UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos

Erick Flávio Guimarães Amaral

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE PROTEÍNAS DE SEMENTES DE GIRASSOL CONTENDO EUGENOL E NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA

Belo Horizonte
2020

Erick Flávio Guimarães Amaral

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE PROTEÍNAS DE SEMENTES DE GIRASSOL CONTENDO EUGENOL E NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção parcial do grau de Mestre em Ciências de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Leandro Soares de Oliveira

Belo Horizonte

2020

A485p

Amaral, Erick Flávio Guimarães.
Preparação e caracterização de filmes de proteínas de sementes de girassol contendo eugenol e nanopartículas de hidroxiapatita / Erick Flávio Guimarães Amaral. – 2020.
86 f. : il.

Orientador: Leandro Soares de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Alimentos – Embalagens – Teses. 2. Filmes comestíveis – Teses. 3. Biopolímeros – Teses. 4. Hidroxiapatita – Teses. 5. Girassol – Sementes – Teses. I. Oliveira, Leandro Soares de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 664.092

Elaborado por Darlene Teresinha Schuler – CRB-6/1759

FOLHA DE APROVAÇÃO

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE PROTEÍNA ISOLADA DE SEMENTES DE GIRASSOL CONTENDO EUGENOL E NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA

ERICK FLÁVIO GUIMARÃES AMARAL

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 30 de junho de 2020, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Dr. Leandro Soares de Oliveira (Orientador e Presidente da Comissão)
Escola de Engenharia - UFMG

Profa. Dra. Camila Argenta Fante
Faculdade de Farmácia - UFMG

Profa. Dra. Jane Sélia dos Reis Coimbra
Universidade Federal de Viçosa

Belo Horizonte, 30 de junho de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família e amigos por sempre estarem comigo, terem paciência e principalmente por me incentivarem.

Ao meu orientador, Prof. Leandro Soares de Oliveira, por me auxiliar durante esse tempo, e por todos os ensinamentos repassados que incentivaram a minha busca pelo conhecimento. Agradeço também aos professores que compuseram a banca pelo olhar criterioso sobre o trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, que sempre estavam dispostos a me ajudar nos experimentos. Agradeço especialmente à Lais, que é minha colega e amiga desde a graduação, e me encorajou a continuar os estudos.

À Profª. Camila Fante (FAFAR) por possibilitar a realização dos ensaios mecânicos.

Ao Prof. Vicente Buono (DEMEC) por possibilitar as análises no DRX e ao Samuel Barbosa, por me auxiliar na compreensão dos resultados.

À Profª. Sônia Denise (DEMIN) por possibilitar a utilização do moinho no Laboratório de Operações da Engenharia Química e ao Elbert Nigri, por me auxiliar no uso do equipamento.

A todos os professores e professoras do Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, da Faculdade de Farmácia da UFMG.

À Universidade Federal de Minas Gerais, pela minha formação.

À Capes pela concessão da bolsa de estudos; e ao CNPq pelo financiamento da pesquisa.

RESUMO

Proteínas de semente de girassol, com baixo teor de ácido clorogênico (PISGa) e alto teor de ácido clorogênico (PISGb), foram utilizadas como materiais base para produção filmes poliméricos. Essas estruturas foram produzidas com adição de óleo de girassol, eugenol e nanopartículas de hidroxiapatita (HAp) produzidas pela calcinação ácida de cascas de ovos de galinha. Foram analisadas as propriedades antioxidantes, físicas e de barreira ao vapor de água dos filmes. Também foram avaliadas as propriedades óticas dos filmes, bem como a cristalinidade e tamanho das partículas de HAp. Os filmes controles, contendo apenas as proteínas e glicerol, mostraram boas propriedades mecânicas, mas deficiência nas propriedades de barreira e capacidade antioxidante. Os compostos fenólicos, que estão naturalmente ligados à proteína e aqueles que foram adicionados à solução filmogênica, conferiram propriedades antioxidantes, sendo essa atividade dependente da natureza do composto (se está livre ou ligado à proteína) e da quantidade deste na solução filmogênica. A adição de eugenol aumentou a capacidade antioxidante de todos os filmes. Não foi observada mudança na capacidade antioxidante pela adição das nanopartículas de HAp nos filmes. No entanto, foi observado que a ausência do ácido clorogênico (5-CQA) na PISGa acarretou aumento da solubilidade da proteína na solução filmogênica, e a adição de cargas na matriz polimérica resultou na diminuição da ductilidade dos filmes**.** Por outro lado, a adição das nanopartículas de HAp aumentou a resistência à tração dos filmes, havendo, no entanto, diminuição da solubilidade dos filmes em água. Observando as propriedades óticas dos filmes produzidos, foi verificado que os filmes produzidos com a PISGa apresentaram coloração mais clara que os filmes de PISGb, sendo que os filmes produzidos com a PISGa apresentaram coloração amarelada e os de PISGb, esverdeada. Esses resultados revelaram que filmes de proteína isolada de semente de girassol, adicionados com óleo de girassol, eugenol e nanopartículas de HAp, podem ser utilizados como alternativas à filmes comestíveis em indústrias de alimentos.

Palavras-chave: Filmes. Biopolímeros. Hidroxiapatita. Proteína de girassol.

ABSTRACT

Sunflower seed proteins with low chlorogenic acid content (PISGa) and high chlorogenic acid content (PISGb) were used as base material in biopolymeric films, combined with sunflower oil, eugenol and hydroxyapatite nanoparticles (HAp) produced from chicken eggshells. The antioxidant and water vapor barrier properties of the films were analyzed. The physical and optical properties of the films were also evaluated, as well as the crystallinity and particle sizes of HAp. Good mechanical characteristics were demonstrated by the control films containing only proteins and glycerol, but they revealed high water vapor permeability and low antioxidant properties. Phenolic compounds, naturally present in the sunflower protein, together with eugenol added in the filmogenic solution, conferred antioxidant properties to the film, with activity strength depending on the state of the compound (whether it was free or bound to the protein) and its amount in the filmogenic solution. The addition of eugenol improved the antioxidant capacity of the films. No change in antioxidant capacity was observed by the addition of HAp nanoparticles. However, it was observed that the absence of chlorogenic acid (5-CQA) in PISGa increased the protein solubility in the filmogenic solution, and the addition of fillers in the biopolymer matrix showed a decrease in the ductility of the films. On the other hand, the addition of HAp nanoparticles increased the tensile strength of the films and caused a lowering in water solubility. PISGa films were found to be more susceptible to having a lighter and yellowish color than the films with PISGb, that presented a darker and greenish color because of the presence of 5-CQA in its composition. These results revealed that sunflower isolate protein films, added with sunflower oil, eugenol and HAp nanoparticles, can be an alternative to edible films in food industries.

Keywords: Films. Biopolymers. Hydroxyapatite. Sunflower protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção mundial de semente de girassol no ano de 2018.....16
Figura 2 – Esquema do corte transversal de uma semente de girassol.....17
Figura 3 – Perfil da solubilidade das proteínas em água em função do pH do meio. 20
Figura 4 – Fórmula estrutural do ácido 5-CQA e de seus ácidos componentes 21
Figura 5 – Representação esquemática da estrutura cristalina de uma célula unitária de HAp 22
Figura 6 – Estrutura do eugenol.....24
Figura 7 – Cascas de ovos calcinadas e cominuídas.....29
Figura 8 – Hidroxiapatita sintetizada a partir de cascas de ovos de galinha 30
Figura 9 – Preparo dos filmes: (a) Filme produzido com a PISGa; (b) Filme produzido com a PISGb.....32
Figura 10 – Estabilização do radical $ABTS^{\bullet+}$ por um antioxidante e subsequente formação do ABTS pelo persulfato de potássio 35
Figura 11 – Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+}. 36
Figura 12 – Representação esquemática do acoplamento do filme na cápsula de vidro 37
Figura 13 – Análise da permeabilidade dos filmes ao vapor de água 38
Figura 14 – Difração de raios X por um cristal 40
Figura 15 – Proteínas PISGa (a) e PISGb (b) em pó, na embalagem do fabricante. 44
Figura 16 – Espectro de difração de raios x para a amostra de HAp 53
Figura 17 – Modelo de referência “padrão” para o cristal de hidroxiapatita pura - JCPDS nº 09-0432 53
Figura 18 – (a) e (b) Micrografias obtidas por MET de cristais de hidroxiapatita mostrando coerência entre as orientações cristalográficas.....54
Figura 19 - Micrografia das nanopartículas de HAp obtidas por MET. 54
Figura 20 – Micrografia das nanopartículas de HAp mostrando o agrupamento das partículas.....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química (%) média da semente de girassol completa, semente de girassol descascada e torta de semente de girassol desengordurada. 17
Tabela 2 – Teor percentual médio dos ácidos graxos presentes no óleo de girassol 18
Tabela 3 – Delineamento experimental da preparação dos filmes.....31
Tabela 4 – Resultado dos parâmetros de cor L*, a* e b* dos filmes produzidos com a PISGa.....43
Tabela 5 – Resultado dos parâmetros de cor L*, a* e b* dos filmes produzidos com a PISGb.....43
Tabela 6 – Análise de umidade e solubilidade em água dos filmes produzidos com a PISGa.....45
Tabela 7 – Análise de umidade e solubilidade em água dos filmes produzidos com a PISGb.....46
Tabela 8 – Análise da Permeabilidade ao vapor d'água dos filmes produzidos com a PISGa.....47
Tabela 9 – Análise da Permeabilidade ao vapor d'água dos filmes produzidos.....48
Tabela 10 – Análise da capacidade antioxidante dos filmes produzidos.....49
Tabela 11 – Análise da capacidade antioxidante dos filmes produzidos.....49
Tabela 12 – Análise das propriedades mecânicas dos filmes produzidos 50
Tabela 13 – Análise das propriedades mecânicas dos filmes produzidos 51
Tabela 14 – Dados obtidos por difração de raios X da amostra de hidroxiapatita utilizados para verificação de tamanho do cristal. 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-CQA – Ácido clorogênico

a* – Parâmetro CIELAB relacionado a tonalidades de vermelho a verde

A1 – Filme produzido com a proteína de girassol sem ácido clorogênico.

A2 – Filme produzido com a proteína de girassol sem ácido clorogênico, óleo de semente de girassol e eugenol.

A3 – Filme produzido com a proteína de girassol sem ácido clorogênico, óleo de semente de girassol, eugenol e hidroxiapatita na concentração 0,1% (m/m)

A4 – Filme produzido com a proteína de girassol sem ácido clorogênico, óleo de semente de girassol, eugenol e hidroxiapatita na concentração 0,3% (m/m)

b* – Parâmetro CIELAB relacionado a tonalidades de amarelo a azul

B1 – Filme produzido com a proteína de girassol com ácido clorogênico.

B2 – Filme produzido com a proteína de girassol com ácido clorogênico, óleo de semente de girassol e eugenol.

B3 – Filme produzido com a proteína de girassol com ácido clorogênico, óleo de semente de girassol, eugenol e hidroxiapatita na concentração 0,1% (m/m)

B4 – Filme produzido com a proteína de girassol com ácido clorogênico, óleo de semente de girassol, eugenol e hidroxiapatita na concentração 0,3% (m/m)

CIELAB – Sistemas de cores substrativas

DEMEC – Departamento de Engenharia Mecânica

DEMIN – Departamento de Engenharia de Minas

DRX – Difração de raios x

DRX – Difração de raios x

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

HAp – Hidroxiapatita

JCPDS - Centro Internacional de Dados de Difração

kDa – Quilodalton

L* – Luminosidade

MC – Umidade relativa

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

pH – Potencial hidrogeniônico

PISG – Proteína isolada de semente de girassol

PISGa – Proteína isolada de semente de girassol sem ácido clorogênico

PISGb – Proteína isolada de semente de girassol com ácido clorogênico

PVA – Permeabilidade ao vapor de água

SFA – Solubilidade dos filmes em água

SOPT – Setor de Operações, Processos e Tecnologia

TSGD – Torta de semente de girassol desengordurada

TTVA – Taxa de transmissão do vapor de água

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

2 REVISÃO DE LITERATURA 16

2.1 Semente de girassol 16

2.2 Proteína de semente de girassol 19

2.3 Hidroxiapatita 21

2.4 Óleo essencial de cravo da índia (eugenol) 24

2.5 Filmes produzidos a partir de biopolímeros (biofilmes) 25

3 MATERIAIS E MÉTODOS 28

3.1 Materiais e reagentes 28

3.2 Produção de nanopartículas de hidroxiapatita 28

3.3 Preparação dos filmes 30

3.4 Caracterização dos filmes 32

3.5 Caracterização da Hidroxiapatita 39

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 42

4.1 Caracterização dos filmes 42

4.2 Caracterização da morfologia da Hidroxiapatita 51

5 CONCLUSÃO 56

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 58

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 59

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Brasileira de Embalagens (ABRE, 2020), houve um crescimento de 3% na produção de embalagens no Brasil no ano de 2019, com as embalagens plásticas representando 41% de todo o faturamento bruto da venda de embalagens no ano. Além de representarem um problema para o meio ambiente devido ao processo extrativista da respectiva matéria-prima e uso generalizado em coberturas agrícolas, ocasionando degradação e contaminação do solo, a maioria das embalagens plásticas utilizadas atualmente é produzida a partir de polímeros não-biodegradáveis e não-renováveis, sendo o descarte destas um dos principais problemas ambientais da atualidade (ANDRADE *et al*., 2019; FILHO *et al*., 2019; HEIDBREDER *et al*., 2019; WANG *et al*., 2019).

Devido ao crescente aumento na produção de resíduos sólidos, originários de fontes agroindustriais diversas, aproveitá-los e reduzir o descarte inapropriado tornou-se uma preocupação mundial, visando a sustentabilidade, redução de custos por meio da agregação de valor aos processos industriais e novas aplicações para os resíduos, utilizando-os como matéria-prima e fonte de energia (PERIMENIS *et al*., 2018; TOLEDO *et al*., 2018). Dentre as diversas aplicações sendo estudadas para os resíduos agroalimentares, destaca-se a produção de filmes e compósitos biopoliméricos, produtos de valor agregado vislumbrados para uso na produção de embalagens para produtos alimentícios.

Além da possível utilização dos resíduos da agroindústria como substrato energético (CHOE *et al*., 2019; BÜCKER *et al*., 2020; WESTERHOLM *et al*., 2020) e alimentação animal (MUTTHARASI *et al*., 2019; OLIVEIRA *et al*., 2019), estes estão sendo estudados como fonte de matéria-prima para a síntese de biopolímeros para confecção de biofilmes e biocompósitos, constituindo uma alternativa às embalagens plásticas utilizadas atualmente (DINIKA & UTAMA, 2019; SONG *et al*., 2013).

Os biomateriais, produzidos a partir de polímeros derivados de fontes proteicas, vêm recebendo crescente atenção nos últimos anos, devido à biodegradabilidade destes, alto potencial de formação de filmes, baixo custo de produção, fácil obtenção da matéria-prima, alta resistência à permeação de gases, voláteis orgânicos e óleos,

além da possibilidade de desenvolvimento de materiais com atividades antimicrobianas e antioxidantes, devido a possível presença de compostos fenólicos em sua composição (INSAWARD *et al*., 2015; LEE *et al*., 2015; TAHSIRI, 2019). Uma fonte proteica promissora é a derivada de matérias-primas vegetais, o que inclui alguns subprodutos da extração de óleo vegetal, como farelos de sementes de oleaginosas (HASSAN *et al*., 2018; MEHRYAR *et al*., 2017). Normalmente utilizado como ração animal, o farelo de girassol desengordurado é um subproduto oriundo da indústria de extração óleo de girassol, biodegradável e detentor de um teor proteico que varia entre 35 e 70% da massa total, o que o torna um excelente substrato para extração da proteína para uso na produção de filmes (SALGADO *et al*., 2013; SONG *et al*., 2013; LEE & SONG, 2015; TESSIER *et al*., 2020).

Com a finalidade de aprimorar as características dos filmes produzidos com biopolímeros, alguns compostos são adicionados à sua matriz, como os lipídeos, a fim de aperfeiçoar as características de barreira, principalmente ao vapor de água (HALAL *et al*., 2015). Já os compostos fenólicos, adicionados às matrizes desses materiais, têm a finalidade de conferir propriedades antioxidantes e antimicrobianas (SALGADO *et al*., 2010; SANLA-EAD *et al*., 2012; TALON *et al*., 2019), enquanto a adição de partículas e nanopartículas nas soluções formadoras dos filmes (soluções filmogênicas) objetiva aprimorar as propriedades mecânicas e as características de barreira dos filmes formados (PRAKASAM *et al*., 2015; FAN *et al*., 2019).

Com base no exposto, o objetivo deste trabalho foi a produção e caracterização de biomateriais tendo como base proteínas isoladas de semente de girassol, sem ácido clorogênico (PISGa) e com ácido clorogênico (PISGb), óleo de girassol, eugenol e nanopartículas de hidroxiapatita (HAp) produzidas pela calcinação ácida de cascas de ovos de galinha. Logo, o presente trabalho apresenta e discorre sobre: (i) produção dos filmes proteicos pelo método de casting, com a utilização de biomateriais complementares, como frações lipídicas e nanopartículas, avaliando os parâmetros de controle durante a produção; (ii) produção de nanopartículas de hidroxiapatita pela calcinação ácida de cascas de ovos de galinha; e (iii) caracterização dos filmes produzidos. Portanto, com a produção e caracterização desses biomateriais almeja-se redução do impacto ambiental dos resíduos agroindustriais da indústria de óleo de

semente de girassol, uma vez que este trabalho apresenta uma alternativa à destinação desses resíduos.

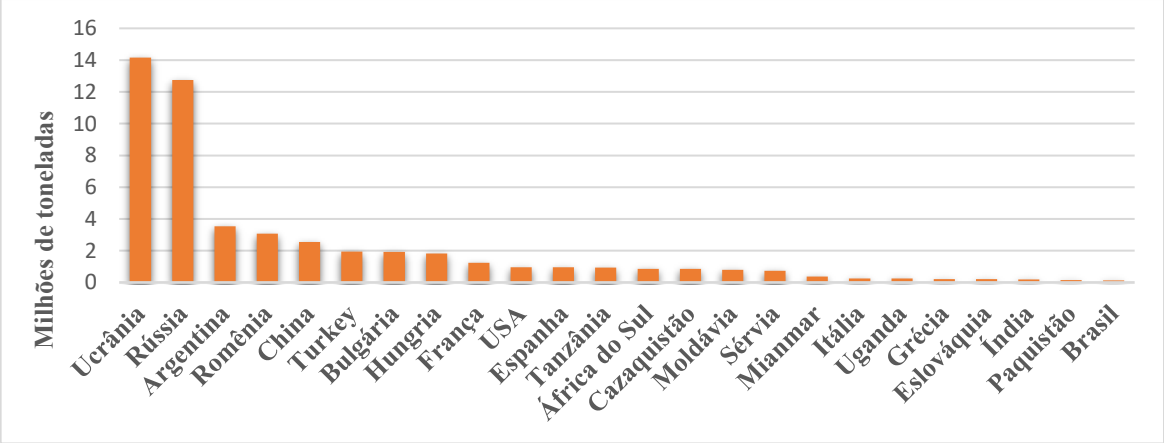
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Semente de girassol

O girassol (*Helianthus annus L.*), espécie sublenhosa da família *Compositae*, é cultivado mundialmente para extração do óleo das respectivas sementes. O subproduto gerado nessa atividade, a torta da prensagem de sementes desengordurada, é uma importante fonte proteica, constituída aproximadamente de 35-70% de proteína, de baixo custo e boa funcionalidade, podendo ser utilizada na indústria de embalagens, alimentos e na produção de materiais biodegradáveis (FALEIRO *et al*., 2001; SHCHEKOLDINA & AIDER, 2012; SALGADO *et al*., 2013; SONG *et al*., 2013).

Sendo um dos principais cultivos do mundo, com 135.872 toneladas de semente de girassol produzidas em 2018, o Brasil ocupou a 24º posição no ranking mundial de produtores dessa cultura (Figura 1), com a Ucrânia (14165170 T), Rússia (12755725 T) e Argentina (3537545 T) sendo os principais produtores mundiais (FAO, 2020).

Figura 1 – Produção mundial de semente de girassol no ano de 2018

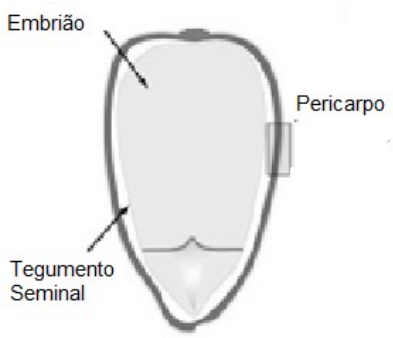


Fonte: Adaptado de FAO, 2020.

A semente de girassol é formada pelo embrião, que representa cerca de 80% do peso da semente e na qual se encontra os cotilédones, local de armazenamento de lipídeos e proteínas utilizados durante a germinação. O embrião é recoberto pelo tegumento seminal (ou episperma) e pelo pericarpo (ou casca) (Figura 2), que representa cerca

de 20-25% do peso seco da semente e é composto basicamente por materiais de natureza lignocelulósica (GONZÁLEZ-PÉREZ, 2003; SALGADO, 2009). As composições químicas médias da semente de girassol completa, semente de girassol descascada e da torta de semente de girassol desengordurada estão dispostas na Tabela 1.

Figura 2 – Esquema do corte transversal de uma semente de girassol



Fonte: Salgado, 2009

Tabela 1 – Composição química (%) média da semente de girassol completa, semente de girassol descascada e torta de semente de girassol desengordurada.

Componente	Semente completa (%)	Semente descascada (%)	TSGD (%)
Proteínas	10 – 27	20 – 40	35 – 70
Lipídeos	35 – 55	47 – 65	0,8 – 1,9
Carboidratos	18 – 26	4 – 10	8 – 12
Fibras	22 – 24	8 – 12	15 – 29
Minerais	2 – 4	3 – 4	5 – 7
Fenólicos	1 – 4,5	0,3 – 3	1,5 – 5,8

Fonte: González-Pérez & Vereijken (2007); Shchekoldina & Aider (2014); Malik *et al*. (2016).

Categorizando a quarta posição no ranking das principais fontes de óleos comestíveis produzidos em 2018 (FAO, 2020), a extração do óleo de girassol constitui na principal utilização das sementes. O óleo é constituído basicamente por ácidos graxos (Tabela 2) e considerado de melhor qualidade, quando comparado com a maioria dos outros óleos vegetais, devido a respectiva cor clara, alta temperatura de fumaça e sabor suave (GONZÁLEZ-PÉREZ & VEREIJKEN, 2007). Os principais componentes saturados deste óleo são os ácidos palmítico e esteárico, seguido por uma grande

proporção de ácidos graxos insaturados, principalmente o oleico e linolênico (MANDARINO, 1992; COELHO *et al*., 2012).

Tabela 2 – Teor percentual médio dos ácidos graxos presentes no óleo de girassol

Ácidos graxos	Teor porcentual (g $100g^{-1}$)
Mirístico (C14:0)	0,5
Palmítico (C16:0)	4,0 – 8,0
Esteárico (C18:0)	2,0 – 6,0
Oleico (C18:1)	25,0 – 40,0
Linoleico (C18:2)	50,0 – 70,0
Linolênico (C18:3)	< 0,1
Araquidônico (C20:1)	0,5 – 2,0
Eicosenóico (C20:1)	< 0,5

Fonte: Adaptado de Mandarino (1992).

Um dos principais subprodutos do processo de extração do óleo das sementes de girassol é a torta desengordurada de semente de girassol (TSGD) (ou farelo de girassol desengordurado), um material heterogêneo composto basicamente de celulose (15–29 g/100 g), lignina (11-13 g/100 g), proteína (35-70 g/100 g) e compostos fenólicos (~4 g/100 g) (LAGUNA *et al*., 2018). Apesar de apresentar um elevado potencial antioxidante, alto valor proteico e relevantes quantidades de aminoácidos essenciais, a TSGD tem baixo valor comercial, principalmente devido à baixa solubilidade da mesma, sendo majoritariamente utilizada como ração animal (GOES *et al*., 2017; MALIK & SAINI, 2018; MELO *et al*., 2020; OLIVEIRA *et al*., 2019). Além desse conhecido uso, estudos com diferentes utilidades para o farelo de girassol estão sendo conduzidos em áreas diversificadas, tais como: ingrediente em produtos de panificação (GRASSO *et al*., 2019; GRASSO *et al*., 2020); substrato para extração de nanocristais de celulose (KASSAB *et al*., 2019); material microencapsulante (NESTERENKO *et al*., 2013); produção de peptídeos bioativos (VELLIQUETTE *et al*., 2020); e extração da proteína de semente de girassol para fabricação de filmes (SALGADO *et al*., 2013; SONG *et al*., 2013).

A partir da TSGD é possível a extração e isolamento da proteína de semente de girassol (PISG), um produto com alto teor proteico (entre 70-90% da composição

química total) que pode ser utilizado pela indústria de alimentos, embalagens e para a produção de biomateriais. Logo, para a obtenção da proteína isolada, é necessário que a TSGD passe por uma série de processos, tais como: lavagem por meio de soluções ácidas e alcóolicas, secagem, extração álcali e precipitação ácida à vácuo (LUSAS, 1985; PÉREZ & VEREIJKEN, 2007; SALGADO *et al*., 2013).

2.2 Proteína de semente de girassol

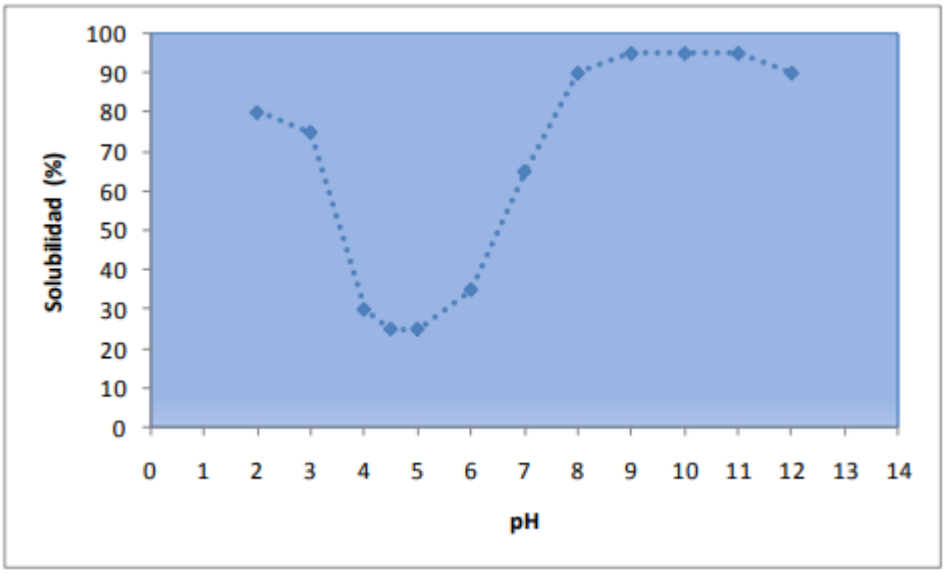
As propriedades funcionais das proteínas, como solubilidade e formação de gel, emulsão e espuma, são determinadas pelo seu tamanho, forma e estrutura das moléculas, distribuição das cargas, flexibilidade molecular, relação hidrofilicidade/hidrofobicidade e sequência dos aminoácidos. Essas propriedades podem ser afetadas pela presença de compostos fenólicos, que podem formar complexos com as proteínas, e pela possível desnaturação proteica oriunda do processo de obtenção do óleo de girassol na indústria, em que se utilizam temperaturas de até 140 ºC, resultando na redução das aplicações industriais destas (PÉREZ & VEREIJKEN, 2007; MEHRYAR *et al*., 2017).

As principais proteínas encontradas na semente de girassol são as globulinas (heliantininas), que constituem entre 40-90% das proteínas, e as albuminas de girassol (principalmente a albumina 2S), que constituem entre 10-30% das proteínas (PÉREZ & VEREIJKEN, 2007). As albuminas são caracterizadas por serem um grupo heterogêneo de proteínas, com tamanhos moleculares que variam entre 10 e 19 kDa (quilodalton), ricas em metionina e cisteína, enquanto as globulinas caracterizam-se por se constituírem de duas frações, *α* e *β,* com tamanhos que variam entre 30 e 40 kDa e entre 21 e 27 kDa, respectivamente (PANTOJA-UCEDA *et al*., 2004; PÉREZ *et al*., 2005).

Geralmente, o processo para a obtenção da proteína isolada de semente de girassol é baseado na solubilidade da proteína em função do pH médio desta (Figura 3), observando-se uma solubilidade máxima em pH ácido e alcalino. No ponto isoelétrico das proteínas (pH ~ 4,5), há uma solubilidade mínima, ocorrendo a diminuição da repulsão eletrostática e promovendo a agregação, sendo possível a posterior obtenção da proteína isolada por extração em meio alcalino, em que há solubilidade

máxima (pH = 9,5 – 11,0). Em geral, esse processo é realizado para favorecer as interações proteína-proteína, evitando interações entre as proteínas e os compostos fenólicos (ORDÓÑEZ *et al*., 2001; SALGADO, 2009; SONG *et al*.,2013; ALEXANDRINO *et al*., 2017).

Figura 3 – Perfil da solubilidade das proteínas em água em função do pH do meio.



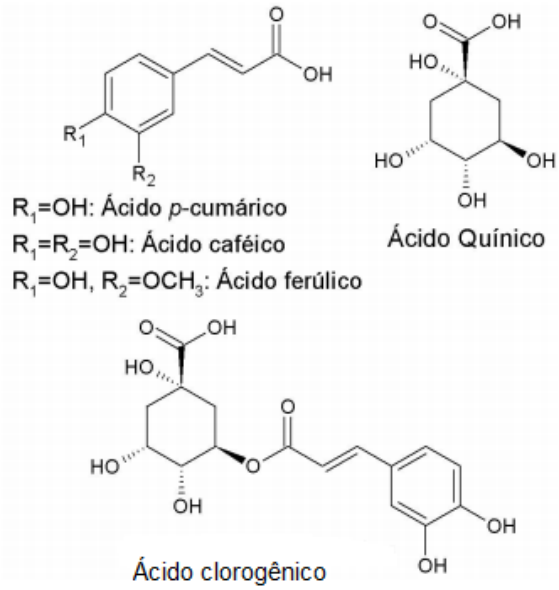
Fonte: Salgado (2009)

A extração e isolamento de proteína, e dos compostos fenólicos ligados a esta, são alguns dos principais interesses nas pesquisas envolvendo a semente de girassol e o farelo de girassol desengordurado (MEHRYAR *et al*., 2017). Os compostos fenólicos estão naturalmente presentes nas sementes de girassol, sendo o ácido clorogênico (5-CQA) o composto mais abundante, representando de 50 a 70% dos fenólicos totais (PÉREZ-GONZÁLEZ, 2003). Os produtos resultantes da hidrólise do 5-CQA também são encontrados na proteína de girassol, sendo estes ácido cafeico, ácido quínico, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico, como demonstrado na Figura 4 (SOARES, 2018).

A proteína de semente de girassol contém elevada quantidade de estruturas de enxofre ligadas à aminoácidos, que são deficientes na maioria das proteínas vegetais, proporcionando um maior valor nutritivo a esse tipo proteico (EGOROV *et al*., 1996; MALIK *et al*., 2017). Além disso, é um material altamente disponível no principal subproduto da indústria de óleo de girassol, a torta de sementes desengordurada, e possui uma enorme gama de aplicações, tais como: bioestimulante para plantas

(UGOLINI *et al*., 2015); produção de nanofibras (SHANESAZZADEH *et al*., 2018); agente encapsulante (SNEHARANI, 2019); e produção de biofilmes para a preservação de alimentos (SALGADO *et al*., 2013; SONG *et al*., 2013).

Figura 4 – Fórmula estrutural do ácido 5-CQA e de seus ácidos componentes



Fonte: Adaptado de Oliveira & Bastos, 2011.

2.3 Hidroxiapatita

A pesquisa acerca da hidroxiapatita, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, alavancou nos últimos anos, principalmente na área biomédica, em que a semelhança das propriedades físicas e químicas desta com a fase mineral dos ossos e tecidos duros do corpo humano originou a busca pelo aprimoramento das características mecânicas e biológicas da mesma, uma vez que a respectiva natureza estrutural permite o uso em implantes e enxertos ósseos, havendo pouca rejeição do tecido hospedeiro (KNUPP *et al*., 2019; GOLDBERG *et al*., 2019; SANS, *et al*., 2019).

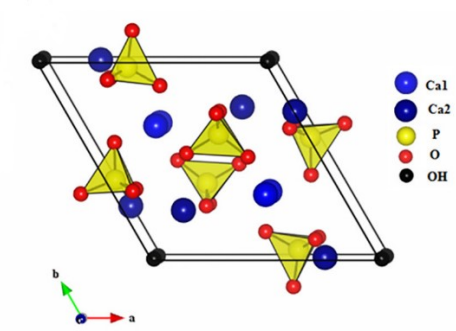
Naturalmente nanocristalina, a hidroxiapatita, (HAp), é um fosfato de cálcio cerâmico pertencente à família das apatitas, podendo ser sintetizada de diferentes resíduos agroindustriais, tais como: conchas de caracóis (ASIMENG *et al*., 2018); cascas de ovos de galinha (SAFATIAN *et al*., 2019); cascas de ovos de avestruz (CALIMAN *et*

al., 2017); e ossos de moluscos (PALLELA *et al*., 2011; KUMAR *et al*., 2020). Por tanto, devido ao alto teor de cálcio, facilidade na obtenção e custos reduzidos no processo da síntese de HAp com base nesses resíduos, estes tornam-se excelentes substratos para a produção do biomaterial (SUNIL & JAGANNATHAM, 2016; TRAKOOLWANNACHAI *et al.,* 2019).

As técnicas comumente utilizadas para a preparação desse mineral são: (i) precipitação química (SUBRAMANIAN *et al*., 2019); (ii) precipitação química com o auxílio de surfactantes (GAO *et al*., 2013); (iii) emulsão (BOSE & SAHA, 2003); e (iv) irradiação com micro-ondas (SAFATIAN *et al*., 2019). Cada uma dessas técnicas apresenta diferentes metodologias, custo e tempo de preparo, resultando em hidroxiapatitas com diferentes morfologias e composições químicas. No entanto, a principal semelhança entre essas técnicas é a necessidade do ajuste da razão estequiométrica entre Ca/P para 1,67, evitando formação de fases CaO em altos teores, o que pode ocasionar diminuição da pureza e alteração nas características do material (HAIDER, 2017).

A estrutura cristalina da HAp (Figura 5) é descrita pela fórmula $Ca(1)_4Ca(2)_6(PO_4)_6(OH)_2$, em que os átomos de cálcio podem ocupar as posições Ca(1) ou Ca(2). Logo, em uma célula unitária de HAp, quatro átomos de cálcio, Ca(2), estão rodeados por nove átomos de oxigênio, provenientes da interação com moléculas de fosfato (PO_4). Portanto, os outros seis átomos de cálcio, Ca(2) estão rodeados por seis átomos de oxigênio, que também são provenientes da interação com moléculas de fosfato (PO_4) e por um ânion OH^- (FIHRI *et al*., 2017).

Figura 5 – Representação esquemática da estrutura cristalina de uma célula unitária de HAp



Fonte: Fihri *et al.* (2017).

Além de não ser tóxico e possuir estabilidade química em meios biológicos, esse mineral vem sendo tratado como um novo tipo de material funcional, pois esse tipo de material é capaz de melhorar interações específicas entre proteínas, contribuindo, portanto, para o aprimoramento de características mecânicas e biológicas de matrizes proteicas (PRAKASAM *et al*., 2015; FAN *et al*., 2019).

As propriedades conferidas por partículas dispersas na matriz polimérica, na produção de biomateriais, são de grande interesse para as indústrias de embalagens de alimentos, uma vez que as características dos diferentes tipos de partículas podem afetar as propriedades dos filmes e da solução filmogênica (KARIMI *et al*., 2020). Logo, a adição de partículas ou nanopartículas na composição de filmes pode influenciar significativamente as propriedades mecânicas, as de barreira a gases e vapor de água e a estabilidade térmica de filmes constituídos por biopolímeros, resultando na preservação dos alimentos embalados por mais tempo (NAGARAJAN *et al.,* 2014).

Uma vez que apresentam extensa área superficial, é relacionada uma atividade superficial alta às nanopartículas, podendo ser utilizadas em aplicações envolvendo transporte de compostos ativos (TORNUK *et al*., 2015; 2018). Em termos de propriedades de barreira, a adição de partículas em matrizes poliméricas estende o caminho e o tempo de difusão dos gases e reduz efetivamente a fração de volume para as moléculas difusas, visto que ocorre uma distribuição das partículas pela matriz dos biomateriais (MÛLLER *et al*., 2017; BUGNICOURT *et al*., 2019). As propriedades mecânicas dos filmes produzidos de soluções filmogênicas adicionadas de partículas também são afetadas, uma vez que os minerais adicionados apresentam algumas propriedades intrínsecas, como alta resistência, tenacidade e resistência a fissuras, podendo levar essas propriedades para os filmes formados (RYSIONA *et al*., 2016).

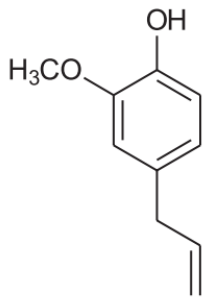
As partículas e nanopartículas de hidroxiapatita apresentam algumas utilizações já registradas, como revestimento de superfícies de materiais com a finalidade de melhorar a bioatividade destes (RAU *et al*., 2013; HAIDER *et al*., 2017; GKOMOZA, 2019); aplicações biomédicas (KUMAR *et al*. 2020; MONDAL *et al*., 2020); odontológicas (GUO *et al*., 2020); e adição das nanopartículas em filmes híbridos (KUMAR *et al*., 2008).

2.4 Óleo essencial de cravo da índia (eugenol)

Os óleos essenciais são constituintes de plantas alimentícias e medicinais, exercendo importantes funções para manutenção das espécies vegetais, como a defesa contra predadores e microrganismos patógenos, atrativo para polinizadores, e efeito de aroma (RAVEN *et al*., 2001). Quimicamente, os óleos essenciais são misturas homogêneas formadas por diferentes compostos orgânicos extremamente voláteis, de baixa massa molecular e diferentes concentrações, tais como: alcoóis, cetonas, aldeídos, ésteres, éters, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, hidrocarbonetos e cumarinas (SILVA *et al*., 2003; MELO, 2005)

O eugenol (4-alil-2metóxifenol), cuja formula estrutural encontra-se representada na Figura 6, é classificado como um óleo essencial, sendo um composto fenólico encontrado na natureza e extraído de diversas plantas aromáticas, como a noz moscada, canela, folha de louro, manjericão, mirra, sassafrás e cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata)*, sendo a última a mais utilizada. O eugenol puro é pouco solúvel em água (por isso os óleos essenciais são nomeados como “óleos”), sendo um líquido incolor, com ponto de ebulição entre 244 e 253 ºC e densidade relativa de 1,066 a 20 ºC (FILHO, 2000; GAZOLLA *et al*., 2018).

Figura 6 – Estrutura do eugenol



Fonte: Gazolla *et al*., 2018

Dentre os compostos fenólicos, o eugenol vem se destacando devido às respectivas atividades biológicas, que impulsionam o seu uso em aplicações comerciais, destacando-se entre elas: atuação como fixador de perfumes ou conservantes; capacidade flavorizante; e ações antibacteriana, antifúngica, antiviral e antioxidante, sendo possível o uso deste em filmes (RAVEN *et al*., 2001; RIBEIRO, 2009).

A incorporação de óleos essenciais nas soluções filmogênicas confere atividades antioxidantes e antimicrobianas adicionais ao material formado. Como o eugenol é um composto fenólico que exibe propriedades ácidas, provenientes do grupo hidroxila, é possível a remoção do átomo de hidrogênio sob forma de próton, gerando um caráter ácido em solução aquosa. Logo, a molécula resultante irá apresentar um par eletrônico deslocado no núcleo aromático, deixando esse anel passível à um ataque eletrofílico, seja de cátions provenientes do meio ou dos compostos da solução, como partículas ou nanopartículas adicionadas ao meio (FILHO, 2000; GIMÉNEZ *et al*., 2012).

O efeito do eugenol como componente integrante de biofilmes vem sendo amplamente estudado: (i) Nassar *et al.* (2017) estudaram as propriedades de biofilmes produzidos a partir de proteína isolada de soja e partículas de Na^+, adicionados de eugenol, e concluíram que a adição de eugenol auxiliou na melhoria das propriedades dos filmes, criando fortes interações entre os componentes, principalmente com as partículas dispersas no meio, contrabalanceando os efeitos negativos da adição das partículas na consistência da solução filmogênica; (ii) Salgado *et al.* (2013) estudaram o potencial do eugenol em filmes produzidos a partir de proteína isolada de semente de girassol, e aplicação destes na preservação de peixes, mostrando que a presença do óleo essencial modificou a interação das proteínas, reduzindo a solubilidade em água, retardando a oxidação lipídica e crescimento de mesófilos totais nas amostras de peixes; (iii) Talón *et al.* (2019) encapsularam o eugenol e adicionaram em filmes de base amilácea, e concluíram que os filmes mostraram uma melhor capacidade antioxidante; e (iv) Sanla-Ead *et al.* (2012) utilizaram o eugenol em filmes com base celulósica e demonstraram a capacidade antimicrobiana que o eugenol trouxe para os filmes, indicando que o eugenol, além de melhorar as propriedades antioxidantes dos filmes, pode auxiliar, também, nas propriedades antimicrobianas quando incorporados à filmes produzidos a partir de biopolímeros.

2.5 Filmes produzidos a partir de biopolímeros (biofilmes)

Polímeros que têm base biológica (biopolímeros), como lipídios, proteínas, polissacarídeos e respectivos compósitos, são utilizados como alternativas aos polímeros não-biodegradáveis empregados na formação de filmes e embalagens de

alimentos (HOSSEINI *et al*., 2015; SESSINI *et al*., 2016). Os biopolímeros têm vantagens em relação aos convencionais: são facilmente recicláveis, biocompatíveis com alimentos, biodegradáveis, proporcionam segurança ambiental e alimentar, reduzem o volume e peso da embalagem, possibilitam a incorporação de agentes antimicrobianos, antioxidantes, edulcorantes, aromatizantes e componentes de diversas colorações, além de serem de baixo custo e abundantes na natureza (OĞUR & ERKAN, 2015; TAVASSOLI-KAFRANI *et al*., 2016).

Os filmes biodegradáveis (biofilmes) são películas de espessuras finas, que têm como base os biopolímeros. Estes são aplicados sobre ou entre os produtos alimentícios e seus componentes, com a finalidade de isolar os alimentos e aumentar a vida útil desses produtos. Além disso, atuam como barreiras semipermeáveis para o oxigênio, dióxido de carbono (CO_2), luz e umidade, e resultam no decréscimo da taxa de oxidação e/ou respiração e da perda de água e odores (MAIA *et al*., 2000; FERREIRA *et al*., 2015; DEHGHANI *et al*., 2017). Também exercem influência no controle do crescimento microbiano e manutenção da integridade física dos alimentos, sendo as suas funções demandadas pelo produto e o tipo de deterioração que esse alimento está submetido (ABUGOCH *et al*., 2016; KAEWPRACHU *et al*., 2016; HASSAN *et al*., 2018; SALAMA *et al*., 2018).

A utilização de compostos como glicerol, água, lipídeos e partículas minerais, para a preparação dos biofilmes, exerce influência nas propriedades mecânicas e de barreira a gases. Com isso, pode-se presumir que as propriedades dos diferentes compostos utilizados resultam em filmes com multicomponentes e diferentes características, derivadas da cooperação das propriedades de cada um dos respectivos elementos (SALGADO *et al*., 2013; SONG *et al*., 2013).

Os filmes formados por biopolímeros, como proteínas e polissacarídeos, apresentam boas propriedades mecânicas e facilidade na formação, porém, há um déficit nas respectivas barreiras contra a umidade, ocasionado pela hidrofilicidade dos mesmos (LIAOTRAKOON & RAVIYAN, 2018). Uma das maneiras de se contornar isso é realizar adição de lipídeos emulsionados, dispersados dentro da matriz proteica, reduzindo a permeabilidade ao vapor de água e ao oxigênio, resultando em filmes com propriedades apropriadas de barreira contra umidade e oxigênio (GALUS &

KADZINSKA, 2016). Abugoch *et al.* (2016) demostraram que a adição de pequenas quantidades de óleo de girassol na matriz de filmes produzidos de proteína isolada de quinoa e quitosana, resultou na diminuição da permeabilidade ao vapor de água, resultado das interações hidrofóbicas que são geradas.

Por outro lado, a incorporação de baixas quantidades de partículas de dimensões nanométricas nos biofilmes reforça os compostos poliméricos, causando alinhamento da nanoestrutura e fortalecimento da interação superficial, podendo resultar em melhores propriedades mecânicas, bem como diminuição da permeabilidade a gases e vapor de água (DE MOURA *et al*., 2009; GIMÉNEZ *et al*., 2012; TÉLLEZ-RANGEL *et al*., 2017).

O interesse nos compostos formadores de filmes de origem proteica é impulsionado pela busca por alternativas naturais aos materiais poliméricos derivados do petróleo e plásticos (HASSAN *et al*., 2018). Desse modo, os filmes de proteína são produzidos a partir de materiais biodegradáveis, como a proteína do soro do leite (BAHRAM *et al*., 2014; GALUS & KADZIŃSKA, 2016), colágeno (FADINI *et al*., 2013; GUZMÁN *et al*., 2015), quinoa (VALENZUELA *et al*., 2013; ABUGOCH *et al*., 2016), trigo (MOJUMDAR *et al*., 2011; ROCCA-SMITH *et al*., 2016) e semente de girassol (SALGADO *et al*., 2011, 2013; SONG *et al*., 2013). O principal mecanismo de formação desses filmes é a desnaturação proteica, seguido pela associação das cadeias peptídicas por meio de novas interações intermoleculares (HASSAN *et al*., 2018). No entanto, fatores como fonte e concentração da proteína, tipos de plastificantes e concentração utilizada, assim como fatores extrínsecos, afetam diretamente as propriedades dos filmes produzidos, devido às diferenças nas estruturas moleculares e nas composições das diferentes proteínas (KAEWPRACHU *et al*., 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais e reagentes

Para a realização dos experimentos foi utilizada proteína isolada de semente de girassol sem ácido clorogênico (PISGa) e proteína isolada de semente de girassol com ácido clorogênico (PISGb), fornecidas pela empresa “Bio Technologies LLC” (República de Altai – Rússia), ambas com aproximadamente 80% de pureza.

As cascas de ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*) e o óleo de semente de girassol foram adquiridos de estabelecimentos comerciais na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Os reagentes utilizados no presente trabalho foram adquiridos da Sigma Aldrich (Jurubatura, São Paulo, Brasil), Neon (Suzano, São Paulo, Brasil) e Synth (Diadema, São Paulo, Brasil). Os reagentes FRAP e ABTS, para a análise de compostos antioxidantes, e o Eugenol, foram obtidos na Sigma-Aldrich (Jurubatuba, São Paulo, Brasil).

3.2 Produção de nanopartículas de hidroxiapatita

3.2.1 Pré-Tratamento das cascas de ovos de galinha

O preparo das amostras foi realizado nos laboratórios do Grupo de Aproveitamento de Resíduos Sólidos do Departamento de Engenharia Mecânica e no Centro de Experimentação no Departamento de Engenharia de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais.

As cascas de ovos de galinha foram inicialmente higienizadas em água corrente. Em seguida foram realizados cinco banhos em água fervente, para a completa remoção de sujidades. Após a higienização, as cascas foram imersas em solução de HCl 0,5 M, dentro de béqueres de 600 mL. Os béqueres foram colocados em incubadora orbital (marca Quimis, modelo Q816M20), sob agitação (160 rpm), por 1 hora a 27 ºC,

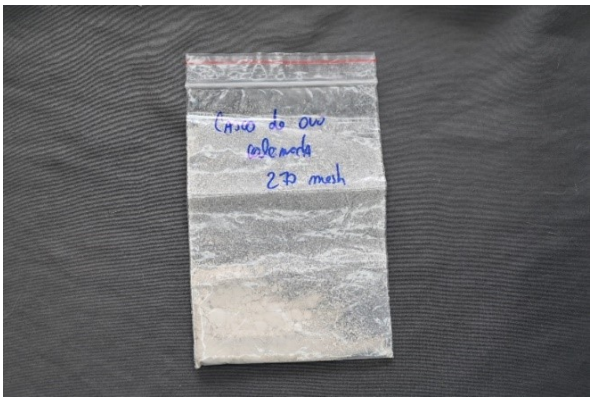
para a completa remoção da membrana interna (SUCHANEK & YOSHIMURA 1998; RIVERA *et al*., 1999; RAHMAN, 2016).

As cascas higienizadas e sem membranas foram secas em estufa com circulação de ar (Nova ética, modelo 420), a 105 ºC por 24 horas, e calcinadas em mufla, a 1000 ºC, por 2 horas, para desproteinização, completa remoção do material biogênico e transformação do carbonato de cálcio em óxido de cálcio (cascas calcinadas) (HUI *et al*., 2010; ADEOGUN *et al*., 2018).

3.2.2 Cominuição das cascas calcinadas

As cascas calcinadas foram cominuídas em moinho de bolas por 24 horas (21 rpm), via úmida, de maneira a reduzir o tamanho das partículas (RAHMAN *et al*., 2016; ADEOGUN *et al*., 2018). O moinho foi enchido de modo que a carga moedora, as cascas de ovos calcinadas e a água destilada ocupassem 40% do máximo do volume. Logo após a moagem, foi realizada a decantação do material por 72 horas, e posterior secagem do precipitado em estufa com circulação de ar (Nova ética, modelo 420) a 105 ºC, por 24 horas, para a obtenção do óxido de cálcio em pó fino (Figura 7).

Figura 7 – Cascas de ovos calcinadas e cominuídas.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

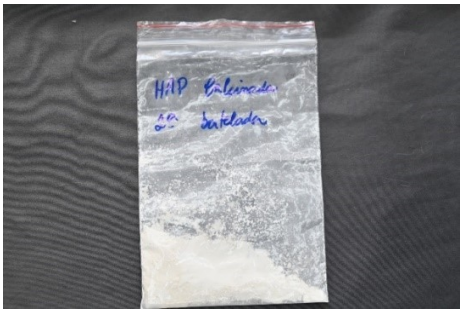
A técnica de precipitação por via úmida se baseia no fato da hidroxiapatita ser o fosfato de cálcio mais estável em temperatura ambiente e pH básico, sendo o método mais simples e de baixo custo para a respectiva síntese. Nessa técnica, ocorre uma reação ácido-base por meio de adição gota a gota de uma solução fosfato em uma suspensão

de hidróxido de cálcio, sob agitação, numa quantidade tal que satisfaça a razão molar estequiométrica de Ca/P igual a 1,67 (AHMED & AHSAN, 2008; SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013; GUNDUZ *et al.*, 2014).

3.2.3 Síntese das nanopartículas de hidroxiapatita

Após a obtenção do óxido de cálcio em pó, foi realizada a síntese da hidroxiapatita por via úmida, segundo metodologias descritas por Adeogun *et al*. (2018) e Chaudhuri *et al*. (2013), com algumas modificações. Foi realizada dissolução de 5,55 gramas de pó de óxido de cálcio em 100 mL de água destilada, com agitação por 30 minutos, para a obtenção de hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$). Após a completa dissolução do pó, 100 mL de solução de di-hidrogenofosfato de amônio 0,45 M ($(NH_4)H_2(PO_4)$) foi adicionada gota a gota, sob agitação contínua, por 1 hora. Então, após completa adição da solução de $(NH_4)H_2(PO_4)$, foi realizado o ajuste do pH para 10 utilizando solução de amônia 30% e a solução permaneceu em agitação por mais 24 horas para que ocorresse a reação. Concluído o tempo, o precipitado formado foi centrifugado por 30 minutos (4000 rpm) e calcinado em mufla a 1000ºC por 2 horas, para a obtenção da hidroxiapatita em pó (Figura 8). Após a calcinação, passou-se as amostras em peneiras de 270 mesh, para homogeneização do tamanho das partículas.

Figura 8 – Hidroxiapatita sintetizada a partir de cascas de ovos de galinha



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

3.3 Preparação dos filmes

A metodologia utilizada para a preparação dos filmes foi baseada na metodologia descrita por Salgado *et al.* (2013), com algumas modificações. As amostras de

proteína isolada de semente de girassol sem ácido clorogênico (PISGa) e de proteína isolada de semente de girassol com ácido clorogênico (PISGb) foram solubilizadas em béqueres de 100 mL, em água destilada, separadamente, na proporção de 5% (m/m). Foi realizado o ajuste do pH para 11, em cada uma das soluções filmogênicas, utilizando uma solução de hidróxido de sódio 2 M. As soluções foram mantidas em agitação por 30 minutos, em temperatura ambiente, com manutenção do pH 11 utilizando uma solução de hidróxido de sódio 0,5 M. Após completa solubilização das proteínas nas soluções, foi realizada a adição da fração lipídica nas soluções filmogênicas, utilizando uma mistura de eugenol e óleo de girassol (30% eugenol e 70% óleo de girassol), na proporção de 5% (m/m) em relação ao peso total da mistura, e as soluções foram mantidas em agitação por 5 minutos. Subsequentemente, adicionou-se glicerol na proporção de 30% (m/m) em relação à quantidade de proteína e as nanopartículas de hidroxiapatita nas proporções de 0,1 e 0,3% (m/m) em relação ao peso total das soluções. O delineamento experimental encontra-se disposto na Tabela 3.

Tabela 3 – Delineamento experimental da preparação dos filmes

Filme	Proteína	Mistura de óleos	Nanopartícula de HAp	Glicerol	Água destilada
A1	5% PISGa	-	-	1,5%	93,5%
A2	5% PISGb	-	-	1,5%	93,5%
B1	5% PISGa	5%	-	1,5%	88,5%
B2	5% PISGb	5%	-	1,5%	88,5%
C1	5% PISGa	5%	0,1%	1,5%	88,4%
C2	5% PISGb	5%	0,1%	1,5%	88,4%
D1	5% PISGa	5%	0,3%	1,5%	88,2%
D2	5% PISGb	5%	0,3%	1,5%	88,2%

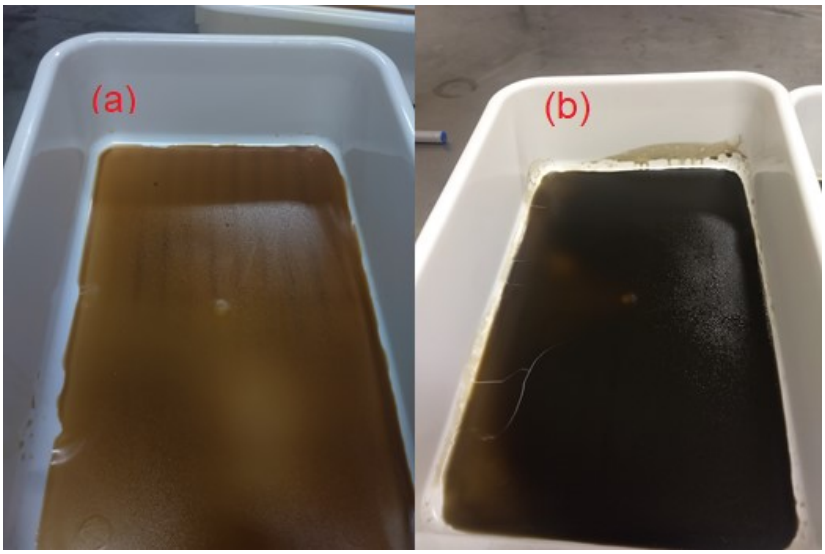
Quantidade (em porcentagem) de material em relação ao peso total da solução filmogênica (o peso total de cada solução foi de 60 gramas).

Logo após a adição de todos os constituintes, os béqueres contendo cada uma das soluções filmogênicas foram cobertos com papel alumínio e as amostras foram submetidas a banho ultrassônico (Unique USC-1650A) por 30 minutos (frequência de 25 kHz, 150 W), para completa remoção das bolhas provenientes da agitação. Após o tratamento em banho ultrassônico, as amostras foram submetidas à

homogeneização em sonicador de ponteira (QR 350 – Ultronique), por 2 minutos a 85 Hz, de maneira a homogeneizar os compostos da solução.

Após a completa homogeneização, foi realizado o preparo do filme segundo o método *casting,* no qual cada uma das soluções foi vertida em uma bandeja lisa de polipropileno, a fim de manter um tamanho e forma padrão, e facilitar a remoção do filme do suporte. As bandejas foram levadas à estufa (Nova ética, modelo 420) com circulação de ar, a 25ºC, por 12 horas, para desidratação da solução filmogênica e formação dos filmes (Figura 9). Após secagem, os filmes foram removidos das bandejas e armazenados em sacos plásticos de polietileno de baixa densidade, tipo zip lock, e mantidos a temperatura ambiente. Todos os filmes foram produzidos com 2 repetições e 2 replicações, totalizando 4 amostras de cada filme.

Figura 9 – Preparo dos filmes: (a) Filme produzido com a PISGa; (b) Filme produzido com a PISGb



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

3.4 Caracterização dos filmes

3.4.1 Análise Colorimétrica

A análise colorimétrica dos filmes foi realizada em colorímetro HunterLab Colorflex 45/0, (tristimulus) com ângulo de observação 10º e luz diurna (padrão iluminante D65), equipado com a escala CIELab. Foram avaliados os parâmetros luminosidade L*,

coordenada a* e coordenada b* (SONG *et al.,* 2013). Foi utilizado um prato branco como padrão, com as coordenadas L* = 93,49, a* = 0,98 e b* = 2,23. Foram analisados 6 diferentes pontos de cada amostra, sendo o experimento realizado em quadruplicata para cada filme.

3.4.2 Análise do teor de umidade dos filmes

O teor de umidade (MC) dos filmes foi determinado segundo o método padrão D644-99 (ASTM, 2014). Para a execução da análise, foi realizada a identificação e secagem de placas Petri em estufa com circulação de ar (Nova ética, modelo 420), a 105 ºC, por 2 horas, com posterior acondicionamento das placas em dessecador até atingirem a temperatura ambiente, sendo, então, pesadas. Posteriormente, foi depositado aproximadamente 0,1 grama de cada um dos filmes nas placas, que foram colocadas em estufa com circulação de ar a 105 ºC por 24 horas. Então o valor da umidade dos filmes foi determinado em quadruplicada e o cálculo foi realizado como o percentual de massa perdida do peso original, segundo a equação:

$$MC = \frac{m_0 - m_f}{m_o} \times 100 \quad (1)$$

em que m_0 é a massa da amostra inicial (g) e m_f é a massa da amostra final (g).

3.4.3 Análise de solubilidade dos filmes em água

A solubilidade dos filmes em água (SFA) foi determinada segundo método descrito por Salgado *et al.* (2013), com modificações. Pequenos pedaços de cada uma das amostras com pesos entre 0,2 e 0,6 gramas, e diâmetro aproximado de 0,2 cm, foram colocados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, e então realizada a adição de 50 mL de água destilada. Os frascos foram selados e colocados sob agitação em mesa agitadora, a 70 rpm, por 24 horas à temperatura ambiente. Após agitação, as soluções foram filtradas através de filtros de papel Nº 0 (previamente secos e pesados) para a recuperação do material não dissolvido. Os filtros com o material foram secos em estufa com circulação de ar (Nova ética, modelo 420), a 105 ºC, por 24 horas, com posterior acondicionamento em dessecador até atingirem a temperatura ambiente,

sendo, então, pesados. Então o valor da solubilidade dos filmes em água foi calculado segundo a equação:

$$SFA = \frac{[m_1 - m_2]}{m_1} \times 100 \quad (2)$$

em que m_1 é a massa inicial do filme (g) e m_2 é a massa final do filme (g).

3.4.4 Análise da capacidade antioxidante dos filmes

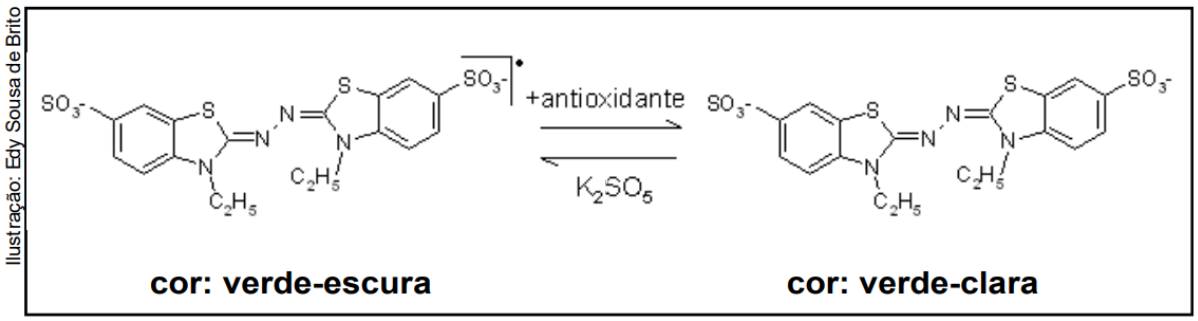
Para determinar a capacidade antioxidante total dos filmes foram utilizadas duas análises de remoção de radicais livres, o método de captura do radical ABTS e o método de redução do ferro (FRAP).

O preparo das soluções para a realização das análises foi feito segundo método descrito por Cao *et al.* (2018), em que porções circulares de cada um dos filmes (0,1 grama, com área aproximada de 4 cm^2) foram inseridas em tubos de ensaio de 50 mL, encamisados com papel alumínio e previamente identificados. Completou-se cada um dos tubos com 9,9 mL de água destilada e os tubos foram colocados sob agitação em incubadora orbital (marca Quimis, modelo Q816M20), por 1 hora a 27ºC. Realizou-se centrifugação dos tubos, por 20 minutos, para a separação do material não-dissolvido, e o material dissolvido (sobrenadante) foi recolhido para análise e mantido sob refrigeração à -18ºC até o respectivo uso.

3.4.4.1 Método de Captura do Radical ABTS

A análise se dá de forma que inicialmente o ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) seja oxidado na presença de persulfato de potássio, com produção do cátion radical $ABTS^{\bullet+}$. Em seguida, o radical é novamente reduzido para ABTS, induzido por substâncias antioxidantes doadoras de hidrogênio, gerando diminuição dos valores de absorbância, com posterior descoloração da solução, sendo que, quanto maior a atividade antioxidante, maior a descoloração (Figura 10). A absorbância é medida em 734 nm. A concentração de antioxidantes, bem como a duração da reação, influencia na resposta do teste (HALLIWELL & WISEMAN, 1996; RUFINO *et al*., 2007a).

Figura 10 – Estabilização do radical $ABTS^{\bullet+}$ por um antioxidante e subsequente formação do ABTS pelo persulfato de potássio



Fonte: Rufino *et al.* (2007a)

A análise foi realizada segundo o método descrito por Gómez-Estaca *et al.* (2009). O preparo do radical $ABTS^{\bullet+}$ foi realizado em um balão volumétrico de 10 mL, adicionando 88 µL da solução de persulfato de potássio em 5 mL da solução ABTS. O balão foi encamisado com papel alumínio e a solução foi mantida em repouso e na ausência de luz por 16 horas. A solução foi padronizada antes da utilização da mesma, com diluição em álcool etílico até atingir uma absorbância de 0,9 ± 0,05 a 734 nm.

Em seguida, foi realizado o preparo da solução Trolox 2mM, dissolvendo 25 mg de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametacromano-ácido 2-carboxílico) em álcool etílico, e completando o volume com álcool etílico em um balão volumétrico de 50 mL. A solução foi homogeneizada e o balão foi encamisado com papel alumínio e mantido em local escuro, sendo utilizado no mesmo dia.

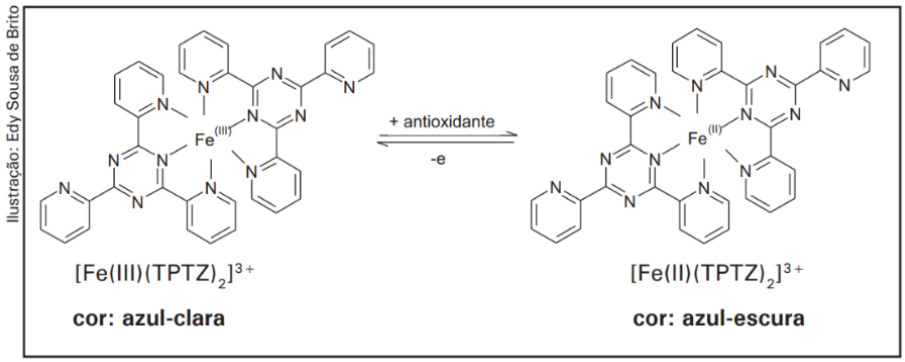
As soluções dos filmes (60 µL) foram, então, misturadas com 2940 µL da solução ABTS em tubos Falcon encamisados com papel alumínio e os tubos foram homogeneizados em agitador Vortex e a leitura de absorbância foi realizada após 6 minutos da mistura. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro (AJX 1900, Micronal) a 734 nm, sendo que a calibração do equipamento foi realizada utilizando o álcool etílico como branco. Todas as análises foram feitas em triplicata. A partir das absorbâncias encontradas em cada uma das diluições foi realizada a plotagem de um gráfico no Excel para cada amostra, em que se posicionou a absorbância (a 734 nm) no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X. Foi determinada a equação da reta para cada uma das amostras, e a Atividade

Antioxidante Total (AAT) foi definida por meio da plotagem de uma curva-padrão com Trolox. Todos os resultados encontrados foram expressos em mg Trolox/g de filme.

3.4.4.2 Método de redução do ferro (FRAP)

A metodologia de análise de redução do ferro (Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP) tem como base a redução do Fe (III) do composto TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) em Fe(II). Na presença do oxidante, ocorre a redução do ferro presente, dando origem ao $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{3+}$, de coloração azul-escura, como mostrado na Figura 11 (Rufino *et al*., 2007B). O preparo da solução FRAP foi feito utilizando 2,5 mL de solução de TPTZ 10 mM, 2,5 mL de uma solução de $FeCl_3$ e 25 mL de tampão acetato 0,3 M e a solução foi utilizada logo após o preparo. A análise foi realizada segundo os métodos descritos por Gómez-Estaca *et al.* (2009) e Rufino *et al*. (2007b).

Figura 11 – Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+}.



Fonte: Rufino *et al*. (2007b)

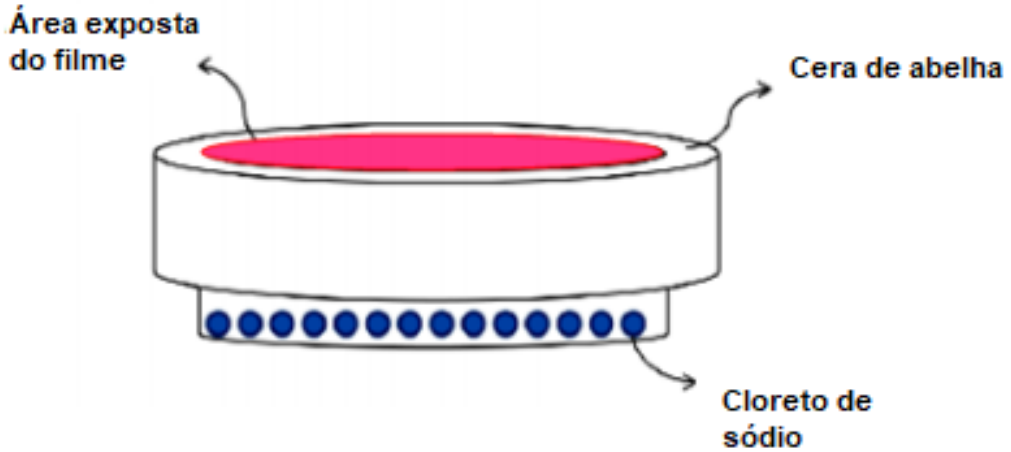
Para o preparo das diluições (4 para cada amostra) dos extratos dos filmes, foram utilizados tubos Falcon de 15 mL, encamisados com papel alumínio para proteção contra a luz. Realizou-se a transferência de 90 µL de cada uma das soluções dos filmes para os tubos Falcon, seguido da adição de 270 µL de água destilada e 2,7 mL da solução FRAP. Logo após, foi realizada homogeneização dos tubos em agitador Vortex, seguido da manutenção dos tubos a aproximadamente 37 ºC por 30 minutos, utilizando um banho-maria. Subsequentemente, a leitura da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro (AJX 1900, Micronal) a 595 nm, com a calibração do equipamento sendo realizada utilizando o reagente FRAP como branco. Todas as análises foram feitas em triplicata.

Com base nas absorbâncias medidas para cada uma das diluições, foi realizada a plotagem de um gráfico no Excel para cada amostra, posicionando-se a absorbância (a 595 nm) no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X. Foi determinada a equação da reta para cada uma das amostras e a atividade antioxidante total (AAT) foi definida por meio da plotagem de uma curva-padrão com Fe_2SO_4. Os resultados encontrados foram expressos em mM Fe_2SO_4/g de filme.

3.4.5 Análise da permeabilidade dos filmes ao vapor de água

A análise da permeabilidade dos filmes ao vapor de água foi realizada segundo a norma E96–15 (ASTM, 2015), utilizando o método dessecante adaptado, para o qual foi realizado o acoplamento dos filmes, com cera de abelha, em módulos circulares de vidro, contendo em seu interior uma fina camada de aproximadamente 0,2 mm de cloreto de cálcio seco, como representado na Figura 12. O uso da cera de abelha foi necessário em função da necessidade de vedação do sistema e da manutenção da umidade relativa em 75% para a realização dessa análise.

Figura 12 – Representação esquemática do acoplamento do filme na cápsula de vidro



Fonte: Adaptado de Arenas (2012).

Os conjuntos foram pesados e transferidos para dessecadores contendo uma solução saturada de cloreto de sódio (Figura 13) e a temperatura do local onde o experimento foi realizado foi mantida em 21 ºC, sendo determinado o intervalo de 30 minutos entre cada uma das pesagens.

Após 5 horas de experimento foi possível determinar a taxa de transmissão do vapor de água (TTVA) e a permeabilidade dos filmes ao vapor de água (PVA), pois não estava sendo observada mudança nos pesos aferidos. A TTVA e a PVA foram determinadas empregando as seguintes equações:

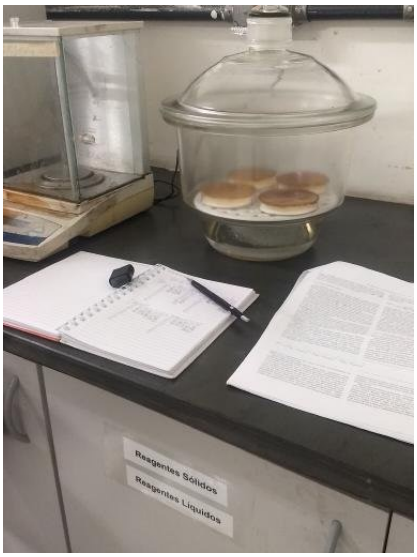
$$TTVA = \frac{G}{t \times A} \quad (3)$$

em que G/t é o coeficiente angular da reta de ganho de massa (g) x tempo (h) e A é a área designada para cada filme.

$$PVA = \frac{TTVA \times e}{P_{sat}(UR_1 - UR_2)} \quad (4)$$

em que *e* representa a espessura média dos filmes (mm), P_{sat} é a pressão de saturação do vapor de água (kPa) à temperatura de ensaio (21 ºC) e (UR_1 – UR_2) representa a diferença entre as umidades relativas do interior do sistema filme-módulo e a umidade relativa no interior do dessecador.

Figura 13 – Análise da permeabilidade dos filmes ao vapor de água



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

3.4.6 Análise das propriedades mecânicas

A análise das propriedades mecânicas foi realizada em acordo com a norma ASTM D882-12 (ASTM, 2012). Foi utilizado um analisador de textura modelo TAXT2i (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido) com célula de carga 25 N e velocidade de separação das garras de 10 mm min^{-1}. Os ensaios foram realizados no Setor de

Operações, Processos e Tecnologia (SOPT) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Para a realização dos ensaios, foram utilizados 6 corpos de prova de cada filme, cujas dimensões foram determinadas em aproximadamente 10 × 2,5 cm.

A espessura dos filmes foi medida utilizando um micrômetro digital Digimess (Outside Micrometer, São Paulo), executando-se quatro medições em pontos distintos em cada corpo de prova. As dimensões (largura e comprimento) dos corpos de prova foram aferidas utilizando um escalímetro.

3.5 Caracterização da Hidroxiapatita

3.5.1 Difração de Raio-x (DRX)

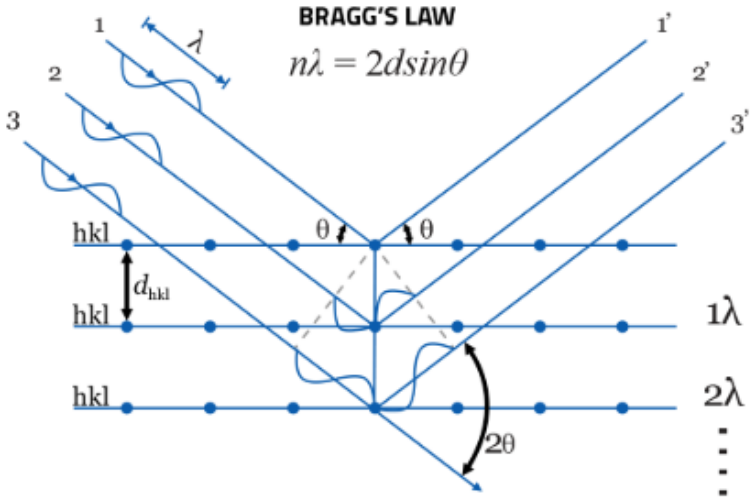
Para a análise da cristalinidade da HAp, foi realizada a difração de raios X (DRX), que consiste em uma técnica utilizada para identificar e quantificar as diferentes fases que estão presentes no mineral, bem como informações sobre tamanhos de cristais (LONDOÑO-RESTREPO *et al.,* 2019). De acordo com Newman & Byrn (2003), esse tipo de análise pode ser utilizado tanto quantitativa quanto qualitativamente. A análise é feita na amostra *in natura* e sem variação de temperatura ou umidade, sendo essa uma medida direta da forma cristalina do material, em que os elétrons ao redor dos átomos difratam os raios-X, como representado na Figura 14 e descrito pela equação de Bragg:

$$n\lambda = 2d\mathrm{sen}\theta \quad (5)$$

em que *n* representa os múltiplos inteiros de do comprimento de onda da radiação incidente (λ), *d* representa o espaçamento entre dois planos de rede adjacentes do cristal e o ângulo θ é o ângulo de Bragg.

O difratograma é a representação desse tipo de análise sob a forma gráfica, em que as variáveis são o ângulo 2θ (eixo horizontal) versus a intensidade dos picos difratados (eixo vertical). A produção dos picos do difratograma ocorre quando, para um dado valor de θ, há espaçamento entre dois planos atômicos de rede adjacentes do cristal (d) que satisfaça a lei de Bragg. Os picos do difratograma apresentam alturas diretamente proporcionais às intensidades dos efeitos da difração (IGC-UFMG, 2020).

Figura 14 – Difração de raios X por um cristal



Fonte: Veqter (2020)

Os tamanhos de partículas e fases cristalográficas da amostra de HAp foram analisados por difração de raios X, em difratômetro Panalytical (modelo Empyrean), utilizando o software High Score Plus (versão 4.9), no Laboratório de Raios X do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal de Minas Gerais, com tubo de radiação CuKα = 1,5406 Å. Os padrões utilizados foram registrados na faixa 2θ de 10 a 60°, e velocidade de varredura de 0,02. Os tamanhos dos cristais foram estimados pelo software High Score Plus, utilizando a seguinte equação (ADEOGUN *et al.,* 2018):

$$D = \frac{k\lambda}{\beta cos\theta} \quad (6)$$

em que D é o valor médio do tamanho do cristal, k é o fator de forma adimensional (0,94), λ é o comprimento de onda de emissão de raios-X (Cu, Kα = 1,5406 Å), β é a linha que se amplia pela metade do máximo (radianos) e θ é o ângulo de Bragg.

3.5.2 Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de transmissão

A avaliação da estrutura morfológica e do tamanho das partículas da amostra de hidroxiapatita foi realizada de acordo com a metodologia adotada por Adeogun *et al.* (2018). Para isso, foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Transmissão (Tecnai G2-20 - FEI SuperTwin 200 kV) do Centro de Microscopia da Universidade Federal de

Minas Gerais. A amostra foi dispersa em acetona para a realização da leitura e as imagens foram registradas utilizando o programa ImageJ (versão 1.8.0_172).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos filmes

Para a caracterização dos filmes, foram realizadas as análises: colorimétrica, análise de umidade, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor de água, análise da capacidade antioxidante (ABTS e FRAP) e análise de propriedades mecânicas de tração. A caracterização centesimal das proteínas (PISGa e PISGb) foi realizada pela empresa fornecedora da matéria-prima, “Bio Technologies LLC” (República de Altai – Rússia), e o laudo encontra-se disponível no Anexo 1. Também foram fornecidos pela empresa os laudos microbiológicos e de quantidade de pesticidas e herbicidas totais, atestando que as proteínas são propícias ao consumo humano (Anexo 2).

4.1.1 Análise colorimétrica dos filmes

Os resultados das análises colorimétricas dos filmes (expressos em cores por meio de valores numéricos) estão representados nas Tabelas 4 e 5. Ao analisar a coordenada L* (sendo que, quanto maior for o valor de L*, mais claro é o material), foi observado que os filmes produzidos com a proteína isolada de semente de girassol sem ácido clorogênico (PISGa) aparentam possuir colorações mais claras do que os filmes produzidos com a proteína isolada de semente de girassol com ácido clorogênico (PISGb), fato visualizado nos filmes (Figuras 15a e 15b). No entanto, valores elevados de L* também foram encontrados por Mehryar *et al.* (2017) quando retiraram compostos fenólicos da proteína isolada de semente de girassol, encontrando, também, filmes com maiores valores de L* ao utilizar essa proteína desfenolizada.

Ao analisar os resultados colorimétricos para os filmes produzidos com a PISGa, observa-se que a adição das partículas de hidroxiapatita influenciou a luminosidade dos filmes, uma vez que os valores encontrados para os filmes C1 (29,78 ± 1,23) e D1 (29,01 ± 0,87) diferiram dos valores para os filmes A1 (19,32 ± 0,07) e B1 (23,82 ± 0,25). Por outro lado, ao realizar as análises dos resultados para os filmes produzidos com a PISGb, observa-se que a luminosidade foi afetada tanto pela adição das nanopartículas, bem como pela adição do óleo, com os valores determinados para

a amostra A2 (2,89 ± 0,15) diferenciando-se dos demais resultados. Em ambos os casos, as amostras de filmes contendo apenas proteína (PISGa e PISGb) e o glicerol (A1 e A2) resultaram em filmes com menor luminosidade, pressupondo-se uma menor interação entre os compostos e maior reflexão da luz, supostamente ocasionada pela não adição do óleo e das partículas.

Tabela 4 – Resultado dos parâmetros de cor L*, a* e b* dos filmes produzidos com a PISGa

Filmes com PISGa	L*	a*	b*
A1	19,32 ± 0,07^{a}	2,32 ± 0,47^{a}	8,74 ± 0,52^{a}
B1	23,82 ± 0,25^{a}	5,28 ± 0,66^{b}	18,29 ± 0,29^{b}
C1	29,78 ± 1,23^{b}	5,96 ± 0,25^{b}	17,25 ± 1,20^{b}
D1	29,01 ± 0,87^{b}	8,97 ± 1,01^{c}	24,19 ± 0,85^{c}

Valores médios ± desvio padrão (n=4).
Médias com letras diferentes em uma mesma coluna indicam que os valores apresentam diferença significativa entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).
A1: Filme produzido com a proteína de girassol sem ácido clorogênico. B1: Filme produzido com a proteína de girassol sem ácido clorogênico, óleo de semente de girassol e eugenol. C1: Filme produzido com a proteína de girassol sem ácido clorogênico, óleo de semente de girassol, eugenol e hidroxiapatita na concentração 0,1% (m/m). D1: Filme produzido com a proteína de girassol sem ácido clorogênico, óleo de semente de girassol, eugenol e hidroxiapatita na concentração 0,3% (m/m).

Tabela 5 – Resultado dos parâmetros de cor L*, a* e b* dos filmes produzidos com a PISGb

Filmes com PISGb	L*	a*	b*
A2	2,89 ± 0,15^{a}	0,47 ± 0,12^{a}	0,67 ± 0,16^{a}
B2	8,16 ± 0,43^{b}	0,72 ± 0,14^{a}	2,86 ± 0,1^{b}
C2	10,23 ± 0,43^{b}	0,76 ± 0,19^{a}	2,60 ± 0,40^{b}
D2	9,32 ± 0,20^{b}	0,93 ± 0,23^{a}	2,82 ± 0,23^{b}

Valores médios ± desvio padrão (n=4).
Médias com letras diferentes em uma mesma coluna indicam que os valores apresentam diferença significativa entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).
A2: Filme produzido com a proteína de girassol com ácido clorogênico. B2: Filme produzido com a proteína de girassol com ácido clorogênico, óleo de semente de girassol e eugenol. C2: Filme produzido com a proteína de girassol com ácido clorogênico, óleo de semente de girassol, eugenol e hidroxiapatita na concentração 0,1% (m/m). D2: Filme produzido com a proteína de girassol com ácido clorogênico, óleo de semente de girassol, eugenol e hidroxiapatita na concentração 0,3% (m/m).

Analisando a coordenada a* (vermelho/verde), em que +a indica uma coloração vermelha e -a indica uma coloração verde, observa-se que os valores encontrados para essa coordenada aparentemente são maiores que nos filmes produzidos com a PISGa, quando comparados com os filmes produzidos com a PISGb. Ao realizar a

análise da Figura 15 percebe-se que as cores dos filmes produzidos com a PISGa tendem para uma cor mais amarelada, enquanto os filmes produzidos com a PISGb tendem para uma cor mais preto/esverdeada. De outra forma, ao analisar a coordenada b* (amarelo/azul), em que +b indica amarelo e –b indica azul, observa-se que os valores nos filmes produzidos com a PISGa tendem a ficar mais altos (mais amarelos) com adição de compostos (óleo e partículas), devido à coloração amarela do eugenol e do óleo de semente de girassol, enquanto os filmes produzidos com PISGb apresentaram valores próximos do centro cartesiano, o que indica uma coloração mais escura, fato que pode ser explicado devido à presença de ácido clorogênico ligado às proteínas, composto responsável pela coloração escura das proteínas de semente de girassol (GONZÁLEZ-PEREZ & VEREIJKEN, 2007).

As diferenças nas estruturas químicas dos polímeros podem afetar as cores dos filmes produzidos, principalmente quando há presença de compostos fenólicos (KAEWPRACHU *et al.,* 2018). Logo, supõe-se que a presença de ácido clorogênico nas proteínas analisadas tende a ser um fator decisivo no resultado das análises colorimétricas dos filmes, com os filmes produzidos com PISGb tendendo a uma cor escura e esverdeada e com os filmes produzidos com a PISGa tendendo a uma coloração mais clara e amarelada. Estas tendências são decorrentes das colorações das proteínas em pó (Figura 16), em que a PISGa apresentava-se originalmente como um pó de cor mais clara (amarelada), enquanto a PISGb apresentava-se originalmente como um pó de coloração mais escura, esverdeada.

Figura 15 – Proteínas PISGa (a) e PISGb (b) em pó, na embalagem do fabricante.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O uso da PISGb pode ser um fator limitante em aplicações alimentícias, devido ao fato da respectiva coloração mais escura. Uma vez que as propriedades óticas e as

diferenças nas cores entre os filmes produzidos são fatores importantes na escolha destes pelas indústrias de alimentos e aceitabilidade dos consumidores, a aplicação industrial dos filmes depende, dentre outros fatores, da coloração característica dos mesmos (SHCHEKOLDINA & AIDER, 2012; LEE & SONG, 2015; GALUS, 2018).

4.1.2 Análises de umidade e solubilidade dos filmes em água

Os resultados das análises de umidade e de solubilidade em água dos filmes produzidos com a PISGa e PISGb estão dispostos nas Tabelas 6 e 7. Observa-se que a umidade relativa e a solubilidade em água são maiores nos filmes controles A1 e A2, que contêm apenas proteína e glicerol na composição. No entanto, ao realizar a adição do óleo e do eugenol na composição dos filmes, observa-se um decréscimo na umidade relativa, bem como na solubilidade em água, para ambas as proteínas, fato esse que pode ser atribuído à emulsão gerada entre proteína, óleo, eugenol, partículas de hidroxiapatita e moléculas de água, que possivelmente originou interações entre as proteínas e esses compostos, fortalecendo a rede proteica durante a formação do filme e dificultando a saída da água da matriz. Salgado *et al.* (2013) também reportaram decréscimo da solubilidade em água nos filmes incorporados com eugenol. Riveros *et al.* (2018) realizaram um trabalho utilizando proteína vegetal e óleo de girassol e encontraram valores próximos de umidade relativa (21,63 ± 0,35 %). Pode-se concluir, portanto, que as proteínas se mostraram eficientes emulsificantes, e a geração de interações entre proteína e óleo nos filmes pode ter contribuído para o aumento da capacidade de retenção de água, favorecendo a diminuição da solubilidade e da umidade relativa nos filmes analisados (XU *et al.,* 2020).

Tabela 6 – Análise de umidade e solubilidade em água dos filmes produzidos com a PISGa

Filmes	Umidade Relativa (%)	Solubilidade em água (%)
A1	20,90 ± 0,85 [a]	92,32 ± 2,07 [a]
B1	17,12 ± 1,09 [b]	83,41 ± 3,23[b]
C1	15,27 ± 0,98 [b]	82,32 ± 4,21[b]
D1	15,77 ± 1,02 [b]	82,69 ± 4,32[b]

Valores médios ± desvio padrão (n=4).
Médias com letras diferentes em uma mesma coluna indicam que os valores apresentam diferença significativa entre si pelo Teste de Tukey ($p<0,05$).

Tabela 7 – Análise de umidade e solubilidade em água dos filmes produzidos com a PISGb

Filmes	Umidade Relativa (%)	Solubilidade em água (%)
A2	21,90 ± 0,89[a]	83,56 ±3,24 [a]
B2	17,41 ± 1,00[b]	76,48 ± 2,12[b]
C2	15,85 ± 0,56[b]	72,22 ± 5,18 [b]
D2	16,30 ± 0,23[b]	70,91 ± 4,71[b]

Valores médios ± desvio padrão (n=4).
Médias com letras diferentes em uma mesma coluna indicam que os valores apresentam diferença significativa entre si pelo Teste de Tukey ($p<0,05$).

Variações na estabilidade e modificação nas propriedades organolépticas da proteína foram reportadas por Sastry & Rao (1990), indicando que o ácido clorogênico (5-ACQ) estabelece pontes de hidrogênio com a parte proteica globular 11S, o que diminui a qualidade da proteína, resultando em uma provável redução da solubilidade da proteína de girassol. Com isso, o alto teor de ácido clorogênico (5-CQA) e a presença dos ácidos cafeico e quínico ligados à proteína isolada de semente de girassol podem resultar no decréscimo da solubilidade desta, ao estabelecer ligações covalentes com a proteína (GONZÁLEZ-PEREZ & VEREIJKEN, 2007). Desta forma, como os resultados encontrados para a solubilidade dos filmes produzidos de PISGa (Tabela 6) aparentemente foram superiores aos encontrados para análise dos filmes produzidos de PISGb (Tabela 7), podemos supor que a presença do ácido clorogênico interferiu negativamente na solubilidade dos filmes produzidos com a PISGb. No entanto, não houve diferença significativa nos valores de umidade relativa e solubilidade em água para os filmes adicionados apenas de óleo e eugenol (B1 e B2) e para os filmes adicionados de óleo, eugenol e partículas de hidroxiapatita (C1, C2, D1 e D2), quando comparados com filmes produzidos com o mesmo tipo de proteína, o que leva a crer que a adição de hidroxiapatita, nas concentrações de 0,1 e 0,3% (m/m) não interferiu nessas características nos filmes analisados.

4.1.3 Análise da permeabilidade dos filmes ao vapor de água

A análise da permeabilidade dos filmes ao vapor d'água (PVA) é uma das características mais pesquisadas em estudos envolvendo filmes, pois é de relevância em reações deteriorativas em alimentos (ARENAS, 2012; DAUDT, 2016). Em geral, a adição de lipídeos emulsionados em soluções filmogênicas de base polimérica

proteica trazem benefícios às características dos filmes formados, pois os filmes produzidos apenas com proteína apresentam alta PVA, enquanto os filmes produzidos somente com lipídeos apresentam propriedades mecânicas fracas (OĞUR & ERKAN, 2015; ABUGOCH *et al*., 2016). Com base nisso, observa-se que a adição de lipídeos emulsionados, em soluções filmogênicas de base proteica, ocasiona na diminuição da PVA dos filmes formados, sendo estes detentores de boas características mecânicas, além de serem de fácil preparação (GALUS & KADZINSKA, 2015; HASSAN *et al*., 2018).

Pela análise dos dados encontrados para a permeabilidade ao vapor de água, dispostos nas Tabelas 8 e 9, percebe-se que a adição do óleo de girassol e do eugenol nos filmes B1, B2, C1, C2, D1 e D2 acarretaram significativa diminuição da permeabilidade ao vapor de água, quando comparados com os filmes controle sem adição de qualquer material lipídico (A1 e A2). No entanto, não foram encontradas diferenças entre os resultados dos filmes produzidos apenas com a PISGa e PISGb (A1 e A2), permitindo inferir que o ácido clorogênico presente na PISGb não interfere na PVA dos filmes produzidos. Também não foram encontradas diferenças significativas entre os filmes produzidos com a hidroxiapatita, tanto com a PISGa (C1 e D1) quanto com a PISGb (C2 e D2), quando comparados com os filmes produzidos apenas com óleo, glicerol e proteína (B1 e B2), resultando então, na suposição de que a adição de HAp nos filmes, nas concentrações de 0,1 e 0,3% (m/m), não interferiu na PVA dos filmes produzidos.

Tabela 8 – Análise da Permeabilidade ao vapor d'água dos filmes produzidos com a PISGa

Filmes	Espessura (μm)	PVA (10^{-10} gH_2O /Pa.m.s)
A1	102 ± 17^{a}	37,42 ± 2,51^{a}
B1	171 ± 26^{b}	2,47± 0,25^{b}
C1	151 ± 18^{a,b}	2,42 ± 0,66^{b}
D1	179 ±28^{b}	2,47 ± 0,53^{b}

Valores médios ± desvio padrão (n=3).
Médias com letras diferentes em uma mesma coluna indicam que os valores apresentam diferença significativa entre si pelo Teste de Tukey ($p<0,05$).

Tabela 9 – Análise da Permeabilidade ao vapor d'água dos filmes produzidos Com a PISGb

Filmes	Espessura (μm)	PVA (10^{-10} gH_2O / Pa.m.s)
A2	70 ± 6[a]	28,31 ± 1,23[a]
B2	153 ± 16[b]	3,76 ± 0,29[b]
C2	177 ± 31[b]	3,71 ± 0,68[b]
D2	202 ± 35[b]	2,23 ± 0,44[b]

Valores médios ± desvio padrão (n=4).
Médias com letras diferentes em uma mesma coluna indicam que os valores apresentam diferença significativa entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

Os filmes preparados com as proteínas de girassol (PISGa e PISGb), que continham adição de óleo de girassol e eugenol (B1, C1, D1, B2, C2 e D2) apresentaram barreiras ao vapor de água satisfatórias, com valores de PVA menores que os de filmes produzidos pelos autores Tahsiri *et al*. (2019) com proteína isolada de amêndoas (170,05 ± 7,42×10^{-10} $gH_2O.Pa^{-1}.m^{-1}.s^{-1}$), e superiores aos valores dos filmes produzidos por Silva *et al*. (2018) com gelatina de peixe biodegradável incorporados com óleo de buriti (0,38×10^{-10} $gH_2O.Pa^{-1}.m^{-1}.s^{-1}$). Valores de PVA encontrados neste trabalho foram similares àqueles obtidos por Galus (2018) (3,62 ± 0,1×10^{-10} $gH_2O.Pa^{-1}.m^{-1}.s^{-1}$) em filmes produzidos com proteína de soja e óleo de colza, e por Kouravand *et al.* (2018) (3,49 ± 0,5×10^{-10} $gH_2O.Pa^{-1}.m^{-1}.s^{-1}$) em filmes produzidos de proteína de soro de leite incorporados com óleo essencial de satureja.

4.1.4 Análise da capacidade antioxidante dos filmes

A capacidade antioxidante dos filmes foi avaliada utilizando o método de captura do radical ABTS e pelo método de redução do ferro (FRAP). Os resultados estão dispostos nas Tabelas 10 e 11.

Com base nos resultados das Tabelas 10 e 11, é possível observar que o filme contendo apenas a PISGa e glicerol (A1) demonstrou baixa capacidade antioxidante, tanto pelo método ABTS (38,04 ± 5,83 mg Trolox/g), quanto pelo método FRAP (145,35 ± 0,90 mM Fe_2SO_4/g). Esse resultado provavelmente advém da pequena quantidade de ácido clorogênico na PISGa, residual do processo de extração do 5-CQA ligado à proteína, o que limita a capacidade antioxidante desse filme. No entanto, quando comparados os resultados do filme A2 e A1, nota-se que o filme preparado

com PISGb, que contém ácido clorogênico ligado à proteína, apresentou capacidade antioxidante (ABTS: 167,37 ± 5,87 mg/g e FRAP: 495,9 ± 30,08 mM Fe_2SO_4/g) maior que a do filme produzido com a PISGa (ABTS: 38,04 ± 5,83 mg/g e FRAP: 145,35 ± 0,90 mM Fe_2SO_4/g).

Tabela 10 – Análise da capacidade antioxidante dos filmes produzidos com a PISGa

Filmes	ABTS (mgTrolox/g)	FRAP (mM Fe_2SO_4/g)
A1	38,04 ± 5,83^a	145,35 ± 0,90^a
B1	955,98 ± 6,36^b	1912,27 ± 20,07^b
C1	944,13 ± 13,17^b	1895,69 ± 19,93^b
D1	954,94 ± 4,5^b	1815,31 ± 13,28^b

Valores médios ± desvio padrão (n=3).
Médias com letras diferentes em uma mesma coluna indicam que os valores apresentam diferença significativa entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

Tabela 11 – Análise da capacidade antioxidante dos filmes produzidos com a PISGa

Filmes	ABTS (mg/g)	FRAP (mM Fe_2SO_4/g)
A2	167,37 ± 5,87a	495,9 ± 30,08^a
B2	1463,86 ± 33,10^b	2093,70 ± 27,55^b
C2	1358,73 ± 21,56^b	2124,63 ± 20,15^b
D2	1349,79 ± 19,96^b	2200,49 ± 23,17^b

Valores médios ± desvio padrão (n=3).
Médias com letras diferentes em uma mesma coluna indicam que os valores apresentam diferença significativa entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

Para os filmes produzidos com a PISGa, visualiza-se diferença entre os resultados, por ambos os métodos, daqueles produzidos com eugenol (B1, C1 e D1) para o filme controle (A1), em que os filmes com adição de eugenol apresentaram capacidade antioxidante superior. Alguns autores também reportaram o eugenol conferindo propriedades antioxidantes, quando adicionado às soluções filmogênicas que contêm proteína como polímero base (SALGADO *et al.,* 2013; ECHEVERRÍA *et al*., 2018; TALÓN *et al*., 2019), sendo esse o parâmetro utilizado para a escolha do eugenol como agente carreador de propriedades antioxidantes dos filmes produzidos neste trabalho.

Os filmes produzidos com adição de nanopartículas de HAp (C1, D1, C2 e D2) não apresentaram diferenças significativas na capacidade antioxidante, quando comparados com os respectivos grupos controle, que contêm apenas eugenol, óleo de girassol e proteína (A2 e B2). Portanto, supõe-se que a adição de nanopartículas de HAp na matriz polimérica não afetou a capacidade antioxidante dos filmes produzidos. No entanto, todos os filmes produzidos com a PISGb obtiveram propriedades antioxidantes mais intensivas, quando comparados com os filmes produzidos com a PISGa, supondo, assim, que o uso dessa proteína é mais eficaz quando resultados de capacidade antioxidante mais elevadas são esperados nos filmes.

4.1.5 Análise das propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes são parâmetros importantes para o emprego desses nas indústrias de alimentos e embalagens, uma vez que devem apresentar resistência à ruptura e flexibilidade, para que não modifiquem a respectiva integridade e não percam as propriedades durante o armazenamento e transporte (VICENTINI, 2003; KAEWPRACHU *et al*., 2016).

Os resultados obtidos para as propriedades mecânicas dos filmes produzidos no presente trabalho estão dispostos nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12 – Análise das propriedades mecânicas dos filmes produzidos com a PISGa

Filmes	Espessura média (μm)	Resistência à tração (Mpa) (σ)	Elongação na ruptura (%) (ε)	Módulo elástico (MPa)
A1	97 ± 17^{a}	$3,11 \pm 0,73^{a}$	$85,58 \pm 3,80^{a}$	$25,07 \pm 2,44^{a}$
B1	$173 \pm 23^{b,c}$	$2,09 \pm 0,23^{b}$	$56,02 \pm 2,94^{b}$	$15,75 \pm 1,83^{b}$
C1	177 ± 21^{b}	$3,91 \pm 0,65^{a}$	$57,33 \pm 3,18^{b}$	$12,56 \pm 1,89^{b,c}$
D1	149 ± 16^{c}	$3,68 \pm 0,51^{a}$	$48,67 \pm 3,07^{c}$	$10,08 \pm 0,35^{c}$

Valores médios ± desvio padrão (n=4).
Médias com letras diferentes em uma mesma coluna indicam que os valores apresentam diferença significativa entre si pelo Teste de Tukey ($p<0,05$).

Tabela 13 – Análise das propriedades mecânicas dos filmes produzidos com a PISGb

Filmes	Espessura média (μm)	Resistência à tração (Mpa) (σ)	Elongação na ruptura (%) (ε)	Módulo elástico (MPa)
A2	60 ± 24[a]	3,15 ± 0,7[a]	41,52 ± 3,91[a]	32,94 ± 2,48[a]
B2	212 ± 32[b]	1,97 ± 0,52[b]	37,80 ± 4,65 [a]	14,82 ± 2,02[b]
C2	151 ± 33[c]	3,22 ± 0,44[a]	40,62 ± 2,28[a]	9,78 ± 1,50[c]
D2	192 ± 44[b, c]	3,23 ± 0,34[a]	32,05 ± 2,24[b]	9,09 ± 1,20[c]

Valores médios ± desvio padrão (n=4).
Médias com letras diferentes em uma mesma coluna indicam que os valores apresentam diferença significativa entre si pelo Teste de Tukey ($p<0,05$).

Comparando as propriedades mecânicas dos filmes produzidos dos diferentes tipos de proteína (PISGa e PISGb), nota-se diferença significativa na elongação na ruptura dos filmes produzidos de PISGa (principalmente no filme A1) em comparação com os outros filmes. Logo, pode-se supor que a presença de 5-CQA na composição da PISGb acarretou diminuição da solubilidade dessa proteína na solução filmogênica, ocasionando menor elongação na ruptura dos filmes formados. No entanto, a redução da elongação à ruptura e módulo elástico dos filmes contendo óleo, eugenol e/ou HAp provavelmente foi resultado da adição de cargas na matriz polimérica, reduzindo a ductilidade dos filmes produzidos (MÜLLER *et al*., 2017). Também foi observada diminuição da resistência à tração dos filmes adicionados com óleo e eugenol (A1 e A2), e a incorporação de nanopartículas de HAp na solução filmogênica aumentou a resistência à tração dos filmes adicionados com óleo de girassol e eugenol (C1, C2, D1 e D2), suprindo a deficiência dos filmes B1 e B2. No entanto, não houve diferença significativa nas propriedades mecânicas entre os filmes com concentrações 0,1% e 0,3% de HAp (C1, C2, D1, D2), sendo apenas observado um possível efeito plastificante com a adição das nanopartículas, usualmente associado com o aumento da resistência à tração dos filmes, com simultânea diminuição da elongação à ruptura (SALGADO *et al.,* 2013).

4.2 Caracterização da morfologia da Hidroxiapatita

A síntese das nanopartículas de hidroxiapatita foi realizada com o objetivo de dispersar essas partículas nas matrizes dos filmes produzidos de proteínas isoladas

de semente de girassol, de modo a verificar as propriedades dos filmes após a adição desse composto em diferentes concentrações.

A caracterização da morfologia das partículas de hidroxiapatita foi realizada pelos métodos de difração de raios x (DRX) e por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

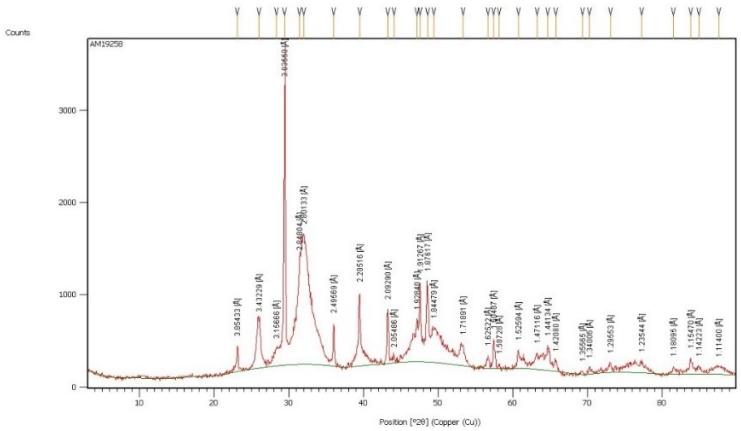
4.2.1 Análise da cristalinidade e tamanho de cristalito por difração de raios x (DRX)

O espectro da difração de raios X para o cristal de hidroxiapatita, preparada pela calcinação de cascas de ovos de galinha, é mostrado na Figura 17. O espectro da amostra preparada está de acordo com o modelo de referência padrão para a hidroxiapatita pura, JCPDS nº 09-0432 (Figura 18). Com isso, foi possível perceber os picos característicos dessa substância (211), (002), (112), (213) e (300) ao realizar a comparação entre o espectro da preparada neste estudo e o espectro para o padrão (ADEOGUN *et al*., 2016). Não foram observados picos característicos de impurezas em amostras de hidroxiapatita, como hidróxido de cálcio e fosfato de cálcio (EL BOUJAADY *et al*., 2016), indicando que a amostra obtida consiste basicamente em fases puras de hidroxiapatita cristalina.

O tamanho do cristalito também foi estimado por difração de raios X, e o resultado foi obtido utilizando o software High Score Plus (v. 4.9), determinando-se um diâmetro médio de 350 [Å] (ou 35 nm), indicando a nanocristalinidade do material sintetizado. Os dados obtidos estão dispostos na Tabela 14.

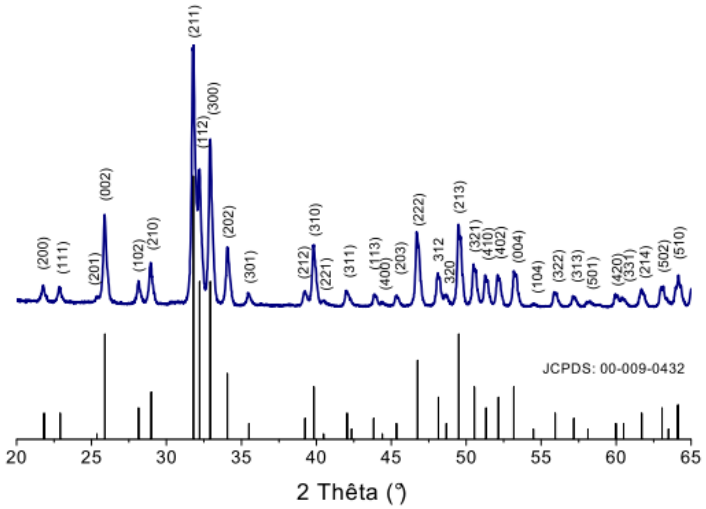
As imagens indicadas pela Figura 19 mostram a morfologia do pó de hidroxiapatita, examinado por microscopia eletrônica de transmissão. Também foi possível verificar o tamanho de partícula, como representado pela Figura 20, em dimensões nanométricos, com o tamanho de partícula detectado por microscopia eletrônica de transmissão, para o material sintetizado, variando entre 35 e 65 nm.

Figura 16 – Espectro de difração de raios x para a amostra de HAp



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 17 – Modelo de referência "padrão" para o cristal de hidroxiapatita pura - JCPDS nº 09-0432

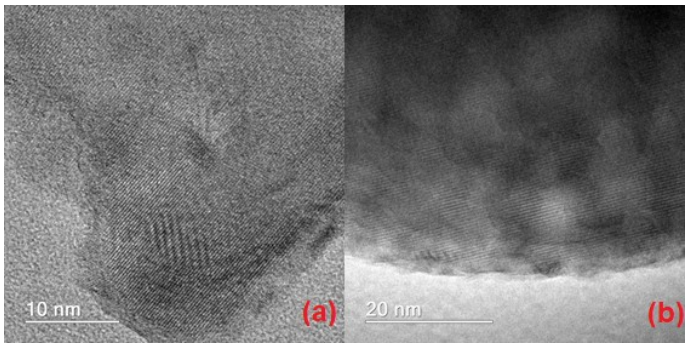


Fonte: El Boujaady *et al.* (2016).

Tabela 14 – Dados obtidos por difração de raios X da amostra de hidroxiapatita utilizados para verificação de tamanho do cristal.

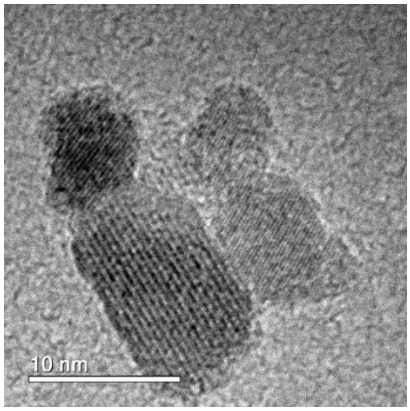
Posição [2θ]	Valor β	Tamanho do cristalito [Å]
31,8977	0,236	350
33,0374	0,326	351
32,2343	0,236	350
31,8446	0,236	350
32,9808	0,236	351

Figura 18 – (a) e (b) Micrografias obtidas por MET de cristais de hidroxiapatita mostrando coerência entre as orientações cristalográficas.



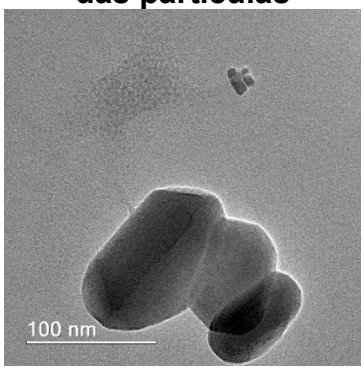
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 - Micrografia das nanopartículas de HAp obtidas por MET.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Figura 20 – Micrografia das nanopartículas de HAp mostrando o agrupamento das partículas



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Pela análise da imagem apresentada na Figura 20, é possível verificar o agrupamento entre os cristais de hidroxiapatita, ocasionados pela alta tensão superficial desse material, indicando que, para um melhor aproveitamento desse cristal como material

dispersante em soluções filmogênicas, talvez seja necessário o uso de surfactantes, o que reduz a tensão superficial e ocasiona o desagrupamento das partículas, resultando na estabilização das partículas no meio, como mostrado nos estudos feitos por Data *et al*. (2014) e Chuacharoe & Sabliov (2016).

5 CONCLUSÃO

Foi obtido sucesso na produção de todos os filmes do delineamento experimental, sendo necessário a utilização de banho ultrassônico para completa remoção das bolhas na solução formadora do filme, visto que estas atrapalham na formação do filme durante a secagem.

Os filmes produzidos com a PISGb mostraram resultados dispares quando comparados com os filmes produzidos com a PISGa. Desse modo, entende-se que a presença de ácido clorogênico na proteína interfere nas propriedades dos filmes formados, sendo frequentemente encontradas melhores propriedades quando utilizada a proteína com a presença de ácido clorogênico.

Os filmes produzidos com a PISGa apresentaram cores claras e amareladas, enquanto os filmes produzidos com a PISGb apresentaram cores escuras e esverdeadas, devido à presença do ácido clorogênico. A presença de óleo e eugenol nos filmes também influenciou nas características dos filmes formados, principalmente na barreira ao vapor de água e nas propriedades antioxidantes. Portanto, pode-se inferir que há necessidade da adição de uma parte lipídica quando se procura uma menor permeabilidade ao vapor de água nos filmes. O filme produzido apenas com a PISGb mostrou propriedade antioxidante significativa, quando comparado com o filme produzido apenas com a PISGa. A adição de eugenol influenciou positivamente nessas propriedades, efeito esperado devido à característica intrínseca ao composto fenólico.

As nanopartículas de hidroxiapatita foram sintetizadas com sucesso pela calcinação ácida de cascas de ovos de galinha, e a introdução das mesmas nas soluções filmogênicas afetou positivamente a resistência à tração dos filmes estudados, porém, não houve diferenças significativas entre os filmes preparados com concentrações 0,1 e 0,3% (m/m). Não houve diferença na permeabilidade ao vapor de água nos filmes produzidos com a HAp, supondo-se, então, a necessidade de uma maior concentração de partículas dispersas no meio para que haja melhorias nessa propriedade.

Portanto, os filmes estudados possuem propensão para o uso como embalagens de alimentos, uma vez que possuem boas características mecânicas e de barreira, flexibilidade, resistência à tração e a premissa de serem biodegradáveis e comestíveis, uma vez que todos os materiais utilizados para a síntese são biodegradáveis e seguros para o consumo humano.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Este estudo possibilitou uma análise prévia do potencial dos filmes produzidos a partir de proteína isolada de girassol, com e sem ácido clorogênico, óleo de girassol, eugenol e nanopartículas de hidroxiapatita. No entanto, há a necessidade de aprofundar a pesquisa para que ocorra o melhoramento das propriedades dos filmes, bem como a possibilidade de uso dos mesmos pela indústria de alimentos.

Assim, sugere-se:

- Avaliar a biodegrabilidade dos filmes;
- Realizar o estudo microbiológico dos filmes;
- Aprimorar o método de produção, para que os filmes se tornem homogêneos e possuam menor espessura;
- Realizar a síntese e caracterização de filmes de proteína isolada de semente de girassol utilizando diferentes compostos lipídicos, fenólicos e outros tipos de nanopartículas, bem como o uso de surfactantes;
- Avaliar as características da emulsão realizada para a formação da solução filmogênica, bem como o tipo de emulsão gerada;
- Avaliar o potencial dos filmes quando aplicados em alimentos;
- Realizar o estudo sensorial dos filmes ao serem aplicados em alimentos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRE, **Associação Brasileira de Embalagem**, 2019. Disponível em: https://www.abre.org.br/dados-do-setor/ano2019/. Acesso em: 20 de maio de 2020.

ABUGOCH, L., LAPIA. C., PLASENCIA. D., PASTOR, A., CASTRO-MANDUJANO, O., LÓPEZ, L., ESCALONA, V. H. Shelf-life of fresh blueberries coated with quinoa protein/chitosan/sunflower oil edible film. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 2, p. 619–626, 2016.

AHMED, S., AHSAN, M.., Synthesis of Ca-hydroxyapatite Bioceramic from Egg Shell and its Characterization. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 43 n. 4, p. 501-512, 2008.

ALEXANDRINO, T. D., FERRARI, E. A., DE OLIVEIRA, L. M., ORMENESE, E. C. S. C., PACHECO, M. T. B. Fractioning of the sunflower flour components: Physical, chemical and nutritional evaluation of the fractions. **LWT - Food Science and Technolog**, v. 84, p. 426–432, 2017.

ANDRADE, M. A., RIBEIRO-SANTOS, R., GUERRA, M., SANCHES-SILVA, A. Evaluation of the oxidative status of salami packaged with an active whey protein film. **Foods**, v. 8, n. 9, p. 1–15, 2019.

ARENAS, A. M. Z. Filme biodegradável à base de fécula de mandioca como potencial indicador de mudança de pH. Dissertação de Mestrado. 2012. 131f. Engenharia Química. Universidade de São Paulo, 2012.

ASIMENG, B. O., FIANKO, J. R., KAUFMANN, E. E., TIBURU, E. K., HAYFORD, C. F., ANANI, P. A., DZIKUNU, O. K. Preparation and characterization of hydroxyapatite from Achatina achatina snail shells: effect of carbonate substitution and trace elements on defluoridation of water. **Journal of Asian Ceramic Societies**, v. 6, n. 3, p. 205–212, 2018.

ASTM D 2974 - **Standard test methods for moisture, ash, and organic matter of peat and other organic soils**. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2014.

_____. D618-13, **Standard Practice for Conditioning Plastics for Testing**. West Conshohocken, PA 2013.

_____. E96/E96M-15, **Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials**, West Conshohocken, PA 2015.

BAHRAM, S., REZAELI, M., SOLTANI, M., KAMALI, A., OJAGH, S. M., ABDOLLAHI, M. Whey protein concentrate edible film activated with cinnamon essential oil. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, n. 3, p. 1251–1258, 2014.

BIANCHI, O., CASTEL, C. D., DE OLIVEIRA, V. B., BERTOULI, P. T., HILLIG, E. Avaliação da degradação não-isotérmica de madeira através de termogravimetria-TGA. **Polímeros**, v. 20, n. 5, p. 395-400, 2010.

BOSE, S., SAHA, S. K. Synthesis of Hydroxyapatite Nanopowders via Sucrose Templated Sol-Gel Method. Journal of the American Ceramic Society, v. 86, n.6, p. 1055-1057, 2003.

BÜCKER, F., MARDER, M., PEITER, M. R., LEHN, D. N., ESQUERDO, V. M., PINTO, L. A. A., KONRAD, O. Fish waste: An efficient alternative to biogas and methane production in an anaerobic mono-digestion system. **Renewable Energy**, v. 147, p. 798–805, 2020.

BUGNICOURT, E., BRZOSKA, N., KUCUKPINAR, E., PHILIPPE, S., FORLIN, E., BIANCHIN, Al., SCHMID, M. Dispersion and performance of a nanoclay/whey protein isolate coating upon its upscaling as a novel ready-to-use formulation for packaging converters. **Polymers**, v. 11, n. 9, p. 1–14, 2019.

CALIMAN, L. B.., DA SILVA, S. N., JUNKES, J. A., DELLA S, V. P. Ostrich eggshell as an alternative source of calcium ions for biomaterials synthesis. **Materials Research**, v. 20, n. 2, p. 413–417, 2017.
CAO, T. L.., YANG, S. Y., SONG, K. B. Development of burdock root inulin/chitosan blend films containing oregano and thyme essential oils. International **Journal of Molecular Sciences**,v. 19, n. 1, p. 1–12, 2018.

CHAUDHURI, B., MONDAL, B., MODAK, D. K., PRAMANIK K., CHAUDHURI B.K. Preparation and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite from egg shell and K_2HPO_4 solution. **Materials Letters**, v. 97, p. 148 - 150, 2013.

CHUACHAROEN, T., SABLIOV, C. M., Stability and controlled release of lutein loaded in zein nanoparticles with and without lecithin and pluronic F127 surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng. Aspects,** v. 503, p. 11-18, 2016.

CHOE, U., MUSTAFA, A. M., LIN, H., XU, J., SHENG, K. Effect of bamboo hydrochar on anaerobic digestion of fish processing waste for biogas production. **Bioresource Technology**, v. 283, n. January, p. 340–349, 2019.

COELHO, C. S., GAMA, J. A. N., OLIVEIRA J. L. A. T., SILVA, B. S. ., SOUZA, V. R. C.., ENDRINGER, D. C., LENZ, D. Use of extracts of sunflower-seed oil (Helianthus annus L.) for the treatment of cutaneous injuries in equine metatarsus: a case report. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 1, p. 125–129, 2012.

DAUDT, R. M. aplicação dos componentes do pinhão no desenvolvimento de produtos inovadores nas indústrias cosmética e de alimentos. Tese de Doutorado. 2016. 198f. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.

DATA, S., BISWAS, J., BHATTACHARYA, S. How does spacer length of imidazolium gemini surfactants control the fabrication of 2D-Langmuir films of silver-nanoparticles at the air–water interface?.**Journal of Colloid and Interface Science**, v. 430, p. 85-92, 2014.

DE GOES, R. H. T. B., DA SILVA, L. H. X., DIAZ, T. G., BRANCO, A. F., TEODORO, A. L., FERREIRA, G. R. Sunflower cake in diets for beef cattle: Digestibility, kinetics

and in vitro ruminal fermentation parameters. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**,v. 41, n. 1, p. 1–8, 2019.

DE MELO, A.M.P., LÓPEZ-PEDROUSO, M., COSTA, R.G., FRANCO, D., DE ALENCAR A. N. M. A., DA SILVA, T.A., MORENO, F.B.M.B., DE LIMA J. V., DE OLIVEIRA M. A.C., DE MEDEIROS, A.N., DE AZEVEDO M. R., LORENZO, J.M. Proteome changes in lamb semimembranosus muscles associated with the inclusion of sunflower cake in their diet. International **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 3, p. 995–1001, 2020.

DE MOURA, M. R., AOUADA, F. A., AVENA-BUSTILLOS, R. J., McHugh, T. H., KROCTHA, J. M., MATTOSO, L. H. C. Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. **Journal of Food Engineering**, v. 92, n. 4, p. 448–453, 2009.

DEHGHANI, S., HOSSEINI, S. V., REGENSTEIN, J. M. Edible films and coatings in seafood preservation: A review. **Food Chemistry**, v. 240, n. July, p. 505–513, 2018.

DINIKA, I., UTAMA, G. L. Cheese whey as potential resource for antimicrobial edible film and active packaging production. **Foods and Raw Materials**, v. 7, n. 2, p. 229–239, 2019.

ECHEVERRÍA, I., LÓPEZ-CABALLERO, M. E., GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., MAURI, A. N., MONTERO, M. P. Active nanocomposite films based on soy proteins-montmorillonite- clove essential oil for the preservation of refrigerated bluefin tuna (Thunnus thynnus) fillets. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, n. out, 2017.

EGOROV, T. A., ODINTSOVA, T. I.., MUSOLYAMOV, A. K., FIDO, R., TATHAM, A. S., SHEWRY, P. R. Disulphide structure of a sunflower seed albumin: Conserved and variant disulphide bonds in the cereal prolamin superfamily. **FEBS Letters**, v. 396, n. 2–3, p. 285–288, 1996.

EL BOUJAADY, H., MOURABET, M., EL RHILASSI, A, BENNANI-ZIATNI, M., EL HAMRI, R., TAITAI, A. Adsorption of a textile dye on synthesized calcium deficient hydroxyapatite (CDHAp): Kinetic and thermodynamic studies. **Journal of Materials and Environmental Science**, v. 7, n. 11, p. 4049–4063, 2016.

FADINI, A. L. ROCHA, F. S., ALVIM, I. D., SADAHIRA, M. S., QUEIROZ, M. B., ALVES, R. M. V., SILVAR, L. B. Mechanical properties and water vapour permeability of hydrolysed collagen-cocoa butter edible films plasticised with sucrose. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 2, p. 625–631, 2013.

FALEIRO, H. T., JÚNIOR, R. P. S., SILVA, L. F. Caracterização de grãos de girassol (hellianthus annuus L.) ao longo do período de colheita em dois municípios do estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 31, n. 2, p. 163–168, 2001.

FAN, S., HUANG, Z., ZHANG, Y., HU, H., LIANG, X., GONG, S., ZHOU, J., TU, R. Magnetic chitosan-hydroxyapatite composite microspheres: Preparation,

characterization, and application for the adsorption of phenolic substances. **Bioresource Technology**, v. 274, n. October 2018, p. 48–55, 2019.

FAO, **Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura**, 2020. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QD. Acesso em 09 de janeiro de 2020.

FERREIRA, M. S. L., FAI, A. E. C., ANDRADE, C. T., PICCIANI, P. H., AZERO, E. G., GONÇALVES, E. C. B. A. Edible films and coatins based on biodegradable residues applied to acerolas (Malpighia punicifolia L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 1634 - 1642, 2015.

FIHRI, A., LEN, C., VARMA, R. S., SOLHY, A. Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 347, p. 48–76, 2017.

FILHO, M. L. Efeito do eugenol sobre o endurecimento de resinas acrílicas ativadas quimicamente e efeitos de possíveis tratamentos paliativos. 2000. 136f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Odontologia. Universidade de São Paulo, 2000.

FILHO, W. L., HAVEA, P. H., BALOGUN, A. L., BOENECKE, J., MAHARAJ, A. A., HA'APIO, M., HEMSTOCK, S. L. Plastic debris on Pacific Islands: Ecological and health implications. **Science of the Total Environment**, v. 670, p. 181–187, 2019

GALUS, S., KADZIŃSKA, J. Food applications of emulsion-based edible films and coating. **Trends in Food Science and Technology**, v. 45, p. 273-283, 2015.

GALUS, S., KADZIŃSKA, J. Whey protein edible films modified with almond and walnut oils. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 78–86, 2016.

GALUS, S. Functional properties of soy protein isolate edible films as affected by rapeseed oil concentration. **Food Hydrocolloids**, v. 85, n. February, p. 233–241, 2018.

GAO, S., SUN, K., LI, A., WANG, H. Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanofiber by chemical precipitation method using surfactants. **Materials Research Bulletin**, v. 48, n. 3, p. 1003–1006, 2013.

GAZOLLA, P. A. R. *et al*. Síntese e avaliação da atividade citotóxica de derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólico. **Química Nova**, v. 41, n. 5, p. 497-506, 2018.

GIMÉNEZ, B., GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., LÓPEZ-CABALLERO, M. E., GÓMEZ-ESTACA, J., MONTERO, P. Role of sepiolite in the release of active compounds from gelatin-egg white films. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 475–486, 2012.

GKOMOZA, P., VARDAVOULIAS, M., PANTELIS, D. I., SARAFOGLOU, C. Comparative study of structure and properties of thermal spray coatings using conventional and nanostructured hydroxyapatite powder, for applications in medical implants. **Surface and Coatings Technology**, v. 357, n. July 2018, p. 748–758, 2019.

GOLDBERG, M. *et al*. Influence of Al on the Structure and in Vitro Behavior of Hydroxyapatite Nanopowders. **Journal of Physical Chemistry** B,v. 123, n. 43, p. 9143–9154, 2019.

GÓMEZ-ESTACA, J., BRAVO, L., GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., MONTERO, A. P. Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 18–25, 2009.

GONZÁLEZ-PÉREZ, S., VAN K. G. A., VEREIJKEN, J. M., MERCK, K. B.., GRUPPEN, H., VORAGEN, A. G. J. Emulsion properties of sunflower (Helianthus annuus) proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2261–2267, 2005.

GONZÁLEZ-PÉREZ, S., VEREIJKEN, J. M. Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 2173–2191, 2007.

GRASSO, S., LIU, S., METHVEN, L. Quality of muffins enriched with upcycled defatted sunflower seed flour. **LWT – Food Science and Technology**, v. 119, n. October 2019, 2020.

GRASSO, S., OMOARUKHE., WEN, X., PAPOUTSIS, Konstantinos., METHVEN, Lisa. The use of upcycled defatted sunflower seed flour as a functional ingredient in biscuits. **Foods**, v. 8, n. 8, p. 1–11, 2019.

GUNDUZ, O. *et al*. A new method for fabrication of nanohydroxyapatite and TCP from the sea snail Cerithium vulgatum. **Journal of Nanomaterials**, 2014.

GUO, L., XIN, H., LUO, X., ZHANG, C. Phase evolution, mechanical properties and MRI contrast behavior of GdPO4 doped hydroxyapatite for dental applications. **Materials Science and Engineering**, v. 111, n. March, p. 110858, 2020.

GUZMÁN, L. E., ACEVEDO, D., ROMERO, L., ESTRADA, J. Elaboración de una Película Comestible a Base de Colágeno Incorporado con Nisina como Agente Antimicrobiano. **Información Tecnológica**, v. 26, n. 3, p. 17–24, 2015.

HAIDER, A., HAIDER, S., HAN, S. S., KANG, I. K. Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review. **RSC Advances**, v. 7, n. 13, p. 7442–7458, 2017.

HALLIWELL, B, WISEMAN, H. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochemistry Journal**, v. 313. p.17–29, 1996.

HASSAN, B., SHAHZAD, A. C., ABDULLAH, I. H., KHALID, M., NASEEM A. Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1095–1107, 2018.

HEIDBREDER, L. M., BABLOK, I., DREWS, S., MENZEL, C. Tackling the plastic problem: A review on perceptions, behaviors, and interventions. **Science of the Total Environment**, v. 668, p. 1077–1093, 2019.

HOSSEINI, S. F., REZAEI, M., ZANDI, M., FARAHMANDGHAVI, F. Bio-based composite edible films containing Origanum vulgare L. essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 403–413, 2015.

HUI, P., MEENA, S. L., SINGH, G., AGARAWAL, R. D., PRAKASH, S. Synthesis of hydroxyapatite bio-ceramic powder by hydrothermal method. **Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering**, v. 9, n.8, p. 683-692, 2010.

IGC-UFMG. Centro de Pesquisa Professor Manoel Teixeira da Costa, Instituto de Geociências – UFMG. **Difração e Fluorescência de Raios-X**. Disponível em: <http://www.cpmtc-igc-ufmg.org/laboratorios2.htm>. Acesso em: 04/01/2020.

INSAWARD, A., DUANGMAL, K., MAHAWANICH, T. Mechanical, optical, and barrier properties of soy protein film as affected by phenolic acid addition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 43, p. 9421–9426, 2015.

KAEWPRACHU, P., OSAKO, K., BENJAKUL, S. TONGDEESOONTORN, W., RAWDKUEN, S. Biodegradable Protein-based Films and Their Properties: A Comparative Study. **Packaging Technology and Science**, v. 29, n. 2, p. 77–90, 2016.

KAEWPRACHU, P., OSAKO, K., RUNGGRAENG, N., RAWDKUEN, S. Characterization of fish myofibrillar protein incorporated with catechin-Kradon extract. **International Journal of Macromolecules**, v. 107, n. 2018, p. 1463 – 1473, 2018

KARIMI, N., ALIZADEH, A., HA, H. S. Preparation and characterization of whey protein isolate/polydextrose-based nanocomposite film incorporated with cellulose nanofiber and L. plantarum: A new probiotic active packaging system. **LWT - Food Science and Technology**, v. 121, n. July 2019, 2020.

KASSAB, Z., EL ACHABY, M., TAMRAOUI, Y., SEHAQUI, H., BOUHFID, R., QAISS, A. E. K. Sunflower oil cake-derived cellulose nanocrystals: Extraction, physico-chemical characteristics and potential application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 241–252, 2019.

KNUPP, W. G., RIBEIRO, M. S., MIR, M., CAMPS, I. Dynamics of hydroxyapatite and carbon nanotubes interaction. **Applied Surface Science**, v. 495, n. May, p. 143493, 2019.

KOURAVAND, F., JOOYANDEH, H., BARZEGAR, H., HOJJATI, M. Characterization of cross-linked whey protein isolate-based films containing Satureja Khuzistanica Jamzad essential oil. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 3, p. 1–10, 2018.

KUMAR, R., PRAKASH, K. H., CHEANG, P., GOWER, L., KHOR, K. A. Chitosan-mediated crystallization and assembly of hydroxyapatite nanoparticles into hybrid

nanostructured films. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 5, n. 21, p. 427–439, 2008.

KUMAR, C. S., DHANARAJ, K., VIMALATHITHAN, R. M, ILAIYARAJA, P., SURESH, G. Hydroxyapatite for bone related applications derived from sea shell waste by simple precipitation method. **Journal of Asian Ceramic Societies**, v. 8, n. 2, p. 416–429, 2020.

LAGUNA, O., BARAKAT, A., ALHAMADA, H., DURAND, E., BARÉA, B., FINE, F., VILLENEUVE, P., CITEAU, M., DAUGUET, S., LECOMTE, J. Production of proteins and phenolic compounds enriched fractions from rapeseed and sunflower meals by dry fractionation processes. **Industrial Crops and Products**, v. 118, n. December 2017, p. 160–172, 2018.

LEE, J. H., LEE, J., SONG, K. B. Development of a chicken feet protein film containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 46, p. 208–215, 2015.

LEE, J. H., SONG, K. B. Application of an antimicrobial protein film in beef patties packaging. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 35, n. 5, p. 611–614, 2015.

LIAOTRAKOON, V., RAVIYAN, P. Modifying the properties of whey protein isolate edible film by incorporating palm oil and glycerol. Songklanakarin **Journal of Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 243–249, 2018.

LONDOÑO-RESTREPO S., JERONIMO-CRUZ, R., MALO, B. M. M., MUNOZ, E. M. R., GARCÍA, M. E. R. Effect of the nano crystal size on the x-ray diffraction patterns of biogenic hydroxyapatite from human, bovine, and porcine bones. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 5915, 2019.

LUSAS, E. W. Sunflower seed protein. In: New protein foods, vol 5: Seed Storage Proteins **(**ALTSCHUL, A. M. & WILCKE, H. L.). Orlando. **Academic Press**, p. 394-433, 1985.

MALI, S., GROSSMANN, M. V. E., & YAMASHITA, F. Filmes comestíveis: Aspectos gerais, propriedades de barreira a umidade e oxigênio**. Boletim de Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. v. 18, n. 1, p. 105–128, 2000.

MALIK, M. A., SHARMA, H. K., SAINI, C. S. Effect of removal of phenolic compounds on structural and thermal properties of sunflower protein isolate. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 9 p. 3455–3464, 2016

MALIK, M, A., SHARMA, H. K., SAINI, C. S. Effect of gama irradiation on structural, molecular, thermal and rheological properties of sunflower protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 72, p. 312 - 322, 2017.

MALIK, M. A., SAINI, C. S. Improvement of functional properties of sunflower protein isolates near isoelectric point: Application of heat treatment. **LWT – Food Science and Technology**, v. 98, n. July, p. 411–417, 2018.

MANDARINO, José Marcos G. Caracteristicas bioquímicas e nutricionais do óleo e do farelo de girassol. **EMBRAPA-CNPSo**, Londrina. n. 52, p. 25, 1992.

MEHRYAR, L., ESMAIILI, M., ZEYNALI, S., R., IMANI, M. Evaluation of thermal stability of confectionary sunflower protein isolate and its effect on nanoparticulation and particle size of the produced nanoparticles. **Food Science and Biotechnology**,v. 26, n. 3, p. 653–662, 2017.

MELO, R. C. A. Plantas medicinais, óleos essenciais e aromas. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 2, p. 193–200, 2005.

MOJUMDAR, S. C., MORESOLI, C., SIMON, L. C., LEGGE, R. L. Edible wheat gluten (WG) protein films: Preparation, thermal, mechanical and spectral properties**. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 104, n. 3, p. 929–936, 2011.

MONDAL, S., NGUYEN, V. T., PARK, S., CHOI, J., TRAN, L. H., YI, M., SHIN, J. Ho., LEE, C. Y., OH, J. Bioactive, luminescent erbium-doped hydroxyapatite nanocrystals for biomedical applications. **Ceramics International**, v. 46, n. 10, p. 16020–16031, 2020.

MÜLLER, K., JESDINSZKI, M., SCHMID, M. Modification of Functional Properties of Whey Protein Isolate Nanocomposite Films and Coatings with Nanoclays. **Journal of Nanomaterials**, v. 2017, p. 19–26, 2017.

MUTTHARASI, C., MURALISANKAR, T., UTHAYAKUMAR, V., GAYATHRI, V., THANGAL, S. H., ANANDHAN, K. Utilization of marine fisheries wastes for the production of the freshwater fish Cyprinus carpio. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, n. 8, p. 2305–2313, 2019.

NAGARAJAN, M., BENJAKUL, S., PRODPRAN, T., SONGTIPYA, P. Properties of Bio-nanocomposite Films from Tilapia Skin Gelatin as Affected by Different Nanoclays and Homogenising Conditions. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 11, p. 3269–3281, 2014.

NASSAR, S. F., DOMBLE, C., GASTALDI, E., TOUCHLEAUME, F., CHARLIER, P. Soy protein isolate nanocomposite film enriched with eugenol, an antimicrobial agent: Interactions and properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 10, 2018.

NEWMAN, A. W., BYRN, S. R. Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 19, p. 898–905, 2003.

OĞUR, S., ERKAN, N. The physicochemical properties of edible protein films. **Italian Journal of Food Science,** v. 27, 2015.

OLIVEIRA, D. M., BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de Ácidos fenólicos. **Quimica Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011.

OLIVEIRA, V. da S, OLIVEIRA, R. ., GOES, R. H. T. B., SILVA, T. M., SILVA, L. F, FREITAS, L. S., PEREIRA, E. S., BEZERRA, L. R. Physicochemical composition, fatty

acid profile and sensory attributes of the meat of young Nellore bulls fed sunflower cake from the biodiesel industry. **Livestock Science**, v. 227, n. January, p. 97–104, 2019.

ORDÓÑEZ, C., ASENJO, M. G., BENITEZ, C., GONZÁLEZ, J. L. Obtaining a protein concentrate from integral defatted sunflower flour. **Bioresource Technology**, v. 78, n. 2, p. 187–190, 2001.

PALLELA, R., VENKATESAN, J., KIM, S. K. Polymer assisted isolation of hydroxyapatite from Thunnus obesus bone. **Ceramics International**, v. 37, n. 8, p. 3489–3497, 2011.

PANTOJA-UCEDA, D., SHEWRY, P. R., BRUIX, M., TATHAM, A. S., SANTORO, J., RICO, M. Solution structure of a methionine-rich 2S albumin from sunflower seeds: Relationship to its allergenic and emulsifying properties. **Biochemistry**, v. 43, n. 22, p. 6976–6986, 2004.

PÉREZ-GONZÁLEZ, S. Physico-chemical and functional properties of sunflower proteins. 2003. 160f. Tese de Doutorado. Wageningen University, Países Baixos, 2003.

PERIMENIS, A. NICOLAY, T., LECLERCQ, M., GERIN, P. A. Comparison of the acidogenic and methanogenic potential of agroindustrial residues. **Waste Management**, v. 72, p. 178–185, 2018.

PRAKASAM, M., LOCS, J., SALMA-ANCANE, K., LOCA, D., LARGETEAU, A., BERZINA-CIMDINA, L. Fabrication, Properties and Applications of Dense Hydroxyapatite: A Review. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 6, n. 4, p. 1099–1140, 2015.

RAHMAN, M. M., NETRAVALI, A. N., TIIMOB, B. J., APALANGYA, V., RANGARI, V. K. Bio-inspired “green” nanocomposite using hydroxyapatite synthesized from eggshell waste and soy protein. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 22, p. 1–10, 2016.

RAU, J. V., FOSCA, M., CACCIOTTI, I., LAURETI, S., BIANCO, A., TEGHIL, R. Nanostructured Si-substituted hydroxyapatite coatings for biomedical applications. **Thin Solid Films**, v. 543, p. 167–170, 2013.

RAVEN, P. H.., EVERT, R. F.., EICHHORN, S. E. Biologia Vegetal: 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RIBEIRO, J. D. Estudo analítico e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial da espécie *Pimenta dioica lindl*. 2009. 123f. Tese de Doutorado. Faculdade de Química. Universidade Federal da Paraíba, 2009

RIVERA, E. M., ARAIZA, M., BROSTOW, W., CASTAÑO, V. M., DÍAZ-ESTRADA, J. R., HERNÁNDEZ, R., RODRÍGUEZ, J. R. Synthesis of hydroxyapatite from eggshells. **Materials Letters**,v. 41, n. 3, p. 128–134, 1999.

RIVEROS, C. G.; MARTIN, M. P; AGUIRRE, A., GROSSO, N. R. Film preparation with high protein defatted peanut flour: characterization and potential use as food packaging. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 4, p. 969–975, 2018.

ROCCA-SMITH, J. R., MARCUZZO, E., KARBOWIAK, T., CENTRA, J., GIACOMETTI, M., SCAPIN, F., VELNIR, E., SENSIDONI, A., DEBEAUFORT, F. Effect of lipid incorporation on functional properties of wheat gluten based edible films. **Journal of Cereal Science**, v. 69, p. 275–282, 2016.

RUFINO, M. S. M. *et al*. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Comunicado Técnico Embrapa**, n. 128, p.1-4, 2007a.

RUFINO, M. S. M. *et al*. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). **Comunicado Técnico Embrapa**, n. 128, p.1-4, 2007b.

SADAT-SHOJAI, M., KHORASANI, M. T., DINPANAH-KHOSDARGI, E., AHMAD. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 7591-7621, 2013.

SAFATIAN, F., DOAGO, Z., TORABBEIGI, M., RAHMANI S. H., AHADI, N. Lead ion removal from water by hydroxyapatite nanostructures synthesized from egg sells with microwave irradiation. **Applied Water Science**, v. 9, n. 4, p. 1–6, 2019.

SAFATIAN, F., DOAGO, Z., TORABBEIGI, M., RAHMANI S. H., AHADI, N. Lead ion removal from water by hydroxyapatite nanostructures synthesized from egg sells with microwave irradiation. **Applied Water Science**, v. 9, n. 4, p. 1–6, 2019.

SALAMA, H. E., ABDEL AZIZ, M. S., SABAA, M. W. Novel biodegradable and antibacterial edible films based on alginate and chitosan biguanidine hydrochloride. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 443–450, 2018.

SALGADO, Pablo. Proteínas de Girasol: aislamiento, caracterización y aplicación en la industria alimentaria. 2009. 234f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Exatas. Universidad Nacional de La Plata, Argentina, 2009.

SALGADO, P. R.., MOLINA O., Sara E., PETRUCCELLI, S., MAURI, A. N. Biodegradable sunflower protein films naturally activated with antioxidant compounds. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 5, p. 525–533, 2010.

SALGADO, P. R., FERNÁNDEZ, G. B., DRAGO, S. R., MAURI, A. N. Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1433–1440, 2011.

SALGADO, P. R., LÓPEZ-CABALLERO, M. E., GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., MAURI, Adriana N., MONTERO, M. P. Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have potential application for the preservation of fish patties. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 1, p. 74–84, 2013.

SANLA-EAD, N., JANGCHUD, A., CHONHENCHOB, V., SUPPAKUL, P. Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde and Eugenol and Their Activity after Incorporation into Cellulose-based Packaging Films. **Packaging Technology and Science,** [S. l], v. 25, p. 7-17, 2012.

SANS, J., LLORCA, J., SANZ, V., PUIGGALÍ, J., TURON, P., ALEMÁN, C. Electrically Polarized Hydroxyapatite: Influence of the Polarization Process on the Microstructure and Properties. **Langmuir**, v. 35, n. 46, p. 14782–14790, 2019.

SASTRY, M. C. S., RAO, M. S. N. Binding of Chlorogenic Acid by the Isolated Polyphenol-Free 11S Protein of Sunflower (Helianthus annuus) Seed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 12, p. 2103–2110, 1990

SESSINI, V., ARRIETA, M. P., KENNY, J. M., PEPONI, L. Processing of edible films based on nanoreinforced gelatinized starch. **Polymer Degradation and Stability**, p. 1-12, 2016.

SHANESAZZADEH, E., KADIVAR, M., FATHI, M. Production and characterization of hydrophilic and hydrophobic sunflower protein isolate nanofibers by electrospinning method. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 1–7, 2018.

SHCHEKOLDINA, T., AIDER, M. Production of low chlorogenic and caffeic acid containing sunflower meal protein isolate and its use in functional wheat bread making. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2331–2343, 2012.

SILVA, A. F., BARBOSA, L. C. A., SILVA, E. A. M., CASALI, V. W. D., NASCIMENTO, E. A. Composição química do óleo essencial de Hyptis suaveolens (L.) Poit, (Lamiaceae). **Revista Brasil de Plantas Medicinais**, v. 6, n. 1, 2003.

SNEHARANI, A. H. Curcumin–sunflower protein nanoparticles - A potential antiinflammatory agent. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 8, p. 1–8, 2019.

SOARES, M. J. Avaliação do efeito da adição de ingredientes sobre os compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de cápsulas de café expresso e sua bioacessibilidade. 2018. 114f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública. Universidade de São Paulo, 2018.

SONG, N. B., SONG, H. Y., JO, W. S., SONG, K. B. Physical properties of a composite film containing sunflower seed meal protein and its application in packaging smoked duck meat. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 4, p. 789–795, 2013.

SUBRAMANIAN, R., SATHISH, S., MURUGAN, P., MOHAMED MUSTHAFA, A., ELANGO, M. Effect of piperine on size, shape and morphology of hydroxyapatite nanoparticles synthesized by the chemical precipitation method. **Journal of King Saud University - Science**, v. 31, n. 4, p. 667–673, 2019.

SUCHANEK, W., YOSHIMURA, M., Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. **Journal of Materials Research**, v. 13, n. 1, p. 94 -117, 1998.

SUNIL, B. R., JAGANNATHAM, M. Producing hydroxyapatite from fish bones by heat treatment. **Materials Letters**, v. 185, n. August, p. 411–414, 2016.
TAHSIRI, Z., MIRZAEI, H., HOSSEINI, S. M. H., KHALESI, M. Gum arabic improves the mechanical properties of wild almond protein film. **Carbohydrate Polymers**, v. 222, n. June, p. 114994, 2019.

TALÓN, E., VARGAS, M., CHIRALT, A., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Antioxidant starch-based films with encapsulated eugenol. Application to sunflower oil preservation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 131, n. June 2019, 2019.

TAVASSOLI-KAFRANI, E., SHEKARCHIZADEH, H., MASOUDPOUR-BEHABADI, M. Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 360–374, 2016

TÉLLEZ-RANGEL, E. C., GARCÍA-MARTÍNEZ, I., RODRÍGUEZ-HUEZO, E., TOTOSAUS, A. Películas comestibles de proteína con aceite de maíz emulsionado como acarreador de paprika para mejorar color y rancidez en Boloña de res. **Nacameh**. v. 11, n. 1, p. 18–32, 2017.

TESSIER, R., KHODOROVA, N., CALVEZ, J., KAPEL, R., QUINSAC, A., PIEDCOQ, J., TOMÉ, D., GAUDICHON, C. 15N and 2h Intrinsic Labeling Demonstrate That Real Digestibility in Rats of Proteins and Amino Acids from Sunflower Protein Isolate Is Almost as High as That of Goat Whey. **Journal of Nutrition**, v. 150, n. 3, p. 450–457, 2020.

TOLEDO, M., SILES, J. A., GUTIÉRREZ, M. C., MARTÍN, M. A. Monitoring of the composting process of different agroindustrial waste: Influence of the operational variables on the odorous impact. **Waste Management**, v. 76, p. 266–274, 2018.

TORNUK, F., HANCER, M., SAGDIC, O., YETIM, H. LLDPE based food packaging incorporated with nanoclays grafted with bioactive compounds to extend shelf life of some meat products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 540–546, 2015.

TORNUK, F., SAGDIC, O., HANCER, M., YETIM, H. Development of LLDPE based active nanocomposite films with nanoclays impregnated with volatile compounds. **Food Research International**, v. 107, n. February, p. 337–345, 2018.

TRAKOOLWANNACHAI, V., KHEOLAMAI, P., UMMARTYOTIN, S. Characterization of hydroxyapatite from eggshell waste and polycaprolactone (PCL) composite for scaffold material. **Composites Part B: Engineering**, v. 173, n. May, 2019.

UGOLINI, L., CINTI, S., RIGHETTI, L., STEFAN, A., MATTEO, R., D'AVINO, L., LAZZERI, L. Production of an enzymatic protein hydrolyzate from defatted sunflower seed meal for potential application as a plant biostimulant. **Industrial Crops and Products**, v. 75, p. 15–23, 2015.

VALENZUELA, C., ABUGOCH, L., TAPIA, C. Quinoa protein-chitosan-sunflower oil edible film: Mechanical, barrier and structural properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 531–537, 2013.

VELLIQUETTE, R. A.., FAST, D. J., MALY, E. R., ALASHI, A. M., ALUKO, R. E. Enzymatically derived sunflower protein hydrolysate and peptides inhibit NFκB and promote monocyte differentiation to a dendritic cell phenotype. **Food Chemistry**, v. 319, n. March, 2020.

VEQTER. **Residual Stress Experts**. Disponível em: https://www.veqter.co.uk/residual-stress-measurement/x-ray-diffraction. Acesso em: 04/01/2020.

VICENTINI, N. M. Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita. 2003. 198f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, 2003.

XU, X., CHEN, H., ZHANG, Q., LYU, F., DING, Y., ZHOU, X. Effects of oil droplet size and interfacial protein film on the properties of fish myofibrillar protein–oil composite gels. **Molecules**, v. 25, n. 2, 2020.

WANG, Z., KANG, H., ZHANG, W., ZHANG, S., LI, J. Improvement of interfacial interactions using natural polyphenol-inspired tannic acid-coated nanoclay enhancement of soy protein isolate biofilms. **Applied Surface Science**, v. 401, p. 271–282, 2017.

WANG, Z., WU, Q., FAN, B., ZHANG, J., LI, W., ZHENG, X., LIN, H., GUO, L. Testing biodegradable films as alternatives to plastic films in enhancing cotton (Gossypium hirsutum L.) yield under mulched drip irrigation. **Soil and Tillage Research**, v. 192, n. September 2018, p. 196–205, 2019.

WESTERHOLM, M., LIU, T., SCHNÜRER, A. Comparative study of industrial-scale high-solid biogas production from food waste: Process operation and microbiology. **Bioresource Technology**, v. 304, n. February, p. 122-981, 2020.

ANEXOS

Anexo 1 – Laudo da composição centesimal das proteínas isoladas de semente de girassol

SGS

SGS Germany GmbH Rödingsmarkt 16 20459 Hamburg

ESPACE Prozess Technologien GmbH
Helmholtzstrasse 2-9
10587 Berlin

Test Report 3778186
Order No. 4507161
Customer No. 10120552

Saskia Schock
Phone +49 40 30101-658
Fax +49 40 30101-943
Saskia.Schock@sgs.com

Agriculture, Food

SGS Germany GmbH
Rödingsmarkt 16
20459 Hamburg

DAkkS Deutsche Akkreditierungsstelle D-PL-11020-04-01

Hamburg, 11.04.2018

Your order/project: SUNPROTEIN
Your purchase order date: 22.03.2018

This (e)Report cancels and supersedes the (e)Report No. 3777673 dated 11.04.2018 issued by SGS.

SGS Germany GmbH

Compiled by: 11.04.2018 i.A. Saskia Schock Customer Service Consultant Agriculture.
Approved by: 11.04.2018 i.A. Ronja Gley Customer Service Consultant Agriculture.

SGS Germany GmbH | Rödingsmarkt 16 D-20459 Hamburg t +49 40 30101- 0 f +49 40 326331 www.sgsgroup.de

Member of the SGS Group (Société Générale de Surveillance)

The test results refer exclusively to the examined test items and the date of the test under the test specifications. The publication and duplicating of our test reports and expert opinions for advertising purposes as well their use for any other purposes in extracts requires our written approval.
Geschäftsführer: Stefan Steinhardt, Aufsichtsratsvorsitzender: Dirk Heitemann, Sitz der Gesellschaft: Hamburg, HRB 4981, Amtsgericht Hamburg

Anexo 1 – Continuação

General Information:

Sample No.:	180297318
Sample:	SUNPROTEIN (food sunflower protein concentrate) Batch: 01171111
Date of receipt:	27.03.2018
Testing period (begin / end):	27.03.2018 / 11.04.2018
Quantity:	837g
Parcel:	Manufacturer : "Bio Technologies" LLC (Address: Russia, 649100, Altai Republic, Mayma, 2a, 50 Let Pobedy St.)
Packaging:	Paper bag

Test Results:

Parameter	Method	Lab	Unit	Result	Limit of quantification	Requirements
Constituents:						
Protein	ASU L 06.00-7 mod., N x 6,25	HH	g/100 g	80,4	0,1	
Crude protein	VDLUFA Vol. III, 4.1.1. mod. (N x 6,25)	HH	%	80,4	0,1	
KOH protein solubility	American Soybean Assoc.[1)(2)(3)]	HH	%	91,5[3)]	0,1	
Oil content	DIN EN ISO 659, mod.	HH	g/100 g	< 0,5	0,5	
Water and volatile matter	DIN EN ISO 665	HH	%	6,51	0,01	
Ash	acc. to ASU, 550°C	HH	g/100 g	5,65	0,01	
Dietary fibre	ASU L 00.00-18, mod. This method corresponds to AOAC 985.29	HH	g/100 g	4,31	0,50	
Carbohydrates	calculated[4)]		g/100 g	3,1	0,2	
Energy value	calculated		kcal/100g	343	1	
Energy value	calculated		kJ/100g	1454	1	

(1) Method 8.4.2
(2) not accredited.
(3) Due to the deviating matrix, this method was done out of the DIN EN ISO/IEC 17025 accredited area.
(4) as difference of the determined parameters or as sum of the directly determined carbohydrates

GMO:						
NOS terminator	Real-time PCR[1)(2)]			negative		
35S promotor	Real-time PCR[1)(2)]			negative		
FMV	Real-time PCR[1)(2)]			negative		

(1) acc. to ASU. Limit of Detection: 0,01 % copies in non-processed meal. A sample specific Limit of Detection was not determined.
(2) subcontracted.

Compiled by: 11.04.2018 i.A. Saskia Schock Customer Service Consultant Agriculture.
Approved by: 11.04.2018 i.A. Ronja Grey Customer Service Consultant Agriculture.

The test results refer exclusively to the examinded test items and the date of the test under the test specifications. The publication and duplicating of our test reports and expert opinions for advertising purposes as well their use for any other purposes in extracts requires our written approval.
Geschäftsführer: Stefan Steinhardt, Aufsichtsratsvorsitzender: Dirk Hellemans, SGS der Gesellschaft: Hamburg, HRB 6951, Amtsgericht Hamburg

Anexo 1 - Continuação

SGS

Your order/project: SUNPROTEIN
Your purchase order number: .

Test Report 3778186
Order 4507161 Sample 180297318

11.04.2018

Sample 180297318	SUNPROTEIN (food sunflower protein concentrate); Batch: 01171111					
Parameter	Method	Lab	Unit	Result	Limit of quantification	Requirements
Minerals/metals:						
Calcium	DIN EN 15621, mod.	HH	mg/kg	2482	2,0	
Potassium	DIN EN 15621, mod.	HH	mg/kg	2982	5,0	
Phosphorus	DIN EN 15621, mod.	HH	mg/kg	5584	2,0	
Magnesium	DIN EN 15621, mod.	HH	mg/kg	1498	2,0	

The laboratory sites of the SGS group Germany according to the abbreviations mentioned above are listed at http://www.institut-fresenius.de/filestore/89/laborstandortkuerzelsgs2.pdf.

*** End of test report ***

This document is issued by the Company subject to its General Conditions of Service (www.sgsgroup.de/agb). Attention is drawn to the limitations of liability, indemnification and jurisdictional issues established therein. This document is an original. If the document is submitted digitally, it is to be treated as an original within the meaning of UCP 600. Any holder of this document is advised that information contained hereon reflects the Company's findings at the time of its intervention only and within the limits of client's instructions, if any. The Company's sole responsibility is to its Client and this document does not exonerate parties to a transaction from exercising all their rights and under the transaction documents. Any unauthorized alteration, forgery or falsification of the content or appearance of this document is unlawful and offenders may be prosecuted to the fullest extent of the law.

Compiled by: 11.04.2018 i.A. Saskia Schock Customer Service Consultant Agriculture.
Approved by: 11.04.2018 i.A. Ronja Grey Customer Service Consultant Agriculture.

The test results refer exclusively to the examinded test items and the date of the test under the test specifications. The publication and duplicating of our test reports and expert opinions for advertising purposes as well their use for any other purposes in extracts requires our written approval.
Geschäftsführer: Stefan Steinhardt, Aufsichtsratsvorsitzender: Dirk Heilenkamp, SGS der Gesellschaft: Hamburg, HRB 6951, Amtsgericht Hamburg

Anexo 2 – Laudo microbiológico e da quantidade de pesticidas e herbicidas contido nas proteínas isoladas de semente de girassol

SGS

SGS Germany GmbH Rödingsmarkt 16 20459 Hamburg

ESPACE Prozess Technologien GmbH
Helmholtzstrasse 2-9
10587 Berlin

Test Report 3823277
Order No. 4544074
Customer No. 10120552

Saskia Schock
Phone +49 40 30101-658
Fax +49 40 30101-943
Saskia.Schock@sgs.com

Agriculture, Food

SGS Germany GmbH
Rödingsmarkt 16
20459 Hamburg

DAkkS
Deutsche Akkreditierungsstelle
D-PL-11020-04-01

Hamburg, 17.05.2018

Your order/project: .
Your purchase order date: 26.04.2018

SGS Germany GmbH

Compiled by: 17.05.2018 i.A. Saskia Schock Customer Service Consultant Agriculture.
Approved by: 17.05.2018 i.A. Ronja Gley Customer Service Consultant Agriculture.

SGS Germany GmbH | Rödingsmarkt 16 D-20459 Hamburg t +49 40 30101-0 f +49 40 326331 www.sgsgroup.de

Member of the SGS Group (Société Générale de Surveillance)

The test results refer exclusively to the examinded test items and the date of the test under the test specifications. The publication and duplicating of our test reports and expert opinions for advertising purposes as well their use for any other purposes in extracts requires our written approval.
Geschäftsführer: Stefan Steinhardt, Aufsichtsratsvorsitzender: Dirk Hellemans, SGS der Gesellschaft: Hamburg, HRB 6961, Amtsgericht Hamburg

Anexo 2 – Continuação.

General Information:

Sample No.:	180420897
Sample:	Sunflower protein (SUNPROTEIN white) 32 Pallets
Date of receipt:	30.04.2018
Testing period (begin / end):	30.04.2018 / 15.05.2018
Quantity:	1361g
Packaging:	Plastic bag
Seal/lead:	SGS D139

Test Results:

Parameter	Method	Lab	Unit	Result	Limit of detection	Requirements
Microbiological analysis:						
Total Viable Count	DIN EN ISO 4833-1 / PCA / 30°C/72h	HH	cfu/g	100	100	
Yeasts (incl. osmophilic yeast)	ISO 21527-2 / DG18 / 25°C/120h	HH	cfu/g	< 100	100	
Moulds (incl. xerophilic moulds)	ISO 21527-2 / DG18 / 25°C/120h	HH	cfu/g	100	100	
Enterobacteriaceae	DIN EN ISO 21528-2 /VRBD/37°C/24h[(1)]<	HH	cfu/g	< 10	10	
Coliform bacteria	ISO 4832 / VRBL / 37°C/22h	HH	cfu/g	< 10	10	
E. coli	DIN EN ISO 16649-3 / MGM 37°C/22h / TBX 44°C/20h	HH	in 1 g	negative		
Coagulase-positive-staphylococci	DIN EN ISO 6888-2 / RPF / 37°C/45h	HH	cfu/g	< 10	10	
Presumptive Bacillus cereus	DIN EN ISO 7932 / MYP /30°C/48h	HH	cfu/g	< 100	100	
Salmonella spp.	DIN 10135 - PCR[(2)]	HH	in 25 g	negative		

(1) Presumptive Enterobacteriaceae. Evaluation according to DIN EN ISO 21528-2:2017-09 Section 9.4. without further subculture and biochemical confirmation of typical colonies.

(2) The DNA extraction, amplification and real-time detection were carried out with the test kits "foodproof ® StarPrep One Kit" and "foodproof ® Salmonella detection kit, 5 'nuclease" the Biotecon Diagnostics GmbH (14473 Potsdam - Germany) in accordance with the manufacturer's specifications - NordVal-number: 023

Compiled by: 17.05.2018 i.A. Saskia Schock Customer Service Consultant Agriculture.
Approved by: 17.05.2018 i.A. Ronja Grey Customer Service Consultant Agriculture.

The test results refer exclusively to the examinded test items and the date of the test under the test specifications. The publication and duplicating of our test reports and expert opinions for advertising purposes as well their use for any other purposes in extracts requires our written approval.
Geschäftsführer: Stefan Steinhardt, Aufsichtsratsvorsitzender: Dirk Heilenkamp, Sitz der Gesellschaft: Hamburg, HRB 4961, Amtsgericht Hamburg

Anexo 2 – Continuação

Sample 180420897	Sunflower protein (SUNPROTEIN white); 32 Pallets					
Parameter	Method	Lab	Unit	Result	Limit of quantification	Requirements
Mycotoxins:						
Aflatoxin B1	ASU L 00.00-50a(EG), SOP M1386, LC-MS/MS	HH	µg/kg	< 0,2	0,2	
Aflatoxin B2	ASU L 00.00-50a(EG), SOP M1386, LC-MS/MS	HH	µg/kg	< 0,2	0,2	
Aflatoxin G1	ASU L 00.00-50a(EG), SOP M1386, LC-MS/MS	HH	µg/kg	< 0,2	0,2	
Aflatoxin G2	ASU L 00.00-50a(EG), SOP M1386, LC-MS/MS	HH	µg/kg	< 0,2	0,2	
Sum of Aflatoxins B/G	calculated	HH	µg/kg	< 0,2		

Compiled by: 17.05.2018 i.A. Saskia Schock Customer Service Consultant Agriculture.
Approved by: 17.05.2018 i.A. Ronja Giey Customer Service Consultant Agriculture.

The test results refer exclusively to the examinded test items and the date of the test under the test specifications. The publication and duplicating of our test reports and expert opinions for advertising purposes as well their use for any other purposes in extracts requires our written approval.
Geschäftsführer: Stefan Steinhardt, Aufsichtsratsvorsitzender: Dirk Hellemans, Sitz der Gesellschaft: Hamburg, HRB 4961, Amtsgericht Hamburg

Anexo 2 – Continuação

Sample 180420897	Sunflower protein (SUNPROTEIN white); 32 Pallets					
Parameter	Method	Lab	Unit	Result	Limit of quantification	Maximum residue level

Parameter	Method	Lab	Unit	Result	Limit of quantification	Maximum residue level
Pesticides - Multimethod:						
Abamectin, sum	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,050	0,050	-
Acephate	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Acetamiprid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Acrinathrin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Alachlor	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Aldoxycarb	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Aldrin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Allethrin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Ametoctradin	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Amisulbrom	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Anilofos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Atrazine	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Azinphos-ethyl	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Azinphos-methyl	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Azoxystrobin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Barban	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Benalaxyl	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Benfluralin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Bifenox	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Bifenthrin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Bioresmethrin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Biphenyl	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Bitertanol	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Boscalid	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Bromacil	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Bromocyclen	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Bromophos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Bromophos-ethyl	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Bromopropylate	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Bromuconazole	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Buprofezin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Butamifos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Butocarboxim (incl. -sulfoxide)	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Butocarboxim-sulfoxide	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Butralin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Cadusafos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Captafol	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Captan	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Captan, sum	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Carbaryl	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Carbendazim/Benomyl, in total calc.	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Carbophenothion	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Carboxin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-

The test results refer exclusively to the examinded test items and the date of the test under the test specifications. The publication and duplicating of our test reports and expert opinions for advertising purposes as well their use for any other purposes in extracts requires our written approval.
Geschäftsführer: Stefan Eberhardt, Aufsichtsratsvorsitzender: Dirk Hellemans, Sitz der Gesellschaft: Hamburg, HRB 4961, Amtsgericht Hamburg

Anexo 2 – continuação

SGS

Your order/project: .
Your purchase order number: .

Test Report 3823277
Order 4544074 Sample 180420897

Page 6 of 14
17.05.2018

Sample 180420897	Sunflower protein (SUNPROTEIN white); 32 Pallets					
Parameter	Method	Lab	Unit	Result	Limit of quantification	Maximum residue level
Carfentrazone-ethyl	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chinomethionat	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chlorantraniliprole	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chlorbenzilat	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chlorbufame	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Oxy-chlordane	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chlordan, sum	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chlordimeform	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Chlorfenapyr	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chlorfenson	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Chlorfenvinphos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chlorfluazuron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chlormephos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chlorpropham	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chloropropylate	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chlorpyrifos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chlorpyrifos-methyl	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chlorthal-dimethyl	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chlorothalonil	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chlorthion	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chlorthiophos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chlozolinate	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Clofentezine	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Clomazone	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Clothianidin	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Crotoxyphos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Coumaphos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Cyanofenphos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Cyanophos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Cyfluthrin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Cyhalothrin, lambda-	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Cymoxanil	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Cypermethrine, alpha-	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Cypermethrin, sum	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Cyphenothrin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Cyproconazole	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Cyprodinil	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
DDT, sum calc.	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
DEF	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Deltamethrin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Demeton-S-methyl	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Desmethy-formamido-pirimicarb	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Dexmethylpirimicarb	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Diafenthiuron	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Dialifos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Diallate	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Diazinon	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Dichlobenil	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Dichlofenthion	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-

Compiled by: 17.05.2018 i.A. Saskia Schock Customer Service Consultant Agriculture.
Approved by: 17.05.2018 i.A. Ronja Grey Customer Service Consultant Agriculture.

The test results refer exclusively to the examinded test items and the date of the test under the test specifications. The publication and duplicating of our test reports and expert opinions for advertising purposes as well their use for any other purposes in extracts requires our written approval.
Geschäftsführer: Stefan Steinhardt, Aufsichtsratsvorsitzender: Dirk Heitemann, SG der Gesellschaft: Hamburg, HRB 6951, Amtsgericht Hamburg

Anexo 2 – Continuação

SGS

Your order/project: .
Your purchase order number: .

Test Report 3823277
Order 4544074 Sample 180420897

Page 7 of 14
17.05.2018

Sample 180420897	Sunflower protein (SUNPROTEIN white); 32 Pallets					
Parameter	Method	Lab	Unit	Result	Limit of quantification	Maximum residue level
Dichlofluanid	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Dichlorvos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Diclofop-methyl	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Dicloran	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Dicofol, sum	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Dicrotophos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Dieldrin, in total calc.	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Difenoconazole	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Diflubenzuron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Dimefox	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Dimethoate	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Omethoate	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Dimethomorph	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Dimethylvinphos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Diniconazole	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Dinitramin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Dinobuton	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Dinocap	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Dioxabenzofos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Dioxathion	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Diphenylamine	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Disulfoton, in total calc.	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Ditalimfos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Edifenphos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Endosulfan, in total	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Endrin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Endrin ketone	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
EPN	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Epoxiconazole	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Esbiothrin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Ethion	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Ethirimol	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Ethoprophos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Ethoxyquin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Etofenprox	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Etoxazol	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Etridiazole	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Etrimfos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Famoxadone	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fenamidone	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fenamiphos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fenamiphos-sulfon	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fenamiphos-sulfoxide	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Sum (Fenamiphos, Fenamiphos-sulfon, Fenamiphos-sulfoxide)	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fenarimol	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fenazaquin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-

Compiled by: 17.05.2018 i.A. Saskia Schock Customer Service Consultant Agriculture.
Approved by: 17.05.2018 i.A. Ronja Grey Customer Service Consultant Agriculture.

The test results refer exclusively to the examinded test items and the date of the test under the test specifications. The publication and duplicating of our test reports and expert opinions for advertising purposes as well their use for any other purposes in extracts requires our written approval.
Geschäftsführer: Stefan Eberhardt, Aufsichtsratsvorsitzender: Dirk Heilenans, SGS der Gesellschaft: Hamburg, HRB 4961, Amtsgericht Hamburg

Anexo 2 – Continuação

SGS

Your order/project: .
Your purchase order number: .

Test Report 3823277
Order 4544074 Sample 180420897

17.05.2018

Sample 180420897	Sunflower protein (SUNPROTEIN white); 32 Pallets					
Parameter	Method	Lab	Unit	Result	Limit of quantification	Maximum residue level
Fenbuconazol	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fenchlorphos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fenchlorphos, sum	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fenhexamid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Fenitrothion	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fenpropathrin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fenpropimorph	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Fenpyroximate	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fenson	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Fensulfothion, sum	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fenthion	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fenthion, sum	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fenvalerate, sum	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fipronil	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,003	0,003	-
Flonicamid	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fluazifop-p-butyl	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fluazinam	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Flubendiamide	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fluchloralin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Flucythrinate	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fludioxonil	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Flufenoxuron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fluopicolid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fluquinconazole	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Flusilazole	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Flutriafol	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fluvalinate, tau-	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Folpet	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Folpet, sum (incl. Phtalimide calc. as Folpet)	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Fonofos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Formothion	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fosthiazat	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Halfenprox	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
HCH, alpha-	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
HCH, beta-	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
HCH, delta-	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
HCH, epsilon-	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
HCH, sum	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Heptachlor, in total calc.	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Heptenophos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Hexachlorobenzene	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Hexaconazole	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Hexaflumuron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Hexazinone	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Hexythiazox	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Imazalil	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Imidacloprid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Indoxacarb	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-

Compiled by: 17.05.2018 i.A. Saskia Schock Customer Service Consultant Agriculture.
Approved by: 17.05.2018 i.A. Ronja Grey Customer Service Consultant Agriculture.

The test results refer exclusively to the examinded test items and the date of the test under the test specifications. The publication and duplicating of our test reports and expert opinions for advertising purposes as well their use for any other purposes in extracts requires our written approval.
Geschäftsführer: Stefan Steinhardt, Aufsichtsratsvorsitzender: Dirk Heilenkamp, Sitz der Gesellschaft: Hamburg, HRB 6861, Amtsgericht Hamburg

Anexo 2 – Continuação

Sample 180420897	Sunflower protein (SUNPROTEIN white); 32 Pallets					
Parameter	Method	Lab	Unit	Result	Limit of quantification	Maximum residue level
Iodofenfos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Ioxynil-octanoate	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Iprobenfos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Iprodione	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Isazofos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Isocarbophos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Isodrin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Isofenphos-methyl	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Isoprothiolane	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Kresoxim-methyl	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Leptophos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Lindane (HCH, gamma-)	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Lufenuron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,050	0,050	-
Malathion	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Malaoxon/Malathion, in total	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Mandipropamid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Mecarbam	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Mepanipyrim-2-hydroxypropyl	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Mepanipyrim	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Mepronil	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Metalaxyl, in total calc.	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Metazachlor	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Methacrifos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Methamidophos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Methidathion	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Methomyl	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Methoxychlor	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Methoxyfenozide	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Methylpentachlorphenylsulfide	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Metolachlor	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Metribuzin	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Mevinphos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Mirex	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Molinate	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Monocrotophos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Myclobutanil	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Naled	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
N-desethyl-Pirimiphos-methyl	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Nitralin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Nitrofen	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Nonachlor, trans-	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Novaluron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Nuarimol	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Oxadixyl	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Oxamyl	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Oxydemeton-methyl	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Oxydemeton-methyl, in total calc.	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Oxydemeton-methyl, in total calc.	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-

Compiled by: 17.05.2018 i.A. Saskia Schock Customer Service Consultant Agriculture.
Approved by: 17.05.2018 i.A. Ronja Giey Customer Service Consultant Agriculture.

The test results refer exclusively to the examinded test items and the date of the test under the test specifications. The publication and duplicating of our test reports and expert opinions for advertising purposes as well their use for any other purposes in extracts requires our written approval.
Geschäftsführer: Stefan Eberhardt, Aufsichtsratsvorsitzender: Dirk Hellemans, Sitz der Gesellschaft: Hamburg, HRB 4961, Amtsgericht Hamburg

Anexo 2 – Continuação

SGS

Your order/project: .
Your purchase order number: .

Test Report 3823277
Order 4544074 Sample 180420897

Page 10 of 14
17.05.2018

Sample 180420897	Sunflower protein (SUNPROTEIN white); 32 Pallets					
Parameter	Method	Lab	Unit	Result	Limit of quantification	Maximum residue level
Oxyfluorfen	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Paraoxon	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Parathion (Parathion-ethyl)	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Parathion-methyl, in total calc.	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Penconazole	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Pendimethalin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Pentachloranisol (PCA)	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Pentachlorobenzene	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Permethrin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Phenkapton	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Phenthoate	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
2-Phenylphenol (ortho-)	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Phorate, in total calc.	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Phosalone	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Phosmet	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Phosmet, sum	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Phosphamidon	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Phoxim	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Phtalimide	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Picoxystrobin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Piperonyl-butoxide	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Piperophos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Pirimicarb	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Pirimiphos-ethyl	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Pirimiphos-methyl	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Prochloraz	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Prochloraz sum	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Procymidone	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Profenofos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Profluralin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Prometryn	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Propamocarb	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Propargite	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Propetamphos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Propiconazole	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Propyzamide	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Prothiofos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Pyraclostrobin	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Pyraflufen-ethylene	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Pyrazophos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Pyridaben	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Pyridaphenthion	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Pyrifenox	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Pyrimethanil	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Pyriproxifen	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Quinalphos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Quinoxyfen	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Quintozen, in total calc.	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-

Compiled by: 17.05.2018 i.A. Saskia Schock Customer Service Consultant Agriculture.
Approved by: 17.05.2018 i.A. Ronja Gley Customer Service Consultant Agriculture.

The test results refer exclusively to the examinded test items and the date of the test under the test specifications. The publication and duplicating of our test reports and expert opinions for advertising purposes as well their use for any other purposes in extracts requires our written approval.
Geschäftsführer: Stefan Steinhardt, Aufsichtsratsvorsitzender: Dirk Heilemann, SGI der Gesellschaft: Hamburg, HRB 4961, Amtsgericht Hamburg

Anexo 2 – Continuação

Sample 180420897	Sunflower protein (SUNPROTEIN white); 32 Pallets					
Parameter	Method	Lab	Unit	Result	Limit of quantification	Maximum residue level
Rotenon	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
S421	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Silafluofen	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Simazine	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Spinetoram	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Spinosad	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Spirodiclofen	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Spiromesifen	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Spirotetramat	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Spirotetramat and its Metabolites, cal. as Spirotetramat	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Spiroxamine	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Sulfotep	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Sulprofos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Tebuconazole	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Tebufenozide	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Tebufenpyrad	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Tecnazene	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Teflubenzuron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Tefluthrin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
TEPP	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Terbacil	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Terbufos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Terbufos-sulfon	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Terbufos-sulfoxide	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Terbuthylazine	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Terbutryn	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Tetrachlorvinphos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Tetraconazole	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Tetradifon	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Tetramethrin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Tetrasul	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Thiabendazole	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Thiacloprid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Thiamethoxam	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Thiometon	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Thionazin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
THPI	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Tolclofos-methyl	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Tolfenpyrad	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Tolylfluanid	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Triadimefon	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Triadimenol	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Triallate	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Triamiphos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Triazophos	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Trichlorfon	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Trifloxystrobin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-

Compiled by: 17.05.2018 i.A. Saskia Schock Customer Service Consultant Agriculture.
Approved by: 17.05.2018 i.A. Ronja Grey Customer Service Consultant Agriculture.

The test results refer exclusively to the examinded test items and the date of the test under the test specifications. The publication and duplicating of our test reports and expert opinions for advertising purposes as well their use for any other purposes in extracts requires our written approval.
Geschäftsführer: Stefan Steinhardt, Aufsichtsratsvorsitzender: Dirk Heilemann, Sitz der Gesellschaft: Hamburg, HRB 6951, Amtsgericht Hamburg

Anexo 2 – Continuação

SGS

Sample 180420897	Sunflower protein (SUNPROTEIN white); 32 Pallets					
Parameter	Method	Lab	Unit	Result	Limit of quantification	Maximum residue level
Triflumuron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Trifluralin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Triforin	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Trimethacarb-3,4,5	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Vamidothion	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Vinclozolin	ASU L00.00-34	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Pesticides - Carbamates:	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Aldicarb, calc. in total	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Aminocarb	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Bendiocarb	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Benthiavalicarb-isopropylene	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Butoxycarboxim	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Carbetamide	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Carbofuran, in total calc.	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Cycloat	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Diethofencarb	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Dioxacarb	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
EPTC	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Ethiofencarb (incl. -sulfoxid & -sulfon)	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Ethiofencarb-sulfon, calc.	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Ethiofencarb-sulfoxid, calc.	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fenobucarb	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fenoxycarb	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Furathiocarb	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Iprovalicarb	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Isoprocarb	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Methiocarb, calc in total	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Metolcarb	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Pebulat	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Promecarb	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Propham	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Propoxur	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Prosulfocarb	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Thiobencarb	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Thiofanox-sulfone	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Thiofanox-sulfoxide	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Thiofanox	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-

mpiled by: 17.05.2018 i.A. Saskia Schock Customer Service Consultant Agriculture.
proved by: 17.05.2018 i.A. Ronja Grey Customer Service Consultant Agriculture.

The test results refer exclusively to the examinded test items and the date of the test under the test specifications. The publication and duplicating of our test reports and expert opinions for advertising purposes as well their use for any other purposes in extracts requires our written approval.

Anexo 2 – Continuação

Sample 180420897	Sunflower protein (SUNPROTEIN white); 32 Pallets					
Parameter	Method	Lab	Unit	Result	Limit of quantification	Maximum residue level
Pesticides- Phenylurea herbicides:						
Buturon	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chlorbromuron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chloroxuron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Chlortoluron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Dimefuron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Diuron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fenuron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Forchlorfenuron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Isoproturon	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Linuron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Methabenzthiazuron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Metobromuron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Metoxuron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Monolinuron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Monuron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Neburon	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Pencycuron	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Tribenuron-methyl	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Acidic herbicides (screening):						
2,4,5-T acid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
2,4-DB acid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
2,4-D (free acid)	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Bentazone acid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Bromoxynil acid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Clodinafop (free acid)	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Dichlorprop acid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Diclofop acid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Dinoseb acid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Dinoterb acid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
DNOC acid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Flamprop acid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Fenoprop (free acid)	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-
Fluazifop acid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Fluroxypyr acid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Haloxyfop (free acid)	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Ioxynil acid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
MCPA acid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
MCPB acid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,010	0,010	-
Mecoprop acid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Propoxycarbazone	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,005	0,005	-
Triclopyr acid	DIN EN 15662	B2	mg/kg	< 0,020	0,020	-

Compiled by: 17.05.2018 i.A. Saskia Schock Customer Service Consultant Agriculture.
Approved by: 17.05.2018 i.A. Ronja Giey Customer Service Consultant Agriculture.

The test results refer exclusively to the examinded test items and the date of the test under the test specifications. The publication and duplicating of our test reports and expert opinions for advertising purposes as well their use for any other purposes in extracts requires our written approval.
Geschäftsführer: Stefan Steinhardt, Aufsichtsratsvorsitzender: Dirk Heitenkamp, Sitz der Gesellschaft: Hamburg, HRB 4961, Amtsgericht Hamburg

Anexo 2 – Continuação

Sample 180420897	Sunflower protein (SUNPROTEIN white); 32 Pallets					
Parameter	Method	Lab	Unit	Result	Limit of quantification	Requirements

Parameter	Method	Lab	Unit	Result	Limit of quantification	Requirements
Radionuclides:						
Iodine-131	SOP M 2086, Gamma spectrometry	HH	Bq/kg	< 3	3	
Caesium-134	SOP M 2086, Gamma spectrometry	HH	Bq/kg	< 3	3	
Caesium-137	SOP M 2086, Gamma spectrometry	HH	Bq/kg	< 3	3	

The laboratory sites of the SGS group Germany according to the abbreviations mentioned above are listed at http://www.institut-fresenius.de/filestore/89/laborstandortkuerzelsgs2.pdf.

*** End of test report ***

This document is issued by the Company subject to its General Conditions of Service (www.sgsgroup.de/agb). Attention is drawn to the limitations of liability, indemnification and jurisdictional issues established therein. This document is an original. If the document is submitted digitally, it is to be treated as an original within the meaning of UCP 600. Any holder of this document is advised that information contained hereon reflects the Company's findings at the time of its intervention only and within the limits of client's instructions, if any. The Company's sole responsibility is to its Client and this document does not exonerate parties to a transaction from exercising all their rights and under the transaction documents. Any unauthorized alteration, forgery or falsification of the content or appearance of this document is unlawful and offenders may be prosecuted to the fullest extent of the law.