (NAGANO et al., 2012), lentilha (NEVES; LOURENÇO; SILVA, 2001), tremoço (FONTANARI et al., 2012), grão-de-bico (SILVA; NEVES; LOURENÇO, 2001) e variedades de feijões (FROTA; SOARES; ARÊAS, 2008; LOPES JUNIOR et al., 2010; NEVES et al., 2003; PEREIRA; COSTA, 2002). Dentre as espécies de feijões, o caupí tem sido amplamente estudado para diferentes destinos industriais.

O feijão-caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) tem origem africana, foi introduzido no Brasil na segunda metade do século XVI, por colonizadores no estado

da Bahia. É conhecido popularmente como feijão-de-corda, feijão-macassar, feijão-fradinho, dentre outros, e representa uma das espécies mais importantes social e economicamente para o país (FREIRE-FILHO, 2011). Segundo estes mesmos autores, a produção de feijão-caupí se concentra em áreas semiáridas da região Nordeste, além da região Norte e considerável expansão para a região Centro-Oeste do Brasil. De acordo com a Embrapa Meio-Norte (LEITE, 2018), os cultivares de feijão-caupí ocupam 30% da área total de cultivo no país, o que gera, diretamente, emprego e renda, representando 1.451.578 empregos por ano. O Brasil começou a exportar feijão-caupí em 2007, no entanto, no período de 2005 a 2009, países do continente africano totalizavam uma média de 86,74% de área cultivada de feijão-caupí, com estimativa de produção em torno de 86,49%.

O feijão-caupí, assim como as demais leguminosas, representa uma excelente fonte proteica, com uma média de 23% a 25% de proteína (Tabela 3), sendo utilizada para o consumo humano, mas podem ser utilizadas no desenvolvimento de filmes biodegradáveis, a partir de matriz polimérica natural, no entanto, não havia sido estudada para este propósito.

**Tabela 3** - Composição centesimal ( $\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ ) do feijão-caupí em base seca.

Componentes	Feijão-caupí
Umidade	$6,0 \pm 0,16$
Cinzas	$2,6 \pm 0,05$
Proteínas	$24,5 \pm 0,47$
Lipídios	$2,2 \pm 0,02$
Fibras totais	$19,4 \pm 1,07$
Insolúveis	$16,6 \pm 1,32$
Solúveis	$2,7 \pm 0,56$
Carboidratos	$51,4 \pm 0,63$
Valor energético	$323,4 \pm 0,84$

*Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três determinações independentes.*

Fonte: Adaptado de Frota, Soares, Arêas, 2008.

No entanto, a qualidade das proteínas de leguminosas é afetada devido à limitação de aminoácido e presença de inibidores de tripsina (ELHARDALLOU et al., 2015). A digestibilidade das proteínas e a qualidade nutricional reduzem provenientes de fatores antinutricionais, compostos naturalmente em alimentos.

A maior parte dos isolados e concentrados de proteínas vegetais contém inibidores de tripsina e quimiotripsina (tipo Kunitz e Bowman-Birk) e lectinas. Estes inibidores impedem a hidrólise das proteínas provenientes de leguminosas pelas

proteases pancreáticas, enquanto que as lectinas são glicoproteínas que se ligam às células da mucosa intestinal e interferem na absorção de aminoácidos (COZZOLINO, 2012).

### **3.3. Blendas poliméricas amido:proteína**

As blendas poliméricas se destacam por sua razão custo e benefício, de forma que suas propriedades físicas e químicas podem ser alteradas para variadas aplicações obtendo materiais com propriedades diferentes às dos polímeros puros.<sup>51</sup> Por definição, as blendas poliméricas consistem de mistura mecânica de dois ou mais polímeros, sem que haja um elevado grau de reações químicas entre eles (SILVA, 2013).

Não existe um método padrão para a elaboração de filmes que apresente uma característica funcional e físico-química ideal, mas a preparação de filmes depende de vários fatores, como tipo de amido e plastificante, além de outros componentes que aperfeiçoem filmes com propriedades adequadas (JIMÉNEZ et al., 2012).

Na Tabela 4 são apresentados estudos feitos com matrizes poliméricas, com destaque para as matrizes objetos desse estudo. Fica evidente que diversos estudos elaboram filmes com boas propriedades mecânicas e de barreira a partir de amido ou proteína adicionadas de um plastificante e de um nanomaterial para reforço, no entanto, em se tratando de blendas poliméricas amido:proteínas, são poucos os estudos que incorporam material para reforço, não caracterizando nanocompósitos.

**Tabela 4** - Estudos referentes ao desenvolvimento de filmes poliméricos de amido e/ou proteína, reforçados ou não com nanocristais/nanopartículas.

Matriz polimérica	Fonte	Plastificante	Reforço	PVA*	Resistência à Tração*	Referências
<b>Amido</b>	Batata, mandioca	Glicerol e sorbitol	Nanopartículas (nano-argila e dióxido de nano-silício)	↓	↑	Abdorrezza; Abd Karim, 2013
	Mandioca	Glicerol	Nanocristal de amido de mandioca	↓	↑	Costa et al., 2017
	Mandioca	Glicerol	Nanofibra de celulose	↓	↑	Santana et al., 2016
	Milho	Glicerol e xilitol	Nanopartícula de amido de milho	-	-	Shi et al., 2013
	Mandioca	Sacarose e açúcar invertido	Nanocristais de celulose	-	↑	Silva; Pereira; Druzian, 2012
	Batata	Glicerol	Nanopartículas de quitosana	↓	↑	Chang et al., 2010
	Amido de mandioca	Glicerol	Nanocristais de amido de milho	↓	-	García et al., 2009
	Amido de ervilha	Glicerol	Nanocristais de amido de milho	↓	↑	Li et al., 2015
	Amido de arroz	Sorbitol	Nanocristais de amido de arroz	↓	↑	Piyada; Waranyou; Thawien, 2013
<b>Proteína</b>	Amaranto	Glicerol	Nanocristais de amido de milho	↓	↑	Condés et al., 2015
	Soja	Glicerol	Nanocristais de amido de milho	↓	↑	González; Igarzabal, 2015
	Soja	Glicerol	-	-	↑	Kunte et al., 1997
	Soja	Glicerol	-	-	-	Mauri; Añon, 2006
	Soja	Glicerina	-	-	↑	Rhim et al., 2000
<b>Blenda amido:proteína</b>	Mandioca:soja	Glicerol	-	-	-	Rocha et al., 2014
	Milho:soja	Glicerol	-	-	-	Soares; Scremin; Soldi, 2005

\*↑elevadas propriedades; ↓baixas propriedades

Para a maioria dos estudos apresentados, a incorporação de materiais de reforço resultou em aumento da resistência à tração e redução da permeabilidade ao vapor de água. As nanopartículas são susceptíveis a ligações com grupos hidroxilas fortalecendo as forças moleculares entre nanopartículas e amido (ABDORREZA; ABD KARIM, 2013).

Com isto, filmes biodegradáveis produzidos a partir de polissacarídeos e proteínas, são desenvolvidos para formar matrizes coesas, apresentando propriedades mecânicas e de barreira mais efetivas. As interações entre as proteínas e os polissacarídeos melhoram as características funcionais das proteínas, onde estas podem atrair os polissacarídeos, a depender de fatores como pH, força iônica, temperatura e concentração (ROCHA et al., 2014).

Para melhorar a permeabilidade aos vapores de água, os filmes podem ser produzidos com reforço de compósitos formados por nanopartículas e plastificantes, no intuito de conferir alta resistência e rigidez aos filmes. Com isto, desenvolvem-se filmes nanocompósitos que são definidos como materiais formados por meio da adição de nanopartículas biodegradáveis em matrizes poliméricas, também biodegradáveis, com o intuito de originar polímeros com maior resistência mecânica e maior estabilidade térmica (ESTEVES; BARROS-TIMMONS; TRINDADE, 2004). Os nanocompósitos são materiais híbridos, nos quais pelo menos um de seus componentes tem dimensões nanométricas (SOUZA et al., 2011).

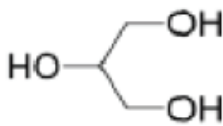
### **3.4. Plastificantes**

A presença de um plastificante, além da água, é necessária a fim de obter um material sem fragilidade, flexível e extensível (JIMÉNEZ et al., 2012). O plastificante deve ser compatível com o polímero, sendo adicionado normalmente na proporção de 10 a 60 g.100 g<sup>-1</sup> de matéria seca (COSTA, 2016; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

Os plastificantes reduzem as forças intermoleculares e aumentam a mobilidade das cadeias dos polímeros, com diminuição de possíveis descontinuidades e zonas quebradiças, resultando assim em materiais com menores temperaturas de transição vítrea (T<sub>g</sub>), favorecendo assim, a transição do material de

um estado vítreo, caracterizado por uma menor mobilidade molecular entre as cadeias do polímero e por uma maior rigidez, para um estado borrachento ou gomoso, de maior mobilidade molecular e, conseqüentemente, maior flexibilidade (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

Diversos são os plastificantes utilizados na elaboração de filmes, a exemplo de sorbitol, glicerol, xilitol, açúcar invertido e sacarose, estes dois últimos, normalmente, combinados entre si. Dentre estes, o glicerol é o mais comumente empregado e pode interagir com as cadeias de amido, aumentando a mobilidade molecular, e conseqüentemente, a flexibilidade dos filmes (SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007). Trata-se de um tri-álcool com três carbonos, denominado pela IUPAC de 1,2,3-propanotriol (Figura 4), comercialmente conhecido como glicerina. É uma molécula altamente flexível formando ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, sendo constituída por três hidroxilas que são responsáveis pela solubilidade em água e sua natureza higroscópica (BEATRIZ; ARAÚJO; LIMA, 2011).



**Figura 4** - Estrutura química do glicerol. Fonte: Costa, 2016.

No entanto, a presença de plastificante influencia no decréscimo da Tg, refletindo nas propriedades mecânicas, sendo possível observar redução na força de perfuração e o aumento da deformação dos filmes (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010). A depender da concentração adicionada, os plastificantes podem causar efeito antiplastificante, acarretando um resultado contrário, reduzindo a flexibilidade e hidroflicidade, quando este interage com a matriz polimérica, aumentando o grau de interações e a rigidez da matriz (COSTA, 2013; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).



### 3.5. Nanopartículas para reforço em filmes

A nanotecnologia tem como objetivo, fabricar, manipular e aplicar estruturas biológicas ou não biológicas, em escala nanométrica, que apresentam propriedades funcionais únicas não encontradas em escala macro (ASSIS et al., 2012). Para aplicação em filmes, comumente vê-se em pesquisas os termos nanopartículas e nanocristais, as quais apresentam objetivos semelhantes, porém processos de produção e estabilidade diferenciados.

Nanocristais são obtidos normalmente por hidrólise ácida de partes amorfas de grânulos, enquanto que nanopartículas são consideradas pequenas partículas obtidas por meio de processos físicos, podendo incluir regiões amorfas (LE CORRE; BRAS; DUFRESNE, 2010). Nanopartículas e nanocristais podem ser produzidos por diferentes métodos químicos, físicos ou enzimáticos e são classificadas conforme o meio de produção em “top down”, produzidas a partir de partículas maiores ou “bottom up”, por meio de ligações entre átomos ou moléculas e são reguladas pelas leis da termodinâmica (KIM; PARK; LIM, 2015).

Tratamentos físicos têm sido reportados na literatura (FRANCO et al., 2002; GODBILLOT et al., 2006; LOBO; SILVA, 2003; MULLER; YAMASHITA; LAURINDO, 2008), como a ultrassonicação, um método mais rápido, de fácil implementação, sem uso de aditivos químicos e elevado rendimento (GODBILLOT et al., 2006; LOBO; SILVA, 2003).

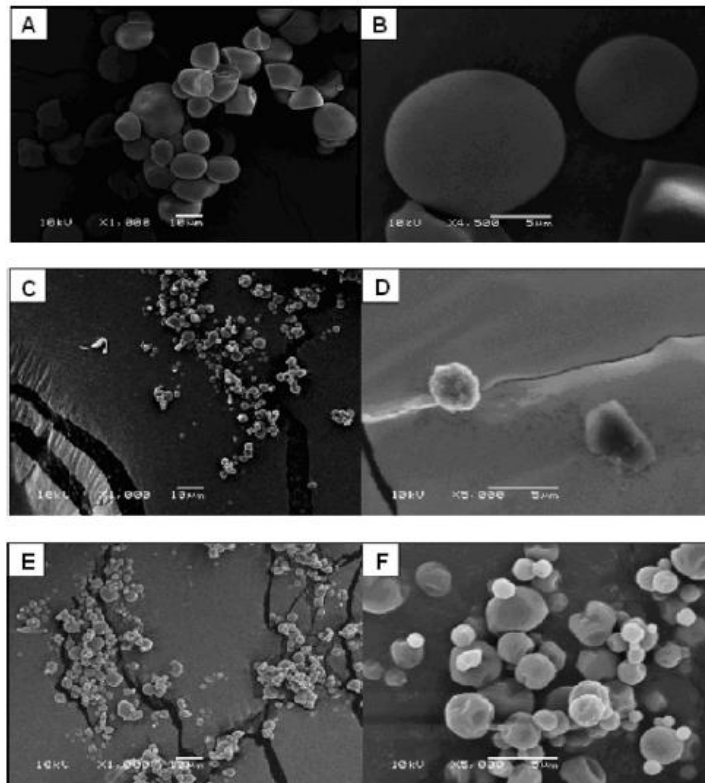
Comumente, na obtenção de nanocristais, é utilizado o processo de hidrólise ácida, resultando em produtos com alta cristalinidade. No entanto, este método apresenta baixo rendimento, longo período de tratamento e uso de ácido concentrado.<sup>57</sup> Estudos relatam mínimo de 5 dias para a produção por meio da hidrólise ácida, com rendimento inferior a 20% (KIM et al., 2013; KIM; PARK; LIM, 2015).

Desta forma, processos físicos e menos invasivos têm sido utilizados como meio de produzir nanopartículas, a exemplo da ultrassonicação, que resulta na distorção da região cristalina, melhorando a solubilidade do amido, o inchaço dos grãos e reduzindo a entalpia de gelatinização (HAAJ et al., 2013). A ultrassonicação apresenta vantagens sobre a hidrólise ácida por não utilizar reagentes químicos e

nenhuma outra etapa de purificação é necessária, alcançando um rendimento de aproximadamente 100% (KIM; PARK; LIM, 2015).

Estes nanomateriais variam em tamanho (40 e 150nm) e formas, a depender da fonte de amido, e tem sido estudado através da técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS), que mede pelo movimento Browniano de partículas em solução, e determina o diâmetro hidrodinâmico. A estabilidade das nanopartículas em solução é atribuída a presença de cargas superficiais dessas estruturas (HERRERA; VASATHAN; CHEN, 2017). Devido ao seu tamanho, as nanopartículas têm uma área superficial proporcionalmente maior e, conseqüentemente, mais átomos em sua superfície do que suas contrapartes em microescala (SANTANA, 2015), o que facilita a interação com a matriz polimérica e com o plastificante aplicado.

Em estudo de Gonçalves et al (2014), que caracterizaram partículas nanométricas de amido de pinhão obtido por hidrólise ácida e ultrassom, por meio das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura foi possível avaliar as alterações morfológicas dos grânulos de amido (Figura 5). Os autores afirmam que o amido nativo apresenta superfície lisa, mas com algumas depressões (Figura 5A). Ao ser submetido à hidrólise ácida, mostrou aparência áspera indicando que houve hidrólise das partes amorfas na superfície dos grânulos, mas com tamanho nanométrico (Figura 5C), podendo afetar sua funcionalidade e propriedades físico-químicas. No entanto, o amido submetido ao processo de ultrassom apresentou menores irregularidades em sua superfície (Figura 5F), mas com tendência a menor solubilidade devido à ruptura das ligações de hidrogênio, possibilitando novas ligações, podendo este fato ser resolvido ao se aplicar maior intensidade na ultrassonicação.



**Figura 5** - Microscopia eletrônica de varredura do amido de pinhão (A e B), amido submetido à hidrólise ácida (C e D) e amido submetido ao ultrassom (E e F). Fonte: Adaptado de Gonçalves et al., 2014.

Desta forma, apesar dos dois processos produzirem nanopartículas em tamanhos nanométricos, a obtenção de nanopartículas por ultrassom apresenta maior semelhança em relação ao amido nativo, diferenciando apenas na sinérese (GONÇALVES et al., 2014). Esse processo oferece ainda a vantagem de ser rápido e de fácil implementação sem a necessidade das repetidas lavagens, já que não houve adição de agentes químicos, inferindo que o rendimento da produção pode ser próximo de 100% (HAAJ et al., 2013).

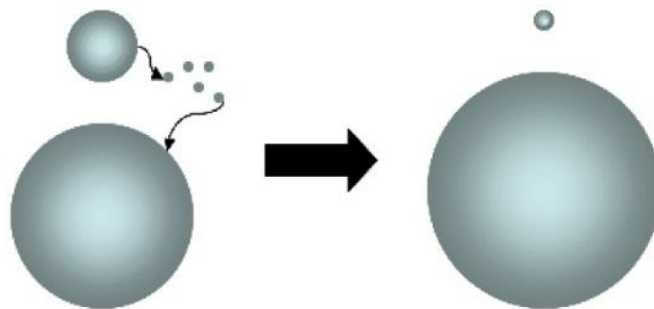
As nanopartículas de amido vêm sendo amplamente estudadas e apontadas em diversas pesquisas como agentes de reforço em nanocompósitos utilizando diferentes matrizes poliméricas (ASSIS et al., 2012; CONDÉS et al., 2015; GONZÁLES; IGARZABAL, 2015; HAAJ et al., 2016; LE CORRE; ANGELLIER-COUSSY, 2014; LIN et al., 2011; SADEGH-HASSANI; NAFCHI, 2014; SHI et al., 2013). Nanopartículas derivadas de polissacarídeos se tornaram foco de estudos devido seu potencial de aplicação em embalagens, alta disponibilidade e por apresentarem características como compatibilidade com a matriz,

biodegradabilidade e grupos funcionais para diversas funcionalidades (HAAJ et al., 2016).

### 3.6. Técnicas para caracterização dos nanocompósitos

A distribuição do tamanho de partícula e o potencial Zeta são algumas técnicas fundamentais para avaliar a estabilidade de nanomateriais, podendo ser medidas por espectroscopia de correlação de fótons (BRAVO et al., 2016).

A determinação do potencial Zeta das nanopartículas é de fundamental importância, pois permite avaliar a estabilidade das dispersões coloidais ao longo do tempo. Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto (maior que 30mV) é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (SCHAFFAZICK et al., 2003). Geralmente as nanopartículas de amido obtidas por tratamento físico apresentam módulo de carga superficial baixo e por isso há uma forte tendência à agregação ao longo do tempo, tal comportamento mostra a instabilidade do armazenamento da dispersão coloidal. Esta agregação é uma característica das nanopartículas que pode ser explicada através do mecanismo de amadurecimento de Ostwald. Este processo consiste no crescimento do raio da gotícula e na diminuição do número total das gotículas dispersas (Figura 7), evidenciando a condição de um sistema termodinamicamente instável, característica de um processo não espontâneo (FORTUNA, 2010; FRANZOL; RESENDE, 2015).



**Figura 6** - Mecanismo de agregação de nanopartículas adaptado por Ostwald (FRANZOL; RESENDE, 2015).

A espessura é um importante parâmetro utilizado como referência na área de embalagens plásticas, que influencia diretamente nas propriedades mecânicas e de barreira (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Detalhes como quantidade de solução filmogênica dispersa em placa para secagem, bem como nível onde será armazenado para secagem são de fundamental controle, pois o preparo pelo método de *casting* torna a solução mais viscosa, dificultando o espalhamento e facilitando a formação de bolhas (SOUZA, 2010). A medida da espessura é realizada com uso de micrômetro digital com três medidas em posições aleatórias.

As propriedades mecânicas são primordiais nos estudos de filmes, estando diretamente relacionadas à natureza dos materiais presentes na solução filmogênica, bem como as interações entre as matrizes. Os filmes devem apresentar resistência à ruptura de forma a facilitar a manipulação e proteger o produto embalado. As propriedades de tração são úteis para identificação e caracterização de filmes flexíveis e expressam a resistência do material à deformação por alongamento quando submetido à tração. Dentre as propriedades de tração, pode-se avaliar a deformação, determinada como o alongamento relativo do corpo-de-prova em relação a seu comprimento original; resistência à tração na ruptura, expressa em MPa, determina a resistência oferecida pelo material no ponto de ruptura; e módulo de elasticidade, considerado um indicador da rigidez do filme, expresso em MPa (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

Os ensaios mecânicos podem ser realizados conforme metodologia proposta pela ASTM D882-00 (ASTM, 2001), onde corpos-de-prova são obtidos e condicionados em umidade pré-determinada, seguida de fixação entre as garras de tensão do equipamento. A posição inicial e a velocidade de separação das garras devem ser previamente determinadas em função do alongamento do filme.

As propriedades de barreiras definem a capacidade de uma embalagem de resistir à absorção ou à evaporação de gases e vapores, resistir à permeação de lípidos e à passagem de luz (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Dentre essas análises, a permeabilidade ao vapor d'água pode ser avaliada em filmes pelo método gravimétrico, com pesagens sucessivas em cápsulas hermeticamente fechadas e com controle de umidade, de forma que a passagem do vapor de água

aconteça exclusivamente pelo filme, de forma a avaliar mudanças de peso em função do tempo.

A análise termogravimétrica (TGA) determina a temperatura de decomposição de substâncias orgânicas e inorgânicas, podendo ser utilizadas na caracterização de polímeros, elucidando interações ocorridas nas formulações propostas e permite avaliar a cristalinidade do material (SANTANA, 2015). Por definição, a TG é uma técnica de análise térmica em que a variação de massa da amostra é determinada em função do tempo, sob um controle de temperatura (LE MOS, 2017). Soares et al (2005) afirmam que a análise de decomposição térmica de filmes de amido e goma xantana são importantes para conduzir estudos sobre as propriedades térmicas e estabilidade para a aplicação em indústrias alimentares e farmacêuticas, uma vez que os filmes podem ser submetidos a processos de calor durante a sua preparação, processamento ou consumo.

## REFERÊNCIAS

ABDORREZA, M. N.; ABD KARIM, A. Mechanical, barrier, physicochemical, and heat seal properties of starch films filled with nanoparticles. *Journal of Nano Research*, v. 25, p. 90-100, 2013.

ABRE - Associação brasileira de embalagem. Apresentação do setor. Disponível em: <<http://www.abre.org.br/setor/dados-de-mercado/>>. Acesso em: fevereiro de 2018.

American Society for Testing and Materials (ASTM). ASTM (Am. Soc. Test. Mater.) Data Ser. 2001.

ANGELLIER, H.; MOLINA, M. S.; DOLE, P.; DUFRESNE, A. Thermoplastic starch-waxy maize starch nanocrystals nanocomposites. *Biomacromolecules*, v. 7, p. 531–539, 2006.

ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L. A. Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 15, p. 99-109, 2012.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. Glycerol: a brief history and their application in stereoselective syntheses. *Química Nova*, v. 34, p. 306-319, 2011.

BRASIL. Resolução nº 259 de 20 de Setembro de 2002. Disponível em: <[https://lcqa.farmacia.ufg.br/up/912/o/resoluo\\_rdc\\_n\\_259\\_2002\\_-\\_rotulagem\\_em\\_geral.pdf](https://lcqa.farmacia.ufg.br/up/912/o/resoluo_rdc_n_259_2002_-_rotulagem_em_geral.pdf)>. Acesso em: fevereiro de 2018.

BRAVO, A. A. J.; SILVA, N. M. C.; FIALHO, R. L.; ALBUQUERQUE, E. C. M. Caracterização de nanopartículas de amido de mandioca e milho pela técnica de ultrassom. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química. 2016.

CHANG, P. R.; JIAN, R.; YU, J.; MA, X. Fabrication and characterisation of chitosan nanoparticles/plasticised-starch composites. *Food Chemistry*, v. 120, p. 736-740, 2010.

CONDÉS, M. C.; AÑÓN, M. C.; MAURI, A. N.; DUFRESNE, A. Amaranth protein films reinforced with maize starch nanocrystals. *Food Hydrocolloids*, v. 47, p. 146-157, 2015.

COSTA, S. S. *Filmes de fécula de mandioca e glicerol, reforçados com nanocelulose e ativados com própolis vermelha*. (2013), 126 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA.

COSTA, E. K. C. *Produção e caracterização de nanocristais de amido de mandioca e efeito da sua incorporação em filmes a base da mesma matriz polimérica*. (2016), 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA.

COSTA, E. K. C.; SOUZA, C. O.; SILVA, J. B. A.; DRUZIAN, J. I. Hydrolysis of part of cassava starch into nanocrystals leads to increased reinforcement of nanocomposite films. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 134, p. 45311, 2017.

COZZOLINO, S. M. F. *Biodisponibilidade de Nutrientes*. 4 ed. Barueri, SP: Manole, 2012.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Starch granules structure and its regards with physicochemical properties. *Ciência Rural*, v. 39, p. 945-954, 2009.

DOBRUCKA, R.; CIERPISZEWSKI, R. Active and intelligent packaging food – research and development – a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, v. 64, p. 7-15, 2014.

ELHARDALLOU, S. B.; KHALID, I. I.; GOBOURI, A. A.; ABDEL-HAFEZ, S. H. Amino acid composition of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) flour and its protein isolates. *Food and Nutrition Sciences*, v. 6, p. 790-797, 2015.

ESKIN, M.; SHAHIDI, F. *Bioquímica de Alimentos*. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ESTEVES, A. C. C.; BARROS-TIMMONS, A.; TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. *Química Nova*, v. 27, p. 798-806, 2004.

FONTANARI, G. G.; MARTINS, J. M.; KOBELNIK, M.; PASTRE, I. A.; ARÊAS, J. A. G.; BATISTUTI, J. P.; FERTONANI, F. L. Thermal studies on protein isolates of white lupin seeds (*Lupinus albus*). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 108, p. 141-148, 2012.

FORTUNA, I. *Dinâmica de crescimento de espumas molhadas*. (2010), 161 p. Dissertação (Mestrado em Física) – Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS.

FRANCO, C. M. L.; WONG, K.; YOO, S.; JANE, J. Structural and functional characteristics of selected soft Wheat starches. *Cereal Chemistry*, v.79, p.243-248,



2002.

FRANZOL, A.; REZENDE, M. C.; Emulsion stability: a case study involving anionic, cationic and nonionic emulsifiers. *Polímeros*, v. 25, p. 1-9, 2015.

FREIRE-FILHO, F. R. *Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios*. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011, 84 p.

FROTA, K. M. G.; SOARES, R. A. M.; ARÊAS, J. A. G. Chemical composition of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), BRS-Milênio cultivar. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 470-476, 2008.

GARCÍA, N. L.; RIBBA, L.; DUFRESNE, A.; ARANGUREN, M. I.; GOYANES, S. Physico-mechanical properties of biodegradable starch nanocomposites. *Macromolecular Materials and Engineering*, v. 294, p. 169-177, 2009.

GODBILLOT, L.; DOLE, P.; JOLY, C.; ROGE, B.; MATHLOUTHI, M. Analysis of water binding in starch plasticized films. *Food Chemistry*, v. 96, p. 380-386, 2006.

GONÇALVES, P. M.; NOREÑA, C. P. Z.; SILVEIRA, N. P.; BRANDELLI, A. Characterization of starch nanoparticles obtained from *Araucaria angustifolia* seeds by acid hydrolysis and ultrasound. *LWT – Food Science and Technology*, v. 58, p. 21-27, 2014.

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

GUERRERO, P.; GARRIDO, T.; LECETA, I.; CABA, K. Films based on proteins and polysaccharides: Preparation and physical-chemical characterization. *European Polymer Journal*, v. 49, p. 3713-3721, 2013.

HAAJ, S. B.; MAGNIN, A.; PÉTRIER, C.; BOUFI, S. Starch nanoparticles formation

via high power ultrasonication. *Carbohydrate Polymers*, v. 92, p. 1625-1632, 2013.

HAAJ, S. B.; THIELEMANS, W.; MAGNIN, A.; BOUFI, S. Starch nanocrystals and starch nanoparticles from waxy maize as nanoreinforcement: a comparative study. *Carbohydrate Polymers*, V. 143, p. 310-317, 2016.

HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S. Physical characteristics of cassava modified starch films. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 231-240, 2008.

HERRERA, M. P.; VASATHAN, T.; CHEN, L. Rheology of starch nanoparticles as influenced by particle size, concentration and temperature. *Food Hydrocolloids*, v. 66, p. 237-245, 2017.

ITO, E. N.; PESSAN, L. A.; HAGE JR, E.; COVAS, J. A. Análise do desenvolvimento morfológico da blenda polimérica PBT/ABS durante as etapas de mistura por extrusão e moldagem por injeção. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 14, p. 83-92, 2004.

JIMÉNEZ, A.; FABRA, M. J.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Edible and biodegradable starch films: a review. *Food Bioprocess Technology*, v. 5, p. 2058-2076, 2012.

JORGE, N. *Embalagens para alimentos*. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2013.

KIM, H.; PARK, D. J.; KIM, J.; LIM, S. Preparation of-crystalline starch nanoparticles using cold acid hydrolysis and ultrasonication. *Carbohydrate Polymers*, v. 98, p. 295-301, 2013.

KIM, H.; PARK, S. S.; LIM, S. Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 126, p. 607-620, 2015.

KUNTE, L. A.; GENNADIOS, A.; CUPPETT, S. L.; HANNA, M. A.; WELLER, C. L.

Cast Films from Soy Protein Isolates and Fractions. *Cereal Chemistry*, v. 74, p. 115-118, 1997.

LE CORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Starch nanoparticles. A review. *Biomacromolecules*, v. 11, p. 1139-1153, 2010.

LE CORRE, D.; ANGELLIER-COUSSY, H. Preparation and application of starch nanoparticles fo nanocomposites: A review. *Reactive & Functional Polymers*, v. 85, p. 97-120, 2014.

LEITE, L. F. C. Cultivo de feijão-caupi. Embrapa meio norte. Disponível em: <[https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistemaasdeproducaolf6\\_1ga1ceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-2&p\\_p\\_col\\_count=1&p\\_r\\_p\\_-76293187\\_sistemaProducaold=9109&p\\_r\\_p\\_-996514994\\_topicold=10505](https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemaasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaold=9109&p_r_p_-996514994_topicold=10505)>. Acesso em: fev. 2018.

LEMOS, P. V. F. *Importância da cristalinidade e do teor de amilose na estabilidade térmica de amidos de diferentes fontes botânicas*. (2017), 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA.

LI, X.; QIU, C.; JI, N.; SUN, C.; XIONG, L.; SUN, Q. Mechanical, barrier and morphological properties of starch nanocrystals-reinforced pea starch films. *Carbohydrate Polymers*, v. 121, p. 155-162, 2015.

LIN, N.; HUANG, J.; CHANG, P. R.; ANDERSON, D. P.; YU, J. Preparation, modification, and application of starch nanocrystals in nanomaterials: A review. *Journal of Nanomaterials*, v. 2011, p.1-13, 2011.

LOBO, A. R.; SILVA, G. M. L. Resistant starch and its physicochemical properties. *Revista Nutrição*, v. 16, p. 219-226, 2003.

LOPES JUNIOR, C. O.; AMORIM, A. C. P.; SOUZA, M. W. S. S.; SILVA, V. D. M.; SILVA, M. R.; SILVESTRE, M. P. C. Optimization of enzymatic protein extraction from beans. *Acta Scientiarum Technol*, v. 32, p. 319-325, 2010.

LOURENÇO, E. J. *Tópicos de proteínas de alimentos*. Jaboticabal: Funep, 2000. 344 p.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Effects of yam starch films on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 7055-7011, 2003.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Starch films: productions, properties and potential of utilization. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 31, p. 137-156, 2010.

MAPA. Ministério da Agricultura. *Perfil do feijão no Brasil*. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais>>. Acesso em: 21 ago. 2016.

MARINELLI, A. L.; MONTEIRO, M. R.; AMBRÓSIO, J. D.; BRANCIFORTI, M. C.; KOBAYASHI, M.; NOBRE, A. D. Development of polymeric composites with natural fibers: a contribution to the sustainability of Amazon. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 18, p. 92-99, 2008.

MAURI, A. N.; AÑÓN, M. C. Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 86, p. 1064-1072, 2006.

MOURA, W. S. *Extração e caracterização do amido do Hedychium coronarium e elaboração de filmes biodegradáveis*. (2008), 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) – Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis – GO.

- MULLER, C. M. O.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. *Carbohydrate Polymers*, v. 72, p. 82-87, 2008.
- NAGANO, T.; MOTOHIKO, H.; HIROYUKI, M.; KOHYAMA, K.; NISHINARI, K. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 40, p. 941-944, 2012.
- NEVES, V. A.; LOURENÇO, E. J.; SILVA, M. A. Extração, isolamento e fracionamento da proteína de tremço (*Lupinus albus*) var. Multolupa. *Alimentos e Nutrição*, v. 12, p. 115-130, 2001.
- NEVES, V. A.; PEREIRA, D. D.; SHOSHIMA, A. H. R.; TAVANO, O. L. Características da solubilidade proteica e isolamento da globulina principal de caupí cultivar BR 14-Mulato. *Alimentos e Nutrição*, v. 14, p. 47-55, 2003.
- PIYADA, K.; WARANYOU, S.; THAWIEN, W. Mechanical, thermal and structural properties of rice starch films reinforced with rice starch nanocrystals. *International Food Research Journal*, v. 20, p. 439-449, 2013.
- PEREIRA, C. A. S.; COSTA, N. M. B. Proteins of dehulled black beans: digestibility in conventional and germ-free animals. *Revista de Nutrição*, v. 15, p. 5-14, 2002.
- RHIM, J. W.; GENNADIOS, A.; HANDA, A.; WELLER, C. L.; HANNA, M. A. Solubility, tensile, and color properties of modified soy protein isolate films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 4937-4941, 2000.
- ROCHA, G. O.; FARIAS, M. G.; CARVALHO, C. W. P.; ASCHERI, J. L. R.; GALDEANO, M. C. Biodegradable composite films based on cassava starch and soy protein. *Polímeros*, v. 24, p. 587-595, 2014.

REIS, L. C. B.; BARCELLOS, A. D.; MACHADO, B. A. S.; DRUZIAN, J. I. Filme biodegradável incorporado com glicerol e aditivos naturais. *Cadernos de Prospecção*, v. 4, p. 23-32, 2011.

SADEGH-HASSANI, F.; NAFCHI, A. M. Preparation and characterization of bionanocomposite films based on potato starch/halloysite nanoclay. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 67, p. 458-462, 2014.

SANTANA, J. S. *Nanofibras de celulose de sisal como reforço para nanocompósito a base de fécula de mandioca*. (2015), 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA.

SANTANA, J. S.; ROSÁRIO, J. M.; POLA, C. C.; OTONI, C. G.; SOARES, N. F. F.; CAMILLOTO, G. P.; CRUZ, R. S. Cassava starch-based nanocomposites reinforced with cellulose nanofibers extracted from sisal. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 134, p. 44637, 2016.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R. M. V.; GARCIA, E. E. C. *Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades*. Campinas: CETEA/ITAL, 2002, 267 p.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. *Química Nova*, v. 26, p. 726-737, 2003.

SGARBIERI, V. C. *Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações*. São Paulo: Livraria Varela, 1996.

SHI, A.; WANG, L.; LI, D.; ADHIKARI, B. Characterization of starch films containing starch nanoparticles. Part 2: Viscoelasticity and creep properties. *Carbohydrate Polymers*, v. 96, p. 593-601, 2013.

SHIMAZU, A. A.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Plasticizing and antiplasticizing effects of glycerol and sorbitol on biodegradable cassava starch films. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 28, p. 79-88, 2007.

SILVA, M. A.; NEVES, V. A.; LOURENÇO, E. J. Frações protéicas e globulina principal de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) cv IAC-Marrocos. *Alimentos e Nutrição*, v. 12, p. 131-149, 2001.

SILVA, J. B. S.; PEREIRA, F. V.; DRUZIAN, J. I. Cassava starch-based films plasticized with sucrose and inverted sugar and reinforced with cellulose nanocrystals. *Journal of Food Science*, v. 77, p. 14-19, 2012.

SILVA, J. B. A. *Preparação e caracterização de filmes flexíveis de amido e de PBAT/amido termoplástico reforçados com nanowhiskers por casting e extrusão*. (2013), 200 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA.

SOARES, E. P.; NUNES, E. C. D.; MITIKO, S.; WIEBECK, H. Characterization of Polymers and Analysis of inorganic constituents in metallized plastic packages. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 12, p. 206-212, 2002.

SOARES, R. M. D.; LIMA, A. M. F.; OLIVEIRA, R. V. B.; PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. Thermal degradation of biodegradable edible films based on xanthan and starches from diferente sources. *Polymer Degradation and Stability*, V. 90, p. 449-454, 2005.

SOARES, R. M. D.; SCREMIN, F. F.; SOLDI, V. Thermal stability of biodegradable films based on soy protein and corn starch. *Macromolecular Symposia*, v. 229, p. 258-265, 2005.

SOBRAL, P. J. A. Thickness effects of myofibrillar protein based edible films on their functional properties. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, p. 1251-1259, 2000.

SOUZA, R. C. R.; ANDRADE, C, T. Gelatinização e extrusão de amido. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 10, p. 24-30, 2000.

SOUZA, C. O. *Preparação, caracterização e avaliação da eficácia de biofilmes a base de fécula de mandioca (Manihot esculenta Crantz) e incorporados com polpas de manga (Mangifera indica L) e de acerola (Malpighia emarginata L) como aditivos antioxidantes.* (2010), 143 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA.

SOUZA, C. O.; SILVA, L. T.; SILVA, J. R.; LÓPEZ, J. A.; VEIGA-SANTOS, P.; DRUZIAN, J. I. Mango and acerola pulps as antioxidant additives in cassava starch bio-based film. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 2248-2254, 2011.

SOUZA, L. B.; MOURA, A. A. C.; SILVA, J. B. A Embalagens para alimentos: tendências e inovações. *Higiene Alimentar*, v. 31, p. 25-29, 2017.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, v. 14, p. 71-78, 2003.

VEIGA-SANTOS, P.; OLIVEIRA, L. M.; CEREDA, M. P.; SCAMPARINI, A. R. P. Sucrose and inverted sugar as plasticizer. Effect on cassava starch-gelatin film mechanical properties, hidrophilicity and water activity. *Food Chemistry*, v. 103, p. 255-262, 2007.

ZHANG, Q.; YU, Z.; XIE, X.; NAITO, K.; KAGAWA, Y. Preparation and crystalline morphology of biodegradable starch/clay nanocomposites. *Polymer*, v. 48, p. 7193-7200, 2007.



## **CAPÍTULO II**

---

Mechanical and barrier properties of cowpea protein isolate films with/without nanoparticles of cassava starch-based.

#### **4. CAPÍTULO II – Mechanical and barrier properties of cowpea protein isolate films with/without nanoparticles of cassava starch-based**

Fabiane Cerqueira de Almeida<sup>a</sup>, Biane Oliveira Philadelpho<sup>a</sup>, Carolina Oliveira de Souza<sup>a</sup>, Jamille Santos Santana<sup>a</sup>, Paulo Romano Cruz Correia<sup>a</sup>, Geany Peruch Camilloto<sup>b</sup>, Ederlan de Souza Ferreira<sup>a</sup>, Janice Izabel Druzian<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Bromatological Analysis of the School of Pharmacy Federal University of Bahia, 40.170-115, Salvador, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Technology of the Feira de Santana State University, Novo Horizonte, 44.036-900, Feira de Santana, Salvador, Brazil.

**\*CORRESPONDING AUTHOR:**

Prof<sup>a</sup>. Janice Izabel Druzian  
Department of Bromatological Analysis  
Federal University of Bahia  
Barão de Jeremoabo street, 147  
40.170-115, Salvador, Brazil  
Email address: [druzian@ufba.br](mailto:druzian@ufba.br)  
Phone: ++55 71 3283-6932

**Abstract**

The effects of the incorporation of cowpea protein isolate and cassava starch nanoparticles obtained by ultrasound on the properties of cassava starch - based nanocomposites:glycerol were evaluated. The increase of the protein isolate concentration in the starch:glycerol films resulted in a progressive reduction of the water vapor permeability associated with a proportional increase of the tensile force. The incorporation of 3 wt.% (m/starch) of nanoparticles did not significantly ( $P > 0.05$ ) the linear increase of the tensile force and resulted in polynomial behavior of water vapor permeability and elongation, with minimum points at 0.76 and 1.11 % protein isolate, respectively. The protein isolate resulted in  $T_{\text{onset}}$  reduction of the films, with thermal stability between 250-350 °C depending on the composition. The nanocomposites of starch:glycerol:protein:nanoparticles presented homogeneity derived from the chemical similarity of the nanoparticles with the matrices, as well as the hydrophilic character of the protein isolate, resulting in mechanically resistant films.

**Keywords:** protein isolate; ultrasound; nanocomposite films; renewable polymers.

## 1. INTRODUCTION

Recently, the search for quality products and the concern with environmental pollution, mainly due to the disposal of synthetic polymers used as packaging, have generated great interest in the development of biodegradable films (Costa, Souza, Silva & Druzian, 2017). One of the most promising matrices in the production of films is starch, an abundant and highly available raw material, consisting of two polysaccharides, amylose and amylopectin, which are in the form of semi-crystalline granules (Veiga-Santos, Oliveira, Cereda, & Scamparini, 2001; Zhu, 2015).

Several commercial starch sources are, however, cassava starch has been widely studied (Moares, Scheibe, Sereno, & Laurindo, 2013; Santana et al., 2016; Silva, Pereira, & Druzian, 2012; Zhu, 2015), due to high yield and availability as well as low cost. For film application, the physicochemical and functional properties of amylose and its ability to form gels is very important. When the starch is gelatinized for the preparation of the films, the semicrystalline granular structure is destroyed, giving rise to a homogeneous and amorphous polymeric matrix (Ratnayake, Otani, & Jackson, 2009). However, starch films have limitations due to low mechanical properties and high permeability to water vapor (Veiga-Santos, Oliveira, Cereda, & Scamparini, 2001).

In order to improve these limitations, several studies have tested the use of other matrices that contribute to increase the mechanical and barrier properties of starch films, such as proteins (Condés, Añón, Mauri, & Dufresne, 2015; García, Ribba, Dufresne, Aranguren, & Goyanes, 2011; González, & Igarzabal, 2015; Guerrero, Garrido, Leceta, & Caba, 2013; Husseinsyah, Yeng, Kassim, Zakaria, & Ismail, 2014; Kunte, Gennadios, Cuppett, Hanna, & Weller, 1997; Mauri, & Añón, 2006; Mauri, & Añón, 2007; Rocha, Farias, Carvalho, Ascheri, & Galdeno, 2014; Soares, Scremin, & Soldi, 2005), as well as plasticizers (García, Ribba, Dufresne, Aranguren, & Goyanes, 2011) and nanoparticles (Nasserri, & Mohammadi, 2014; Shi, Wang, Li, & Adhikari, 2013; Zheng, Ai, Chang, Huang, & Dufresne, 2009).

The proteins form intermolecular bonds with the starch chains, resulting in the structural maintenance of the films, being also from renewable sources and easy

to extract. Studies have highlighted the application of legume proteins to starch-based films, especially those extracted from soybean (Guerrero, Garrido, Leceta, & Caba, 2013; Husseinsyah, Yeng, Kassim, Zakaria, & Ismail, 2014; Mauri, & Añón, 2006; Mauri, & Añón, 2007; Rocha, Farias, Carvalho, Ascheri, & Galdeno, 2014; Soares, Scremin, & Soldi, 2005). Among the most commonly used additives, the glycerol plasticizer stands out, due to its low volatility and chemical nature similar to starch, facilitating the interaction with the starch chains, guaranteeing good flexibility to the films. However, the incorporation of glycerol results in increased permeability to water vapor from starch films due to its hydrophilic character (García, Ribba, Dufresne, Aranguren, & Goyanes, 2011). This factor can be limited by using protein and starch as matrices.

There are several legumes of socioeconomic importance in the world. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) is a *Dicotyledonea* plant, of the family *Fabaceae*, genus *Vigna* and species *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Interest in the production and consumption of this legume is associated with an excellent protein source, ranging from 18 % to 35 % (Elhardallou, Khalid, Gobouri, & Abdel-Hafez, 2015; Frota, Soares, & Arêas, 2008; Neves, Pereira, Shoshima, & Tavano, 2003), however the protein extracted from this source has not yet been tested as a matrix in the development of biodegradable films.

The interactions between proteins and polysaccharides also improve functional characteristics of proteins, depending on factors such as pH, ionic strength, temperature and concentration, and these factors are taken into account when preparing films. In general, polysaccharide and protein films have better mechanical properties than single matrix films, but the permeability to water vapor is still high because of the ease of films in absorbing moisture (Davanço, Tanada-Palmu, & Gosso, 2007). This feature can be improved by using nanoparticles from different sources (Gonçalves, Noreña, Silveira, & Brandelli, 2014; Haaj, Magnin, Pétrier, & Boufi, 2013; Herrera, Vasathan, & Chen, 2017; Kim, Park, & Lim, 2015; Le Corre, Bras, & Dufresne, 2010; Santana et al., 2016; Sun, Fan, & Xiong, 2014), thus ensuring the complete maintenance of biodegradability (Assis, Zavareze, Prentice-Hernández, & Souza-Soares, 2012; Condés, Añón, Mauri, & Dufresne, 2015; González, & Igarzabal, 2015; Haaj, Thielemans, Magnin, & Boufi, 2016; Le Corre, &

Angellier-Coussy, 2014; Lin, Huang, Chang, Anderson, & Yu, 2011; Sadegh-Hassani, & Nafchi, 2014, Shi, Wang, Li, & Adhikari, 2013). The size of these nanoparticles (1 to 100 nm) (Roco, 2003) and the proportionally larger surface area with more atoms on their surface favors improvements in the properties of the nanocomposite films, due to the greater interaction with the polymer matrix and the plasticizer (Bocconi, Rondinone, Petyx, & Iavicoli, 2008; Kahn, 2006). Studies show that the hydrolysis of part of the cassava starch to the nanoparticles results in increased reinforcement of nanocomposite films of the same polymer matrix (Costa, Souza, Silva, & Druzian, 2017) promoting good miscibility and strong interfacial adhesion between the components, since both have similar chemical structure (Costa, Souza, Silva, & Druzian, 2017; Lin, Huang, Chang, Anderson, & Yu, 2011).

Nanoparticles can be produced by chemical, physical or enzymatic methods and are classified according to the top down production medium produced from larger particles or bottom up by means of links between atoms or molecules (Kim, Park, & Lim, 2015). The method (more than 5 days) for production with yields of less than 20 % (Kim, Park, Kim, & Lim, 2013; Kim, Park, & Lim, 2015). Physical treatments have been reported in the literature (Gonçalves, Noreña, Silveira, & Brandelli, 2014; Haaj, Magnin, Pétrier, & Boufi, 2013; Kim, Park, & Lim, 2015; Sun, Fan, & Xiong, 2014), with emphasis on ultrasound, one a quicker method, which is easy to implement, without the use of chemical solvents and consequently is environmentally sustainable, and mainly results in high yields (Haaj, Magnin, Pétrier, & Boufi, 2013; Kim, Park, & Lim, 2015).

Thus, the present study aimed to evaluate the electrical stability of nanoparticles of starch produced by ultrasound and stored under different conditions, and to analyze the effects of the incorporation of these nanostructures and the protein isolate of cowpea on the barrier properties, mechanical and nanocomposite films of the same amylaceous matrix.

## **2. EXPERIMENTAL**

### **2.1. Materials**

The cowpea (*Vigna unguiculata*, L. Walp) seeds were kindly provided by Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA, Bahia, Brazil). Cassava

starch was obtained from local market (Yoki<sup>®</sup> Alimentos, São Paulo, Brazil) and the glycerol from Labsynth<sup>®</sup> company (Salvador, Bahia, Brazil). All reagents were purchased from Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (St. Louis, Missouri, EUA), unless otherwise specified.

## **2.2. Preparation of cowpea flour and extraction of protein isolate**

Seeds of cowpea were selected and immersed in distilled water (8 °C, 12 h). The cotyledon was separated from the epicarp manually, dehydrated in a greenhouse (New Ethics, model 404/D, Brazil) with air circulation (50 °C, 10 h), pulverized and sieved (60 mesh) to obtain the cowpea flour.

Samples of the bean meal were used to determine the protein solubility curve as a function of pH (2-12). Briefly, the material was homogenized in distilled water (1:30), adjusted pH (2-12), kept under constant stirring for 30 min, and then centrifuged (6000 rpm, 30 min, 25 °C) (Hitachi Centrifuge, CR22GIII, Japan). The supernatant obtained was used for quantification of the protein, performed by the method of Lowry et al (Lowry, Rosenrough, Farr, & Randall, 1951).

Protein fraction extractibility assays were performed using cowpea flour. The extractive solution (H<sub>2</sub>O, NaCl 0.1 and 0.5 mol/L, and NaOH 0.1 mol/L), flour mass ratio/solvent volume (1:10; 1:15; 1:20, 1:30 and 1:50 m/v), extraction time (5, 15, 30, 60 and 120 min) and the solvent with the best protein extraction was evaluated at different concentrations (0.01; 0.05; 0.10; 0.25; 0.50 and 1.0 mol/L) (Davanço, Tanada-Palmu, & Gosso, 2007). The amount of protein extracted was determined by the method of Kjeldahl (AOAC, 1995).

The protein extracts of cowpea obtained under different conditions (solvent, mass/volume, stirring time and pH) were diluted with distilled water (1:1), then pH adjusted to 4.0, shaken (15 min.), and centrifuged (12.000 rpm, 20 min, 8 °C). They were then lyophilized and the amount of protein in the isolates was determined by the Kjeldahl method (AOAC, 1995).

## **2.3. Production of cassava starch nanoparticles by ultrasound**

The cassava starch nanoparticles were prepared by ultrasonic methodology using a sonicator (Qsonica model Q55) with a frequency of 20 KHz,

power of 50 W, according to the methodology adapted from Haaj et al (Haaj, Magnin, Pétrier, & Boufi, 2013). The starch suspension (0.87 g of cassava starch in 50 ml of distilled water) was sonicated at 80 % power for 75 minutes, and thereafter the colloidal suspension was cooled. The determination of the yield of starch nanoparticles was performed by the method of Condés et al (Condés, Añón, Mauri, & Dufresne, 2015), with adaptations. Aliquots of the starch nanoparticle suspension (10 mL) were transferred to Petri dish and, after air drying (105 °C, 24 h), the percent yield was calculated gravimetrically, according to Equation 1. This analysis was performed in triplicate.

$$Yield (\%) = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad \text{Equation 1}$$

At where:

P<sub>i</sub> is the sample weight before drying;

P<sub>f</sub> is the sample weight after drying.

#### **2.4. Distribution of Zeta size and potential of starch nanoparticles during storage**

The average size of the nanoparticles were analyzed using the dynamic light scattering technique using the Zetasizer Nano Series instrument (Malvern Instruments, UK) at a wavelength of 633 nm and 90° spreading angle. The Zeta potential of the nanoparticles was measured by electrostatic repulsion of the particles using the Zetasizer Nano Series instrument (Malvern Instruments, UK) at 25 °C (Haaj, Magnin, Pétrier, & Boufi, 2013). For the two analyzes, aliquots (~1 mL) of nanoparticle aqueous suspension were evaluated in different storage conditions (E) after preparation, aiming to identify the best condition for application in nanocomposite films, and to guarantee the highest percentage of nanostructures. The storage conditions of the manioc starch nanoparticles E1 to E6 were tested:

- E1 - suspension not freeze-dried and analyzed immediately after production;
- E2 - non-lyophilized suspension and analyzed after 24 hours under refrigeration;
- E3 - suspension not lyophilized and analyzed after 120 hours under refrigeration;
- E4 - non-lyophilized suspension, stored at -80 ° C for 7 days, and analyzed after rapid thawing;



E5 - lyophilized suspension after preparation and resuspended under manual stirring in distilled water until complete dilution;

E6 - lyophilized suspension after preparation and mechanically resuspending overnight in distilled water.

The nanoparticles submitted to these storage conditions that resulted in a smaller size were incorporated into the cassava starch nanocomposite films: glycerol: bean protein.

## **2.5. Preparation of nanocomposite films**

The films were prepared using the casting technique, according to the methodology described by Souza et al. (Souza et al., 2011) with adaptations. Preliminary tests were conducted to evaluate the maximum concentrations of starch, protein isolate, nanoparticle and glycerol that could be incorporated into the films in order to obtain homogenous materials, flexible and easy to handle.

To obtain the film-forming solution, the cassava starch (4 wt.g, m/v) and glycerol (1 wt.g, m/v) were solubilized in distilled water. Then, the nanoparticle suspension was stored in the condition resulting in a smaller size (3 wt.g, m/starch), and the protein isolate (0.5; 1.0 and 1.5 wt.g, m/v) were added or not depending on each formulation (Table 1), and the pH adjusted to 11.5 with NaOH (1 mol/L). Subsequently, the solutions were heated to gelatinization of starch (~ 70 °C) under manual stirring, followed by cooling for 2 h at room temperature (25 °C), poured (~35 g) into polystyrene plates (150 x 15 cm) and oven-conditioned (DeLeo A 3SEAFS) with air circulation (32 °C, 20 h). Finally, the plates were conditioned in a saturated solution of NaNO<sub>3</sub> (74% RH, 25 °C) for 2 h and stored under refrigeration until the subsequent analysis.

**Table 1** - Experimental planning for the preparation of nanocomposite films based on starch with different concentrations of protein isolate and nanoparticles.

Formulations	Starch (%, m/v)	Glycerol (%, m/v)	Protein isolate (%, m/v)	Nanoparticles (%, m/m <sub>starch</sub> )
F1 (C)	4.0	1.0	0.0	0.0
F2	4.0	1.0	0.5	0.0
F3	4.0	1.0	1.0	0.0
F4	4.0	1.0	1.5	0.0
F5	4.0	1.0	0.0	3.0
F6	4.0	1.0	0.5	3.0
F7	4.0	1.0	1.0	3.0
F8	4.0	1.0	1.5	3.0

*Characterization of control films and SPI/nanocomposite films*

## 2.6. Characterization of nanocomposite films

### 2.6.1. Moisture, water activity (Aw) and water solubility

The determination of relative humidity was performed in triplicate by the drying method using the infrared Moisture Analyzer (MX-50, A & D Company, USA) by adjusting the intensity of the radiation emitted so that the sample reached a temperature of 105 W.

The water activity measurements of the nanocomposites were performed with a decagon, AQUALAB LITE. As standard for the calibration of the equipment, pure water ( $A_w 1.000 \pm 0.001$  %) was used. Samples were evaluated in triplicate.

For the determination of the solubility of the formulations in water samples were cut in the form of disc (2 x 2 cm). The samples were immersed in distilled water at ambient conditions for 24 h, then dried at 105 °C for 24 h. The percentage of solubility was determined gravitationally in relation to the mass of the samples before (dry) and after submersion (wet), according to Equation 2.

$$\text{Solubility (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad \text{Equation 2}$$

At wher:

m1 is the dry mass of the samples before submersion in distilled water;

m2 is the dry mass of the samples after submersion in distilled water.

### 2.6.2. Permeability to water vapor of films (PVA)

PVA determination was performed using the gravimetric method according to ASTM 96-00 (ASTM, 2001), with modifications (Condés, Añón, Mauri, & Dufresne, 2015; González, & Igarzabal, 2015; Kunte, Gennadios, Cuppett, Hanna, & Weller, 1997). Samples of circular films (0.00159 m<sup>2</sup>) were placed in permeation capsules containing silica (~15 g, 0 % RH). The capsules were stored in desiccators containing saturated sodium chloride solution (75 % RH, 25 °C). After one hour under these conditions, the weight gain was measured with weighings every 30 minutes for 8 hours. The tests were performed in triplicate and the weight variations were plotted as a function of time. The water vapor permeability rate (TPVA) was determined according to Equation 3 and the PVA was then calculated by Equation 4.

$$TPVA = g / T.A \quad \text{Equation 3}$$

$$PVA = TPVA.e / ps(U_1 - U_2) \quad \text{Equation 4}$$

At where:

$g$  is the mass gain;

$t$  it's the time (h);

$A$  is the area of permeation;

$e$  is the mean thickness of the test piece (mm);

$ps$  is the saturation pressure of the vapor at the test temperature (KPa);

$U_1$  is the relative humidity inside the chamber (%);

$U_2$  is the relative humidity inside the capsule (%).

### 2.6.3. Thickness and mechanical tensile properties of films

The thickness of the films was performed according to a methodology adapted by Santana et al (Santana et al., 2016) using a Mitutoyo digital micrometer (0.001 mm), after conditioning the samples in saturated NaBr solution (57.5 % RH) for 48 h at room temperature. In each film sample, 3 random readings were performed, totaling 9 measurements for each formulation and the average obtained from the readings.

The mechanical tensile tests of the nanocomposites were performed in a Universal Testing Equipment (EMIC, model DL2000/700, Brazil), with a load cell of

20 KN, following the ASTM D 882-0 (ASTM, 2001), standard with adaptations. 10 specimens of each formulation were cut to 50 x 25 mm (length x width) and preconditioned (57.5 % RH, 23 °C, 24h). Then, the specimens were mounted between the claws at a distance of 50 mm and the test velocity was 50 mm/min. The following properties were evaluated: modulus of elasticity (MPa), maximum stress (MPa) and elongation (%) (Fontanari et al., 2012).

#### **2.6.4. Thermogravimetric analysis (TGA)**

The thermogravimetric analysis was performed to evaluate the thermal events of loss of starch mass, protein isolate, cassava starch nanoparticles and nanocomposite films obtained, according to the methodology adapted by Costa et al (Costa, Souza, Silva, & Druzian, 2017). For this, a thermal analyzer (Perkin Elmer, Pyris 1 TGA, Shelton, Connecticut, USA) was used, with an inert nitrogen atmosphere, at a flow rate of 30 mL/min and a heating rate of 10 °C/min. Samples were heated to a temperature range of 25 to 900 °C.

#### **2.7. Statistical analysis**

The statistical data was analyzed using Statistical Analysis System software (SAS, 9.1, USA). All data were presented at the mean values  $\pm$  standard deviation of at least three independent analyzes. Differences were considered at a significant level of 95 % ( $P < 0.05$ ). The effects of protein isolate and nanoparticles starch-based concentration were performed to regression model ( $R^2$ ), where the degrees of freedom of the factors were implanted in their linear and quadratic components to choose the regression model that best describes the observations.

### **3. RESULTS AND DISCUSSION**

#### **3.1. Selection of variables for protein isolate extraction**

The cowpea flour presented  $24 \pm 1.06$  % of total proteins (240 g/Kg), values close to the data reported in the literature (18-35 %) for the same species (Elhardallou, Khalid, Gobouri, & Abdel-Hafez, 2015; Frota, Soares, & Arêas, 2008; Neves, Pereira, Shoshima, & Tavano, 2003).

The effects of the different extractive solutions tested for the isolation of the protein fraction of bean flour, as well as the ratio of flour mass and solution volume, extraction time, and extractive solution concentration are related in the four steps in Table 2.

**Table 2** - Effect of different parameters on the protein extraction of cowpea.

Extraction parameters	Variables	Extracted protein* (% ± DP)
Stage 1 Extraction solution (mol/L)	H <sub>2</sub> O ultrapure	73.53 ± 0.56 <sup>b</sup>
	NaCl 0.1	58.93 ± 0.75 <sup>c</sup>
	NaCl 0.5	71.27 ± 2.63 <sup>b</sup>
	NaOH 0.1	85.07 ± 0.19 <sup>a</sup>
Stage 2 Flour mass ratio (g)/volum (mL) de NaOH 0.1 mol/L	1/10	71.67 ± 2.07 <sup>d</sup>
	1/15	74.79 ± 0.47 <sup>c</sup>
	1/20	79.45 ± 0.47 <sup>b</sup>
	1/30	87.76 ± 0.00 <sup>a</sup>
	1/50	88.38 ± 0.67 <sup>a</sup>
Stage 3 Extraction time (min) de NaOH 0.1 mol/L. 1/30 m/v	15	84.57 ± 0.75 <sup>a</sup>
	30	84.97 ± 1.69 <sup>a</sup>
	45	87.76 ± 1.88 <sup>a</sup>
	60	86.29 ± 0.56 <sup>a</sup>
	120	86.96 ± 0.75 <sup>a</sup>
Stage 4 Concentration (mol/L) of the solution NaOH 0.1 mol/L, 1:30 m/v, 30 minutes	0.01	77.99 ± 0.30 <sup>b</sup>
	0.05	82.22 ± 0.76 <sup>a</sup>
	0.10	81.78 ± 0.53 <sup>a</sup>
	0.50	74.30 ± 0.76 <sup>c</sup>
	1.00	74.30 ± 0.76 <sup>c</sup>

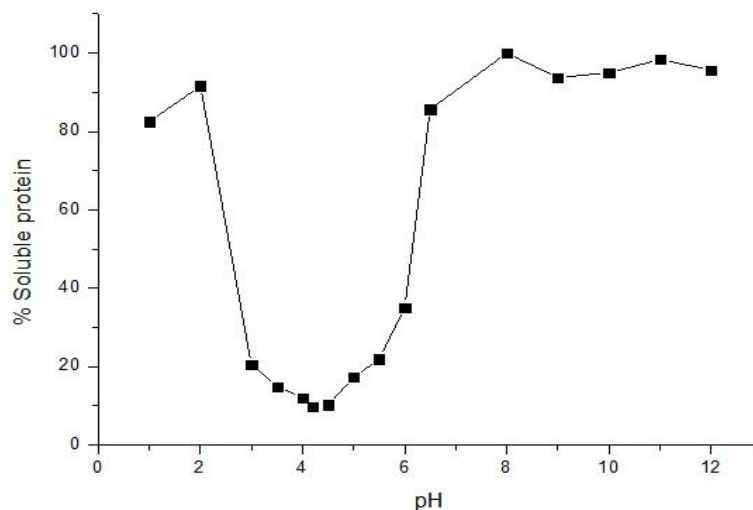
Results presented as mean ± standard deviation.

\* Averages followed by the same letter do not differ statistically from each other by the ANOVA test; ( $P > 0.05$ ).

The 0.1 mol/L NaOH solution was more effective, resulting in an extraction of 85.07 % ( $P < 0.05$ ) of the total protein. The proportion of flour and solvent volume showed that the ratio 1:30 was more efficient for the extraction of soluble proteins (87.76 %) ( $P < 0.05$ ), and the time of 30 minutes (84.97 %) of extraction is considered satisfactory, with no significant increase ( $P > 0.05$ ) in higher times. In general, the concentration of the NaOH solution used in the 1:30 m/v condition for 30 minutes exerts a significant influence ( $P < 0.05$ ) on protein extraction, with 0.05 mol/L showing a higher percentage of soluble protein, reaching 82.22 % of the total soluble protein, these parameters being used in the production of films (Table 2). Similar values were described by Neves et al (Neves, Pereira, Shoshima, & Tavano, 2003)

and by Neves, Lourenço and Silva (Neves, Lourenço, & Silva, 2001), who defined the same proportions of flour mass:extractive solution volume and extraction time to obtain protein isolate from different legume species. The effect of different salts on the extraction also showed a dependence of the type of salt, of the concentration, besides the pH of the solution (Neves, Pereira, Shoshima, & Tavano, 2003).

The protein isolate obtained in this condition had different solubilities as a function of pH, showing that these parameters affect the nature and the distribution of protein charges. In the solubility curve of the protein fraction extracted from the cowpea flour (Figure 1), it is identified that between pHs 3.5 and 4.5, the proteins that make up the cowpea flour have a maximum solubility reduction, with a value minimum in pH 4.



**Figure 1** - Effect of pH (1-12) on the solubility of the protein fraction extracted from cowpea (distilled water solution, 1:30 m/v, for 30 minutes).

A similar effect was observed in other legume species, considering the region of the average isoelectric point among the proteins of several legume species (Elhardallou, Khalid, Gobouri, & Abdel-Hafez, 2015; Neves, Lourenço, & Silva, 2001; Neves, Pereira, Shoshima, & Tavano, 2003).

On the other hand, an increase in protein solubility was observed when the pH of the medium was found in the acidic (1-3) or alkaline (8-12) ends. In this context, it is possible to identify the possibility of the application of these proteins in the formation of films at a pH far from the isoelectric point, because in this, coagulation does not allow the formation of a homogeneous matrix (Mauri, & Añón,

2006). Fontanari et al (Fontanari et al., 2012) when analyzing the influence of pH on solubility (*Lupinus albus*) and Neves et al (Neves, Pereira, Shoshima, & Tavano, 2003) with cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) proteins assert that solubility is also higher at pH extremes and in the presence of salt, since solubility of proteins is the result, among other factors, of polar interaction with the solvent, ionic interactions with salt and electrostatic repulsion forces.

The protein isolate obtained in the best tested condition presented 72.75 % protein, a result close to that found by Elhardallou et al. (Elhardallou, Khalid, Gobouri, & Abdel-Hafez, 2015) (75.00 %) who studied the nutritive value of cowpea seeds. They described that the high concentration of protein in cowpea protein isolate is due to the reduction of ionic strength, resulting in increased repulsive forces and destabilization of the protein. In this sense, it was verified that there was a change from 24 % to 72.75 % in the protein content when passing from the cowpea flour to the protein isolate extracted under the conditions evaluated, that is, a concentration approximately 3 times higher, evidencing thus, the efficiency of the process employed.

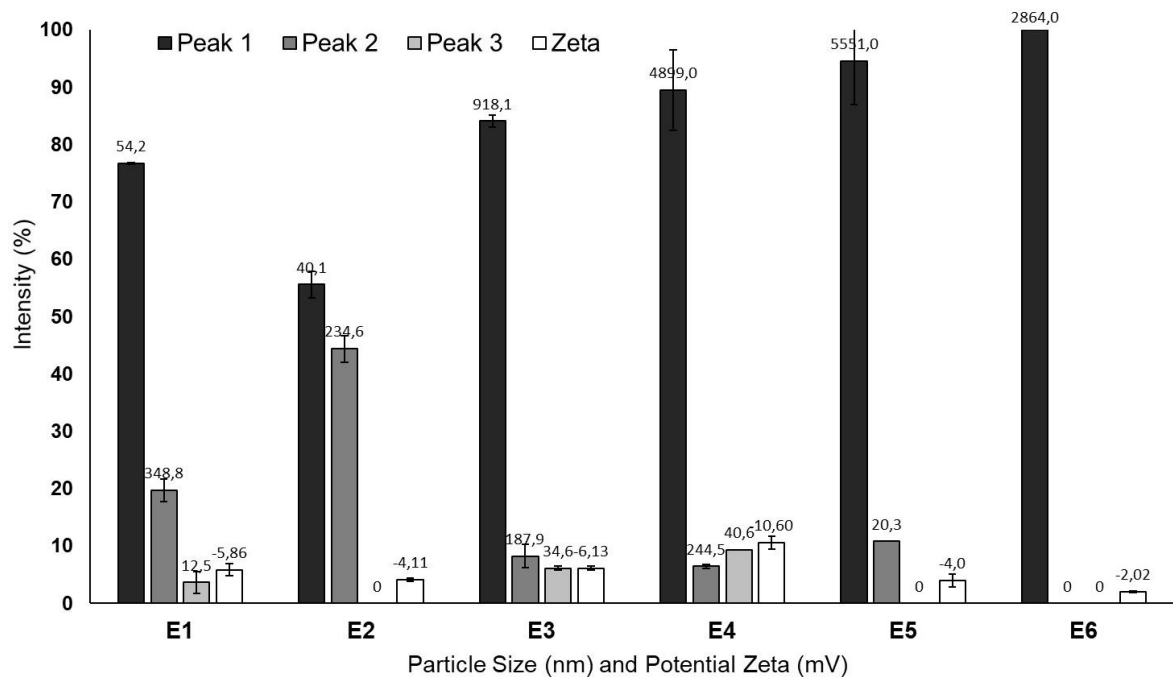
The water solubility of films is influenced by the pH of the filmogenic solution, depending on the proximity to the isoelectric point of the protein. Bourtoom et al. (Bourtoom, Chinnan, Jantawat, & Sanguandeeikul, 2006) investigated the effect of this parameter on the mechanical and barrier properties of edible films of fish proteins and observed that the films presented higher solubility at pH higher than 10, providing higher tensile strength and lower permeability to water vapor.

The pH of the film-forming solution also affects the nature and the distribution of the loads of the present protein, therefore, this parameter becomes important in the preparation of the films, in order to guarantee better properties. Mauri and Añón (Mauri, & Añón, 2007) report that soy protein films obtained at pH 11 have the best properties, such as higher tensile strength and lower water vapor permeability.

In this context, the filmogenic solutions of cassava starch: glycerol with different concentrations of the protein isolate of cowpea, and containing or not cassava starch nanoparticles were prepared at pH 11 (Figure 1).

### 3.2. Yield, storage, size and zeta potential of starch nanoparticles

The nanoparticles presented a yield of  $97.85 \pm 0.01$  % containing average size of 54.22 nm (76.8 %, Figure 2). Because of the lack of purification and use of chemical additives, nanoparticles obtained by sonication have a high yield ( $\sim 100$  %) and require time to obtain, when compared to chemical methods, for example (Haaj, Magnin, Pétrier, & Boufi, 2013; Kim, Park, & Lim, 2015).



**Figure 2** - Distribution of particle sizes (12.5 to 5551.0 nm) and Zeta potential of cassava starch obtained by ultrasound associated with percentage of intensity, according to the storage process (E). E1 - suspension not freeze-dried and analyzed immediately after obtaining by ultrasound; E2 - non-lyophilized suspension and analyzed after 24 hours under refrigeration; E3 - suspension not lyophilized and analyzed after 120 hours under refrigeration; E4 - non-lyophilized suspension, stored at  $-80$  °C for 7 days, and analyzed after rapid thawing; E5 - lyophilized suspension after preparation and resuspended under manual stirring in distilled water; and E6 - lyophilized suspension after preparation and mechanically resuspend overnight in distilled water.

The storage conditions of the colloidal suspension exert great influence on the size of the starch nanoparticles obtained by ultrasound (Figure 2). The material obtained shortly after the ultrasonic processing (E1) presents a larger percentage of sizes in the range considered for nanoparticles (3.1 % with 12.5 nm, 76.8 % with 54.2 nm, and 20.1 % with 348, 8 nm).



The dispersions of the nanoparticles maintained under refrigeration presented a destabilization with consequent increase of size due to the process of regimentation. After 24 h under refrigeration (condition E2), 57.5 % of the particles exhibited an average size of 40.1 nm and 42.5 % presented 234.6 nm. After 120 h of storage (E3) under the same conditions, the aggregation resulted in the formation of starch particles with 6.2 % of 34.6 nm, 9.7 % of 187.9 nm, and 84.1 % of 918, 1 nm (condition E3). When the dispersions were kept frozen for 7 days (E4), the particles were further added, forming particles of approximately 5  $\mu\text{m}$ . If immediately after the preparation by ultrasound the material is lyophilized and subsequently resuspended in water (E5 and E6) particles of sizes above 1000 nm are obtained, not being characterized as nanoparticles.

Reaggregation of the nanoparticles can be explained by the process known as maturing of Ostwald, characterized by the tendency of flocculation of smaller particles to form particles having dimensions exceeding the nanometric limits. Nanoparticles are kinetically stable in the lower energy state, that is, they tend to unite spontaneously (Bastús, Comenge, & Puentes, 2011).

It can also be observed that the nanoparticles of starch produced by ultrasound are not electrically stable for a long period, since there is no chemical modification on the surface of these structures. The results of the Zeta potential (Figure 2) presented values below -12 mV for materials subjected to all storage conditions, indicating surfaces with negative charges. In the E1 condition, the nanoparticles have a Zeta potential of -5.86 mV, and can not be characterized as electrically stable, and therefore amenable to reaggregation. In the other storage conditions, the Zeta potential changed (E2 = -4.11, E3 = -6.13, E4 = -10.60, E5 = -4.00, E6 = -2.02). A similar result is reported by Haaj et al. (Haaj, Magnin, Pétrier, & Boufi, 2013) for maize starch nanoparticles obtained also by the ultrasonic method, with values of -3 mV, where the occurrence of charges on the surfaces of the nanoparticles is explained by the absence of chemical additive during the treatment of sonication, producing negatively charged chemical functionalities.

Solutions with zeta potential values greater than +30 and less than -30 are considered to be electrically stable, as repulsion forces exceed attraction forces, so there is a strong tendency for particles to be well dispersed in solution (Santana et al,

2018). Thus, the nanoparticles obtained in the present work can be characterized as electrically unstable, regardless of the storage condition.

The starch nanoparticles were incorporated into the starch: glycerol: bean protein isolate, shortly after ultrasonic processing, ie without prior storage and not lyophilized (condition E1, Table 2, 76.8 % with 54.22 nm) to obtain nanocomposites with greater dispersion and interaction between the components, and the production of more homogeneous films.

### 3.3. Moisture, water activity and water solubility of films

There was no significant difference ( $P > 0.05$ ) for the moisture and water activity of the films ranging from 13.74 to 15.06 % and from 0.537 to 0.593, respectively (Table 3). Thus, these parameters were not affected by the concentration of the protein isolate, or by the presence of starch nanoparticles.

**Table 3** - Physicochemical properties of control films (F1) and cassava starch nanocomposites:glycerol with variable concentrations of protein isolate, containing or not 3.0 % of starch nanoparticles.

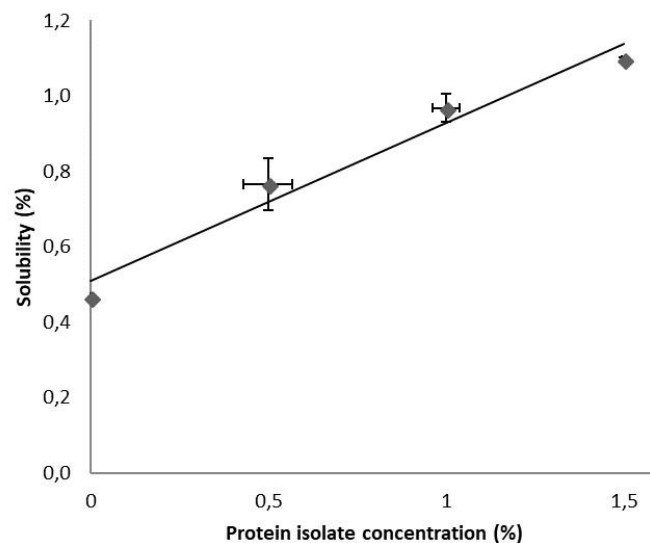
Formulations (Cassava starch:glycerol:protein isolate:starch nanoparticles) (%)	Moisture (% $\pm$ SD)	Water activity ( $A_w$ $\pm$ SD)	Solubility (% $\pm$ SD)
F1 (4 : 1 : 0.0 : 0)	15.06 $\pm$ 0.79 <sup>a</sup>	0.580 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.46 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>
F2 (4 : 1 : 0.5 : 0)	14.77 $\pm$ 1.37 <sup>a</sup>	0.586 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.81 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>
F3 (4 : 1 : 1.0 : 0)	15.06 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>	0.580 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.94 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
F4 (4 : 1 : 1.5 : 0)	14.74 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>	0.589 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	1.10 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>
F5 (4 : 1 : 0.0 : 3)	14.01 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>	0.584 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.46 $\pm$ 0.08 <sup>d</sup>
F6 (4 : 1 : 0.5 : 3)	14.52 $\pm$ 1.30 <sup>a</sup>	0.585 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.71 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>
F7 (4 : 1 : 1.0 : 3)	13.74 $\pm$ 1.45 <sup>a</sup>	0.537 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.99 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>
F8 (4 : 1 : 1.5 : 3)	14.11 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	0.593 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	1.09 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>

Means followed by the same letter in the same column do not differ statistically from each other by the Tukey test at 5 % probability; SD: Standard deviation.

Water activity is an important parameter to be considered by the food industry, since the contact of the packaging with the food can favor the development of microorganisms and / or undesirable changes by chemical reactions, reducing the useful life of the products. In general, values of water activity less than 0.6 prevent the development of microorganisms and most of the undesirable chemical reactions (Veiga-Santos, Oliveira, Cereda, Alves, & Scamparini, 2005).

The addition of starch nanoparticles did not significantly interfere ( $P > 0.05$ ) on the solubility of the films. However, the solubility of the films increased linearly as a function of protein isolate concentration ( $y = 0.4184x + 0.5097$ ,  $R^2 = 0.96$ ), (Figure 3).

The maximum concentration of protein isolate resulted in a 250 % increase in solubility when compared to the control film (without addition of protein isolate). This behavior can be attributed to the reduction of the cross-linking efficiency between the peptide chains (Condés, Añón, Mauri, & Dufresne, 2015). The protein, when added to the amylose matrix, is installed between the amylose and amylopectin chains leading to the reduction of interactions, thus increasing the free volume and allowing greater diffusion of water. The increase of the free hydrophilic groups in the final mass of the films may also be responsible for the increased solubility (Rocha, Farias, Carvalho, Ascheri, & Galdeno, 2014).



**Figure 3** - Behavior of water solubility of cassava starch nanocomposite films:glycerol without addition of nanoparticle and containing 3.0 % (m/v) of cassava starch nanoparticle, as a function of the concentration of the bean protein isolate.

The solubility of films is a parameter of great relevance in the application of these materials as food packaging. Generally films with high solubility are interesting for dehydrated products and need to be hydrated prior to consumption (Miller, Yamashita, & Laurindo, 2008).

The films prepared by the casting technique by Condés et al. (Condés, Añón, Mauri, & Dufresne, 2015), based on amaranth and glycerol protein (5 % and 1.25 % m/v, respectively) presented high solubility in water (78.6 %), however, when incorporating different concentrations of nanocrystals of corn starch obtained by acid hydrolysis, the films did not present significant differences ( $P > 0.05$ ), except when adding 12 % of nanocrystals. The authors (Condés, Añón, Mauri, & Dufresne, 2015) state that nanocrystals could modify the protein cross-linking process, affecting the solubility of the film. Rocha et al. (Rocha, Farias, Carvalho, Ascheri, & Galdeno, 2014) produced cassava starch: soy protein: glycerol (13.18 to 46.82 % starch substitution) films by the casting technique and also found an increase in the solubility of the films with increasing protein content, ranging from 14.8 to 61.0 %. When adding protein isolate at a maximum concentration, a 250 % increase in solubility was observed when compared to the control film (without addition of protein isolate).

#### **3.4. Barrier, traction and thermogravimetric properties of films**

With the incorporation of different concentrations of protein isolate and 3 % m/v of starch nanoparticles, the thickness of the films presented values of 0.069 to 0.081 mm (Table 4), not resulting in significant differences ( $P > 0.05$ ). Similar result was found by Condés et al. (Condés, Añón, Mauri, & Dufresne, 2015) when incorporating corn starch nanocrystals obtained by acid hydrolysis in amaranth:glycerol protein isolate (5.0:1.25% m/v, respectively), assigning the effect to the uniform distribution of the particles of reduced size, and the strong interactions that can be formed between nanocrystals and different hydrophilic matrices.

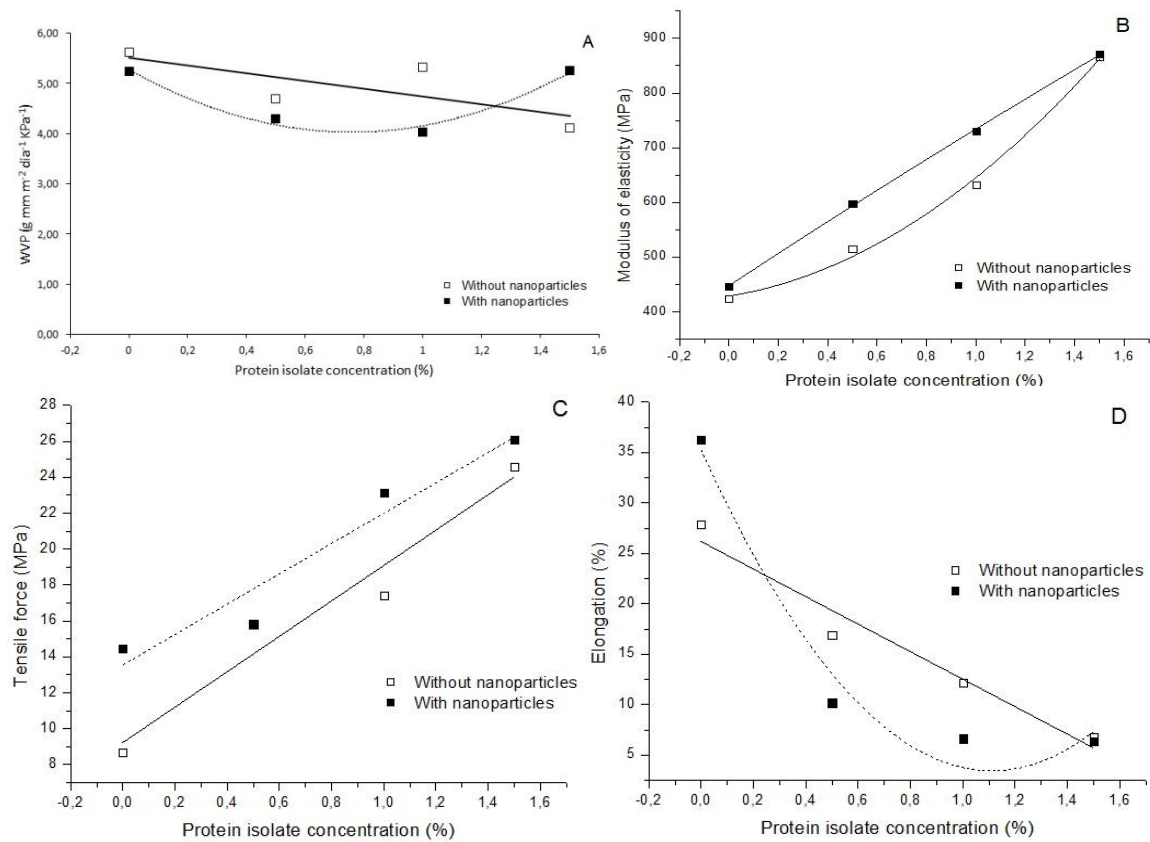
**Table 4** - Barrier and traction properties of control films and cassava starch nanocomposites:glycerol, with or without 3.0 % starch nanoparticles, and variable concentrations of protein isolate.

Cassava starch: glycerol:protein isolate: starch nanoparticles	Thickness (mm ± DP)	WVP (g.mm.m <sup>-2</sup> .day <sup>-1</sup> . KPa <sup>-1</sup> ± DP)	Modulus of elasticity (MPa ± DP)	Tensile force (MPa ± DP)	Elongation (% ± DP)
F1 (4 : 1 : 0.0 : 0)	0.074 ± 0.00 <sup>a</sup>	5.61 ± 0.10 <sup>a</sup>	424.13 ± 7.05 <sup>e</sup>	8.67 ± 0.63 <sup>e</sup>	27.92 ± 7.34 <sup>b</sup>
F2 (4 : 1 : 0.5 : 0)	0.070 ± 0.00 <sup>a</sup>	4.68 ± 0.80 <sup>b</sup>	514.83 ± 78.54 <sup>d</sup>	15.85 ± 1.62 <sup>cd</sup>	16.93 ± 8.50 <sup>c</sup>
F3 (4 : 1 : 1.0 : 0)	0.070 ± 0.00 <sup>a</sup>	5.31 ± 0.19 <sup>a</sup>	631.65 ± 30.45 <sup>c</sup>	17.41 ± 3.59 <sup>c</sup>	12.13 ± 1.97 <sup>cd</sup>
F4 (4 : 1 : 1.5 : 0)	0.075 ± 0.00 <sup>a</sup>	4.10 ± 0.22 <sup>b</sup>	866.58 ± 79.32 <sup>a</sup>	24.57 ± 0.99 <sup>ab</sup>	6.78 ± 0.94 <sup>d</sup>
F5 (4 : 1 : 0.0 : 3)	0.075 ± 0.01 <sup>a</sup>	5.23 ± 0.24 <sup>a</sup>	446.52 ± 18.94 <sup>de</sup>	14.48 ± 2.55 <sup>d</sup>	36.24 ± 3.61 <sup>a</sup>
F6 (4 : 1 : 0.5 : 3)	0.081 ± 0.01 <sup>a</sup>	4.30 ± 0.91 <sup>b</sup>	597.37 ± 57.93 <sup>c</sup>	15.82 ± 0.52 <sup>cd</sup>	10.19 ± 3.15 <sup>d</sup>
F7 (4 : 1 : 1.0 : 3)	0.069 ± 0.00 <sup>a</sup>	4.02 ± 0.44 <sup>b</sup>	730.59 ± 25.01 <sup>b</sup>	23.15 ± 0.64 <sup>b</sup>	6.64 ± 1.38 <sup>d</sup>
F8 (4 : 1 : 1.5 : 3)	0.074 ± 0.00 <sup>a</sup>	5.25 ± 0.85 <sup>a</sup>	870.71 ± 64.71 <sup>a</sup>	26.07 ± 0.07 <sup>a</sup>	6.40 ± 1.60 <sup>d</sup>

Means followed by the same letter in the same column do not differ statistically from each other by the Tukey test at 5% probability; SD: Standard deviation.

The water vapor permeability of the films added or not of starch nanoparticles ranged from 4.02 to 5.61 g.mm.m<sup>-2</sup>.day<sup>-1</sup>.KPa<sup>-1</sup> (Table 4). For the formulations with addition of protein isolate and without addition of nanoparticles, the mathematical model obtained by linear regression was:  $y = -0.7808x + 5.518$  ( $R^2 = 0.56$ ), where increased protein isolate concentration provided progressive reductions in this parameter, reaching a maximum reduction of approximately 40 % in the films containing 1.5 % of the protein isolate.

From the regression analysis it was possible to observe that by increasing the protein isolate concentration up to 1.5 % m/v in films containing starch nanoparticles, the permeability to water vapor was significantly affected ( $P < 0.05$ ), and the increase of the concentration of isolate up to 0.76 % promoted a 23 % reduction in WVP (Figure 4A), according to the quadratic model ( $y = 2.1643x^2 - 3.2864x + 5.2771$  with  $R^2 = 0.97$ ). A lower protein isolate content is sufficient to increase the molecular interaction between the film components, making it difficult for the water molecule to pass through, and consequently reduces the permeability to water vapor. From a certain concentration of the isolate, the inverse effect occurs, there is an increase in the PVA, probably because the particles agglomerate causing the molecules to move away and consequently form interstitial voids that favor the passage of water vapor (Condés, Añón, Mauri, & Dufresne, 2015; Rocha, Farias, Carvalho, Ascheri, & Galdeno, 2014).



**Figure 4** - Water vapor permeability - WVP (A), modulus of elasticity (B), tensile force (C) and elongation (D) of cassava starch nanocomposite films:glycerol, whether or not containing cassava starch nanoparticles, as a function of the concentration of protein isolate.

Lower values of water vapor permeability minimize the transfer of moisture between food and the atmosphere, increasing the shelf life of the product (Santana et al., 2016). González and Igarzabal (González, & Igarzabal, 2015) state that for soy protein films:glycerol:starch nanocrystals, a reduction in permeability to water vapor at concentrations below 20 % of nanocrystals, and at high concentrations of these the permeability exhibits the opposite behavior. A smaller nanoparticle content is sufficient to promote better dispersion in the films, reducing agglomeration, water molecule passage, and permeability (Le Corre, Bras, & Dufresne, 2010; Liu et al., 2015).

Sobral (Sobral, 2000), when evaluating the influence of the thickness of films of myofibrillar proteins on the functional characteristics of the same, observed

that the thickness influences in properties such as drilling force and permeability to water vapor, making important the control of this parameter.

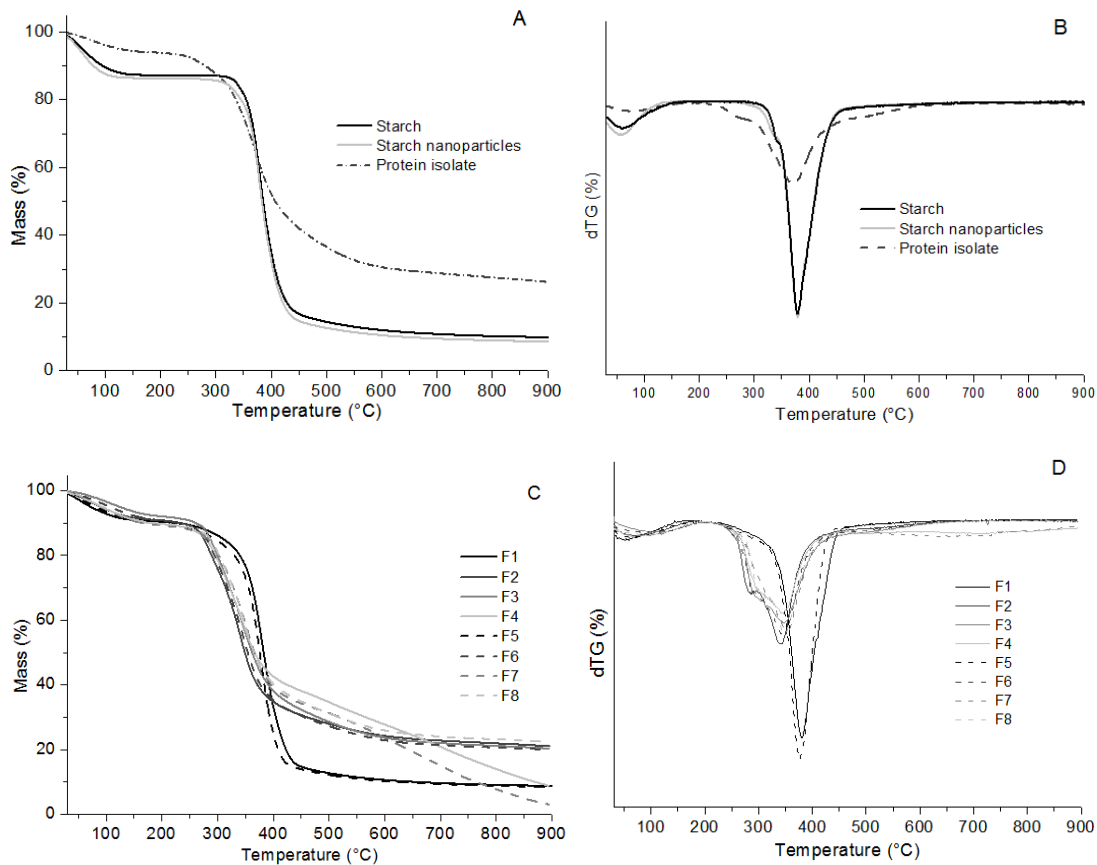
The results concerning the tensile properties of the nanocomposite films are presented in Table 4 and Figure 4. From the linear regression analysis of the films F1 to F4, containing variable concentrations of protein isolate and without the presence of starch nanoparticles (Figure 4), it is possible to verify a quadratic effect of the protein isolate concentration on the modulus of elasticity ( $R^2 = 0.99$ ), and linear on the maximum stress ( $R^2 = 0.93$ ) and elongation ( $R^2 = -0.96$ ). With the incorporation of 1.5 % (m/v) of protein isolate, maximum increases of approximately 200 % and 300 % were achieved in the modulus of elasticity and maximum stress, respectively, associated with a decrease of 7-fold elongation in relation to the control film (F1).

The cassava starch:glycerol (4:1 m/v) films containing 3 % (m/m<sub>starch</sub>) of starch nanoparticles, and varying concentrations of protein isolate (0.0 to 1.5 % m/v) (Figure 4) showed linear increases in modulus of elasticity and maximum stress ( $R^2 = 0.99$  and  $0.93$ , respectively), however, inversely proportional and quadratic effect on the elongation ( $R^2 = 0.96$ ) of the films. Therefore, with the addition of the nanoparticle the behavior of the modulus of elasticity from quadratic to linear, and from linear to quadratic elongation changes. As the protein isolate concentration increased, the films became more rigid, with less elongation at break. When comparing the control formulation (F1) with the formulation containing starch nanoparticles (without protein - F5), it was observed that there was no significant difference in the modulus of elasticity ( $P > 0.05$ ), but the maximum tension and the elongation increased in approximately 67 % and 30 %, respectively (Table 4). The interactions between proteins and nanostructures provide reinforcement with high cohesion, which requires greater energy for rupture, increasing tension and elasticity, but decreasing elongation, making the film less extensible (González, & Igarzabal, 2015).

By altering the configuration, the proteins can interact by means of hydrogen bonds or hydrophobic interactions, which produces a dense and resistant network. Flexibility is due to the native conformation of some proteins, providing greater resistance to stretching. The reinforcing effect on the nanocomposite is associated with a strong interaction between the starch nanoparticles and the two

hydrophilic polymer matrices, as well as glycerol (Condés, Añón, Mauri, & Dufresne, 2015). Zheng et al. (Zheng, Ai, Chang, Huang, & Dufresne, 2009) when evaluating the incorporation of pea starch nanocrystals into protein films of soybean, observed that the maximum reinforcement was obtained with addition of 2.0 % of nanocrystals.

The thermogravimetric curves of starch, bean protein isolate and starch nanoparticles obtained by ultrasound (Figures 5A and B) show two well-defined thermal events, as shown in Table 5. For cassava starch and its nanoparticles, the first thermal event is associated with humidity, with mass losses of approximately 12.76 and 14.11 %, respectively.



**Figure 5** - TG and dTG of cassava starch, protein isolate, starch nanoparticles (A and B) and nanocomposite film formulations (C and D).

The starch nanoparticles began to undergo degradation at 280.83 °C and 382.33 °C have the maximum mass loss rate of 91.47 %. The starch began its thermal degradation at 308.7 °C with maximum thermal degradation rate at 377.43 °C and loss of 89.59 %. The higher mass loss of the starch nanoparticles in relation



to the native starch is associated to the greater number of surface hydroxyls of the nanoparticles, predominating the amorphous part (amylose) that, due to the hydrophilicity, degrade more quickly (Blaszczak, Kiseleva, Yuryev, Sergeev, & sadoeska, 2007; Haaj, Magnin, Pétrier, & Boufi, 2013; Lamanna, Morales, García, & Goyanes, 2013).

The protein isolate also presents two thermal events (Figures 5A and B). The first event is attributed to water removal and protein denaturation (Fontanari et al., 2012), starting at a temperature of 30.56 °C with loss of approximately 5.82 % by mass. The second event occurred at the initial temperature of 241.94 °C and presented the highest degradation rate at 369.37 °C, with loss of 73.84 % by mass (Table 5).

The thermal stability of the films is shown in Figure 5 (C and D) and Table 5. The first thermal event is observed at the initial temperature of 31.36 °C and corresponds to loss of moisture, similar to the raw materials from which they are composed. The thermal degradation was observed from 275.22 °C ( $T_{\text{onset}}$ ), and it is verified that with the addition of the protein isolate, a reduction of the Tonset was observed, however, at the maximum protein concentration, the loss of mass is similar to that observed for the control films (91.30 and 91.39 %, respectively).

**Table 5** - Thermogravimetric parameters of raw materials and nanocomposite films obtained through the TG and dTG curves.

Sample	1 <sup>o</sup> event (moisture) T (°C)	2 <sup>o</sup> event (degradation)		Mass loss <sup>3</sup> (%)	
		$T_{\text{onset}}^1$ (°C)	$T_{\text{máx}}^2$ (°C)		
	32.07	308.70	377.43	89.59	
Formulations	30.56	241.94	369.37	73.84	
	35.46	280.83	382.33	91.47	
Cassava starch: glycerol:protein isolate:starch nanoparticles	F1 (4 : 1 : 0,0 : 0)	33.08	339.56	380.32	91.39
	F2 (4 : 1 : 0.5 : 0)	34.79	275.90	342.16	78.77
	F3 (4 : 1 : 1.0 : 0)	37.52	283.94	346.67	79.98
	F4 (4 : 1 : 1.5 : 0)	35.64	277.78	343.85	91.30
	F5 (4 : 1 : 0.0 : 3)	33.08	345.83	378.44	91.36
	F6 (4 : 1 : 0.5 : 3)	35.64	275.22	348.55	79.86
	F7 (4 : 1 : 1.0 : 3)	31.36	294.55	356.26	96.98
	F8 (4 : 1 : 1.5 : 3)	31.36	291.99	348.17	77.27

<sup>1</sup>Initial temperature of degradation. <sup>2</sup>Maximum degradation temperature. <sup>3</sup>Loss of mass after degradation.

The minimum values of  $T_{\text{onset}}$  and  $T_{\text{max}}$  occurred when the protein isolate present in the film was 0.5 %, in formulation 2 without addition of nanoparticles.

Santana et al (Santana et al, 2016), when evaluating the incorporation of cellulose nanofibers extracted from sisal in nanocomposites, affirm that the increase of the nanofibres concentration reduces the  $T_{\text{onset}}$ , the maximum temperature of degradation and the loss of mass. Soares, Scremin and Soldi (Soares, Scremin, & Soldi, 2005) report that adding soybean protein to the corn starch films modifies the thermal stability of the materials with  $T_{\text{onset}}$  reductions and the maximum degradation temperature, thus, the change in stability may be related to the rupture of low energy intermolecular bonds responsible for maintaining conformation in protein films.

By adding 3 % nanoparticles, the thermal stability of the films (Table 5) was slightly altered when compared to the control formulation F1 (starch + glycerol) to the F5 formulation (starch + glycerol + nanoparticles). Similar result was found by Costa et al (Costa, Souza, Silva, & Druzian, 2017) when adding nanocrystals of cassava starch to nanocomposites based on amaranth protein, the films reinforced with nanocrystals showed similar loss of mass of the control film, indicating that the addition of nanocrystals does not alter the thermal stability of films.

The results presented in Table 5 show that the presence of nanoparticles of starch did not modify the thermal behavior of the nanocomposites, however, the increase in protein isolate concentration affected the reduction of  $T_{\text{onset}}$  and  $T_{\text{max}}$  of the films.

#### **4. CONCLUSIONS**

The results presented in this work show the feasibility of the use of cassava bean protein isolates and cassava starch nanoparticles obtained by ultrasound for the development of nanocomposite films of the same amylose matrix. Knowledge about protein composition can be used to obtain edible materials with desired properties for various applications. The formulations of films with protein isolate presented better traction properties, being proportional to the increase of their concentration. In this way, the substitution of nanocrystals obtained by acid hydrolysis by nanoparticles obtained by ultrasound guarantees the maintenance of

the properties of the films, optimizing the time of obtaining, with greater yield and without need of chemical reagents.

The incorporation of nanoparticles to the films had its effect associated to the presence of the protein isolate, without significantly affecting the properties of the nanocomposites, despite the tendency of nanorefraction. It was found that the protein isolate significantly influenced the tensile properties of the films, increasing tensile strength and modulus of elasticity, reducing the thermal stability thereof. The nanocomposites formed showed homogeneity from the chemical similarity of the nanoparticles to the matrix, as well as the hydrophilic character of the protein isolate.

Future research is needed to evaluate new properties in order to reach a perspective of industrial production of starch films and protein isolates of cowpea reinforced with starch nanoparticles, such as microbiological parameters, biodegradability and product application. However, the results presented by this study show the possibility of producing new packaging materials.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB, nº 8614/2015).

## **STATEMENT OF CONFLICT OF INTEREST**

All the authors declare no conflict of interest with regards to the described research, the publication of the result and financial issues

## **REFERENCES**

American Society for Testing and Materials (ASTM). (2001). ASTM Standard 96-00, Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics; ASTM International: Philadelphia.

American Society for Testing and Materials (ASTM). (2001). ASTM Standard D 882-0, Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics; ASTM International: Philadelphia.

Assis, L. M., Zavareze, E. R., Prentice-Hernández, C., & Souza-Soares, L. A. (2012). Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15, 99-109.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1995). Arlington: Association of Official Analytical Chemists.

Bastús, N. G., Comenge, J., & Puentes, V. (2011). Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: size focusing versus Ostwald ripening. *Langmuir*, 27, 11098-11105.

Blaszczak, J. F., Kiseleva, V. I., Yuryev, V. P., Sergeev, A. I., & Sadoeska, J. (2007). Effect of high pressure on thermal, structural and osmotic properties of waxy maize and hylon VII starch blends. *Carbohydrate Polymers*, 683, 387–396.

Bocconi, F., Rondinone, B., Petyx, C., & Iavicoli, S. (2008). Potential occupational exposure to manufactured nanoparticles in Italy. *Journal of Cleaner Production*, 16, 949-956.

Bourtoom, T., Chinnan, M. S., Jantawat, P., & Sanguandeeikul, R. (2006). Effect of select parameters on the properties of edible film from water-soluble fish proteins in surimi wash-water. *LWT – Food Science and Technology*, 39, 405-418.

Condés, M. C., Añón, M. C., Mauri, A. N., & Dufresne, A. (2015). Amaranth protein films reinforced with maize starch nanocrystals. *Food Hydrocolloids*, 47, 146-157.

Costa, E. K. C., Souza, C. O., Silva, J. B. A., & Druzian, J. I. (2017). Hydrolysis of part of cassava starch into nanocrystals leads to increased reinforcement of nanocomposite films. *Journal of Applied Polymer Science*, 134, 45311.

Davanço, T., Tanada-Palmu, P., & Gosso, C. (2007). Composite films made with gelatin, tracetin, stearic and caproic acids: effect of pH and surfactants addition on

the functionality of films. *Food Science and Technology*, 27, 408-416.

Elhardallou, S. B., Khalid, I. I., Gobouri, A. A., & Abdel-Hafez, S. H. (2015). Amino acid composition of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) flour and its protein isolates. *Food and Nutrition Sciences*, 6, 790-797.

Fontanari, G. G., Martins, J. M., Kobelnik, M., Pastre, I. A., Arêas, J. A. G., Batistuti, J. P., & Fertonani, F. L. (2012). Thermal studies on protein isolates of white lupin seeds (*Lupinus albus*). *Journal of Thermal Analysis Calorimetry*, 108, 141-148.

Frota, K. M. G., Soares, R. A. M., & Arêas, J. A. G. (2008). Chemical composition of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), BRS-Milênio cultivar. *Food Science and Technology*, 28, 470-476.

García, N. L., Ribba, L., Dufresne, A., Aranguren, M., & Goyanes, S. (2011). Effect of glycerol on the morphology of nanocomposites made from thermoplastic starch and starch nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 84, 302-210.

Gonçalves, P. M., Noreña, C. P. Z., Silveira, N. P., & Brandelli, A. (2014). Characterization of starch nanoparticles obtained from *Araucaria angustifolia* seeds by acid hydrolysis and ultrasound. *LWT – Food Science and Technology*, 58, 21-27.

González, A., & Igarzabal, C. I. A. (2015). Nanocrystal-reinforced soy protein films and their application as active packaging. *Food Hydrocolloids*, 43, 777-784.

Guerrero, P., Garrido, T., Leceta, I., & Caba, K. (2013). Films based on proteins and polysaccharides: preparation and physical-chemical characterization. *European Polymer Journal*, 49, 3713-3721.

Haaj, S. B., Magnin, A., Pétrier, C., & Boufi, S. (2013). Starch nanoparticles formation via high power ultrasonication. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1625-1632.

Haaj, S. B., Thielemans, W., Magnin, A., & Boufi, S. (2016). Starch nanocrystals and starch nanoparticles from waxy maize as nanoreinforcement: a comparative study. *Carbohydrate Polymers*, 143, 310-317.

Herrera, M. P., Vasathan, T., & Chen, L. (2017). Rheology of starch nanoparticles as influenced by particle size, concentration and temperature. *Food Hydrocolloids*, 66, 237-245.

Husseinsyah, S., Yeng, C. M., Kassim, A. R., Zakaria, M. M., & Ismail, H. (2014). Kapok husk-reinforced soy protein isolate biofilms. Tensile properties and enzymatic hydrolysis. *BioResources*, 9, 5636-5651.

Kahn, J. (2006). Nano's big future – tiny technology promises big rewards. Some may already be in your closet. *National Geographic*, 209, 98-119.

Kim, H., Park, S. S., & Lim, S. (2015). Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 126, 607-620.

Kim, H., Park, D. J., Kim, J., & Lim, S. (2013). Preparation of-crystalline starch nanoparticles using cold acid hydrolysis and ultrasonication. *Carbohydrate Polymers*, 98, 295-301.

Kunte, L. A., Gennadios, A., Cuppett, S. L., Hanna, M. A., & Weller, C. L. (1997). Cast Films from Soy Protein Isolates and Fractions. *Cereal Chemistry*, 74, 115-118.

Lamanna, M., Morales, N.J., García, N.L., & Goyanes, S. (2013). Development and characterization of starch nanoparticles by gamma radiation: Potential application as starch matrix filler. *Carbohydrate Polymers*, 97, 90–97.

Le Corre, D., & Angellier-Coussy, H. (2014). Preparation and application of starch nanoparticles for nanocomposites: A review. *Reactive & Functional Polymers*, 85, 97-120.

Le Corre, D., Bras, J., & Dufresne, A. (2010). Starch nanoparticles. A review. *Biomacromolecules*, 11, 1139-1153.

Li, X., Qiu, C., Ji, N., Sun, C., Xiong, L., & Sun, Q. (2015). Mechanical, barrier and morphological properties of starch nanocrystals-reinforced pea starch films. *Carbohydrate Polymers*, 121, 155-162.

Lin, N., Huang, J., Chang, P. R., Anderson, D. P., & Yu, J. (2011). Preparation, modification, and application of starch nanocrystals in nanomaterials: A review. *Journal of Nanomaterials*, 2011, 1-13.

Lowry, O. H., Rosenrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

Mauri, A. N., & Añón, M. C. (2006). Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1064-1072.

Mauri, A. N., & Añón, M. C. (2007). Mechanical and physical properties of soy protein films with pH-modified microstructures. *Food Science and Technology International*, 14, 119-125.

Miller, C.M.O., Yamashita, F., & Laurindo, J.B. (2008). Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. *Carbohydrate Polymers*, 72, 82-87.

Moraes, J. O., Scheibe, A. S., Sereno, A., & Laurindo, J. B. (2013). Scale-up of the production of cassava starch based films using tape-casting. *Journal of Food Engineering*, 119, 800-808.

Nasseri, R., & Mohammadi, N. (2014). Starch-based nanocomposites: A comparative performance study of cellulose whiskers and starch nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 106, 432-439.

Neves, V. A., Lourenço, E. J., & Silva, M. A. (2001). Extraction, isolation and fractionation of proteins from lupin seeds (*Lupinus albus*), var. Multolupa. *Alimentos e Nutrição*, 12, 115-130.

Neves, V. A., Pereira, D. D., Shoshima, A. H. R., & Tavano, O. L. (2003). Isolation and characteristics of the protein fractions of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), var. BR-14-Mulato. *Alimentos e Nutrição*, 14, 47-55.

Ratnayake, W. S., Otani, C., & Jackson, D. S. (2009). DSC enthalpic transitions during starch gelatinization in excess water, dilute sodium chloride, and dilute sucrose solutions. *Food Science and Technology Department*, 89, 2156-2164.

Rocha, G. O., Farias, M. G., Carvalho, C. W. P., Ascheri, J. L. R., & Galdeno, M. C. (2014). Biodegradable composite films based on cassava starch and soy protein. *Polímeros*, 24, 587-595.

Roco, M. C. (2003). Nanotechnology convergence with modern biology and medicine. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 337-346.

Sadegh-Hassani, F., & Nafchi, A. M. (2014). Preparation and characterization of bionanocomposite films based on potato starch/halloysite nanoclay. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 458-462.

Santana, J. S., Costa, E. K. C., Rodrigues, P. R., Correia, P. R. C., Cruz, R. S., & Druzian, J. I. (2018). Morphological, barrier, and mechanical properties of cassava starch films reinforced with cellulose and starch nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, 135, 47001.



Santana, J. S., Rosário, J. M., Pola, C. C., Otoni, C. G., Soares, N. F. F., Camilloto, G. P., & Cruz, R. S. (2016). Cassava starch-based nanocomposites reinforced with cellulose nanofibers extracted from sisal. *Journal of Applied Polymer Science*, 134, 44637.

Shi, A., Wang, L., Li, D., & Adhikari, B. (2013). Characterization of starch films containing starch nanoparticles. Part 2: Viscoelasticity and creep properties. *Carbohydrate Polymers*, 96, 593-601.

Silva, J. B. S., Pereira, F. V., & Druzian, J. I. (2012). Cassava starch-based films plasticized with sucrose and inverted sugar and reinforced with cellulose nanocrystals. *Journal of Food Science*, 77, 14-19.

Soares, R. M. D., Scremin, F. F., & Soldi, V. (2005). Thermal stability of biodegradable films based on soy protein and corn starch. *Macromolecular Symposia*, 229, 258-265.

Sobral, P. J. A. (2000). Thickness effects of myofibrillar protein based edible films on their functional properties. *Brazilian Agricultural Research*, 35, 1-14.

Souza, C. O., Silva, L. T., Silva, J. R., López, J. A., Veiga-Santos, P., & Druzian, J. I. (2011). Mango and acerola pulps as antioxidant additives in cassava starch bio-based film. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2248-2254.

Sun, Q., Fan, H., & Xiong, L. (2014). Preparation and characterization of starch nanoparticles through ultrasonic-assisted oxidation methods. *Carbohydrate Polymers*, 106, 359-364.

Veiga-Santos, P., Oliveira, L. M., Cereda, M. P., Alves, A. J., & Scamparini, A. R. P. (2005). Mechanical properties, hydrophilicity and water activity of starch gum films effect of additives and deacetylated xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 19, 341-349.

Veiga-Santos, P., Oliveira, L. M., Cereda, M. P., & Scamparini, A. R. P. (2001). Sucrose and inverted sugar as plasticizer. Effect on cassava starch-gelatin film mechanical properties, hydrophilicity and water activity. *Food Chemistry*, 103, 255-262.

Zheng, H., Ai, F., Chang, P. R., Huang, J., & Dufresne, A. (2009). Structure and properties of starch nanocrystal-reinforced soy protein plastics. *Polymer Composites*, 30, 474-480.

Zhu, F. (2015). Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, 122, 456-480.