



RAISSA ALVARENGA CARVALHO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPOLÍMEROS DE
ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE E
NANOFIBRA DE CELULOSE INCORPORADOS
COM ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO**

LAVRAS – MG

2016

RAISSA ALVARENGA CARVALHO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPOLÍMEROS DE ISOLADO PROTEICO
DE SORO DE LEITE E NANOFIBRA DE CELULOSE
INCORPORADOS COM ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Soraia Vilela Borges

Coorientadora

Dra. Marali Vilela Dias

LAVRAS – MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Carvalho, Raissa Alvarenga.

Desenvolvimento de biopolímeros de isolado proteico de soro de leite e nanofibra de celulose incorporados com óleo essencial de tomilho / Raissa Alvarenga Carvalho. – Lavras : UFLA, 2016.

140 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Soraia Vilela Borges.

Bibliografia.

1. Nanobiopolímeros. 2. Embalagem ativa. 3. Caracterização. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

RAISSA ALVARENGA CARVALHO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPOLÍMEROS DE ISOLADO PROTEICO
DE SORO DE LEITE E NANOFIBRA DE CELULOSE
INCORPORADOS COM ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2016.

Dra. Érika Endo Alves UFMG

Dra. Marali Vilela Dias UFLA

Dr. Eduardo Mendes Ramos UFLA

Dra. Soraia Vilela Borges

Orientadora

LAVRAS – MG

2016

A Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida, protegendo-me e guiando-me sempre pelo caminho da paz, amor e serenidade.

OFEREÇO

Aos meus pais, Nádia e Richardson, pelo imenso incentivo, amor e confiança. As minhas irmãs, Rízia, Luma e Lais, pela amizade e carinho. Ao João Paulo, pelo companheirismo e por sempre acreditar em mim.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde, sabedoria e tranquilidade para a realização desta pesquisa.

As minhas orientadoras, professora Soraia Vilela Borges e Marali Vilela Dias principalmente pela confiança, oportunidade, amizade, incentivo e paciência, orientando-me e ensinando-me sempre com muita competência e dedicação. Muito obrigada!

Aos meus pais, Nádia e Richardson, pelo carinho e confiança, mas principalmente pelo incentivo e por sempre estarem comigo, ajudando-me e apoiando-me em cada passo dado. Amo vocês!

As minhas irmãs, Rízia, Luma e Lais, por serem tão amigas, companheiras e amorosas. Cada uma, com seu jeitinho especial, me ajudou muito a chegar até aqui.

Ao João Paulo, por sempre ver o melhor em mim e sempre acreditar que sou capaz! Seu companheirismo, amor e confiança me inspiram a cada dia.

A minha avó Lia, por me acolher em sua casa durante boa parte dessa etapa e pelo enorme carinho e preocupação com que cuida de mim.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Embalagens e de Secagem da UFLA, e de outros departamentos, Taline, Jayne, Flávia, Lucas, Débora Simões, Débora Regina, Viviane, Tamara, Camila, Gerson, Pedro, Rhana, Eloá, Hugo, Lisiane, pelo auxílio nas análises, pelas conversas e risadas, vocês com certeza deixaram minha caminhada mais fácil.

Em especial à Taline, um anjo em forma de amiga. Obrigada por toda a ajuda e compromisso, mas principalmente pela amizade, pelo jeitinho tranquilo, pelas risadas, almoços e também desabafos. Espero carregar sua amizade pra toda vida!

Também à Viviane por toda a ajuda durante o experimento e por me socorrer tantas vezes, sempre com paciência e didática em ensinar! E também ao Pedro por me auxiliar nas análises estatísticas.

Ao Laboratório de Carnes da UFLA, pelo apoio técnico e científico durante a execução de parte do projeto, em especial ao professor Eduardo pela paciência, confiança, atenção e ensinamentos e por me receber no laboratório para o desenvolvimento do projeto. Também a todos os integrantes do Laboratório de Carnes, por me receberem com carinho.

Ao Departamento de Química da UFLA, em especial à Priscila e Lidiany, pela paciência e auxílio nas análises cromatográficas e de infravermelho.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Microestrutural (LME) da UFLA, em especial à Elisa e Aline pela ajuda nas análises de Microscopia.

A professora Maria Irene Yoshida da UFMG, pelo auxílio nas análises térmicas.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Marali Vilela Dias, Prof. Eduardo Mendes Ramos, Profa. Érika Endo Alves e Éber Antônio Alves Medeiros.

À Universidade Federal de Lavras e aos professores e funcionários do Departamento de Ciência dos Alimentos, pelos conselhos, ensinamentos e oportunidade concedida para a realização do mestrado.

Aos meus amigos e todos aqueles que acreditaram em mim e que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta etapa.

Muito obrigada!

*“Não existe grandeza onde não
há simplicidade, bondade e
verdade.”*

(Leon Tolstoi)

RESUMO GERAL

Neste trabalho foi desenvolvida uma embalagem ativa de isolado proteico de soro de leite (IPS) e nanofibra de celulose (NFC) incorporada com óleo essencial de tomilho (OET). O IPS foi utilizado como base polimérica para os filmes, glicerol como agente plastificante, NFC como agente de reforço e OET como agente antioxidante. Na primeira etapa do estudo foi selecionada a melhor concentração de NFC com base nos resultados obtidos pelas análises de espessura, solubilidade, morfologia (MEV), propriedades mecânicas, de permeabilidade (PVA) e óptica. Na segunda etapa, os filmes foram adicionados de diferentes concentrações de OET e caracterizados quanto às propriedades morfológicas (MEV), térmicas (DSC e TGA), estruturais (DRX e FTIR), mecânicas, de PVA e ópticas. Na última etapa foram avaliadas as atividades antioxidantes do OET e dos nanobiopolímeros ativos e realizada a aplicação dos filmes em carne moída (*Biceps femoris*) com o objetivo de se avaliar a capacidade de prevenção da oxidação das carnes pelos filmes ativos, através da análise do índice de TBARS e da cor objetiva, durante o armazenamento a $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 4 dias. Como resultados, a adição de NFC nas concentrações intermediárias (2 e 4% p/p) permitiu a formação de filmes mais resistentes à água, menos permeáveis, mais rígidos e menos elásticos, com boa dispersão da nanopartícula pela matriz polimérica. Para o filme adicionado da maior concentração de NFC (6% p/p), observou-se a tendência de aglomeração da nanopartícula, com manutenção das propriedades analisadas. Não houve diferença na cor e transparência dos nanobiopolímeros adicionados de NFC. A adição de 4% (p/p) de NFC foi selecionada para posteriores estudos e aplicações. A incorporação de diferentes concentrações de OET permitiu a formação de filmes com boa interação entre seus constituintes, elevado índice de cristalinidade e aumento da temperatura de transição vítrea (T_g), diminuição da permeabilidade e aumento da estabilidade térmica (TGA). Os filmes ficaram menos amarelos, com tendência ao verde, mais pálidos e menos transparentes com a adição de OET. As propriedades mecânicas foram reduzidas e a dispersão das NFC foi diminuída com a adição de OET. A presença dos compostos timol e carvacrol no OET e nanobiopolímeros foram confirmadas por CG, assim como suas atividades antioxidantes por meio das metodologias de análise de sequestro de radicais livres DPPH e sistema β -caroteno/ácido linoleico. Houve diminuição dos valores de oxidação para as amostras de carne moída acondicionadas pelos nanobiopolímeros adicionados de OET (TBARS) e o tratamento incorporado de 20% (p/p) de OET foi capaz de manter a cor vermelha das carnes demonstrados pelos resultados de índice de cor a^* , saturação (c^*) e ângulo de tonalidade (h^*). Os resultados indicaram que a utilização de filmes com 4% (p/p) de NFC e 20%

(p/p) de OET foi capaz de melhorar as propriedades dos filmes e prevenir a oxidação da carne moída com consequente manutenção de sua qualidade durante o período de tempo e condições estudadas.

Palavras-chave: Nanobiopolímeros. Embalagem ativa. Caracterização.

GENERAL ABSTRACT

In this study, an active packaging was developed with whey protein isolate (WPI) and cellulose nanofiber (CNF) incorporated with thyme essential oil (TEO). The WPI was used as base polymer for the films, glycerol as a plasticizer, CNF as a reinforcing material and TEO as an antioxidant agent. In the first stage of the study, the best concentration of CNF was selected based on the results obtained by the analysis of thickness, solubility, morphology (SEM), mechanical, permeability (WVP) and optical properties. In the second stage, the films were added with different concentrations of TEO and characterized as the morphological (SEM), thermal (DSC and TGA), structural (XRD and FTIR), mechanical, optical and WVP properties. In the last step, the antioxidant activities of TEO and active nanobiopolymers were evaluated and the application of the films in ground beef (*Biceps femoris*) was conducted in order to evaluate the ability of the active films in preventing the oxidation of meat by the analysis of TBA and color of the samples during storage at $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 4 days. As results, the addition of the intermediate concentrations of CNF (2 and 4% w/w) allowed the formation of films more resistant to water, less permeable, more rigid and less flexible, with good dispersion of the nanoparticle along the polymer matrix. For the higher concentration of CNF (6% w/w), there was a tendency to agglomeration of nanoparticles by the polymer matrix, with maintenance of the properties analyzed. There was no difference in color and transparency of nanobiopolymers added with CNF. The addition of 4% (w/w) of CNF was selected for further studies and applications. The incorporation of different concentrations of TEO (20; 30 and 40% w/w) allowed the formation of films with good interaction between its components, high crystallinity index and increased the glass transition temperature (Tg) and thermal stability (TGA) with also a decreased in the permeability. The films were less yellow, with a tendency to green, paler and with less transparency with the addition of TEO. The mechanical properties were reduced and the dispersion of the CNF was decreased. The presence of the compounds thymol and carvacrol in TEO and nanobiopolymers added with the oil, were confirmed by gas chromatography, as well as its antioxidant activities through analysis of kidnapping free radicals DPPH and β -carotene/linoleic acid system. A decrease of the oxidation values was observed for ground beef samples conditioned by nanobiopolymers added with TEO (TBA) and the treatment added with 20% (w/w) of TEO was able to maintain the red color of the meat shown by the results of color a^* , saturation (C^*) and hue angle (h^*). The results indicated that the use of films with 4% (w/w) of CNF and 20% (w/w) of TEO was able to enhance film

properties and prevent the oxidation of ground beef with a consequent maintenance of quality during the time and conditions studied.

Keywords: Nanobiopolymers. Active packaging. Characterization.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	14
1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Embalagens plásticas e o meio ambiente	16
2.2	Polímeros biodegradáveis	17
2.3	Soro de leite	18
2.3.1	Filmes biodegradáveis de isolado proteico de soro de leite	20
2.4	Nanopartículas em embalagens	21
2.4.1	Nanofibra de celulose	23
2.5	Embalagens ativas antioxidantes	25
2.6	Óleo essencial de tomilho	30
2.7	Carne moída	32
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
	REFERÊNCIAS	35
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	44
	ARTIGO 1 Efeito da nanofibra de celulose como material de reforço em biopolímeros de isolado proteico de soro de leite	44
	ARTIGO 2 Caracterização de nanobiopolímeros ativos de isolado proteico de soro de leite e nanofibra de celulose adicionados de óleo essencial de tomilho	73
	ARTIGO 3 Efeito da aplicação de nanobiopolímeros de isolado proteico de soro de leite e nanofibra de celulose incorporados com óleo essencial de tomilho na oxidação lipídica e cor de carne moída	106

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

As embalagens plásticas para alimentos se tornam cada vez mais importantes para a indústria, sendo caracterizadas como não biodegradáveis e ainda, derivadas de recursos fósseis não renováveis. O descarte e acúmulo desses resíduos na superfície terrestre é motivo de crescente preocupação ambiental, sendo uma das soluções para o problema, o estudo e desenvolvimento de novos materiais, obtidos por meio de fontes renováveis e biodegradáveis.

Os polímeros biodegradáveis são capazes de sofrer decomposição pela ação de microrganismos. Os mais comuns e estudados hoje em dia são derivados de polissacarídeos e de proteínas, e sua utilização na produção de embalagens para alimentos cresce a cada dia. Como exemplos desses compostos utilizados na produção de embalagens alimentares pode-se citar: amido, quitosana, celulose, isolado proteico de soro de leite, concentrado proteico de soro de leite, proteína de soja e de milho, dentre outros.

O isolado proteico de soro de leite (IPS) tem sido amplamente empregado como base polimérica para a produção de embalagens biodegradáveis, sendo obtido principalmente como um subproduto da indústria de queijos. Filmes produzidos a partir desse material geralmente apresentam excelentes propriedades de barreira ao oxigênio e a aromas, transparência e boa capacidade em formar filmes. Porém, o IPS apresenta limitações em suas propriedades mecânicas, de permeabilidade ao vapor de água, solubilidade, e formam filmes com reduzida barreira à luz quando comparados às embalagens plásticas, o que pode dificultar sua utilização em alimentos. Como maneira de solucionar esses

problemas, estudos vêm sendo realizados com a adição de nanopartículas a esses materiais, com resultados promissores sobre a melhoria dessas propriedades.

Dentre as nanopartículas adicionadas a filmes biodegradáveis tem-se a nanofibra de celulose (NFC). Quando incorporada na matriz, ela é capaz de conferir alta rigidez, boa flexibilidade e diminuição da permeabilidade ao vapor de água e solubilidade dos materiais devido à alta interação que essas nanopartículas apresentam com a matriz polimérica dos filmes.

Ainda, devido ao crescente interesse dos consumidores por alimentos que sejam cada vez mais próximos ao “natural”, tem-se a necessidade de se buscar alternativas aos conservantes sintéticos comumente adicionados aos alimentos. O óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) é amplamente conhecido, principalmente, devido a sua atividade antibacteriana e antioxidante, e quando incorporado a filmes alimentares permite a formação de embalagens ativas, sendo essas capazes de prolongar a vida útil do alimento acondicionado.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi de desenvolver uma embalagem ativa biodegradável de IPS e NFC incorporadas com agente antioxidante óleo essencial de tomilho. Os objetivos específicos foram: selecionar uma concentração ótima de NFC para o filme de IPS de acordo com as propriedades de espessura, solubilidade, morfológicas, mecânicas, de barreira e ópticas dos filmes (Artigo 1); caracterizar as embalagens ativas de IPS e NFC contendo óleo essencial de tomilho quanto às propriedades morfológicas, estruturais, térmicas, mecânicas, de barreira e ópticas (Artigo 2); e avaliar as propriedades antioxidantes do óleo essencial de tomilho e das embalagens ativas, além de aplicar os filmes ativos em carne moída, avaliando sua influência sobre a prevenção da oxidação e manutenção da qualidade da carne (Artigo 3).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Embalagens plásticas e o meio ambiente

Os materiais plásticos são amplamente utilizados pela indústria de embalagens de alimentos, apresentando características desejáveis como preço, versatilidade de uso, maciez, leveza, transparência e alta durabilidade (SIRACUSA et al., 2008). Segundo o último levantamento feito pela Associação Brasileira da Indústria do Plástico - ABIPLAST, por meio de dados obtidos da Tabela de Recursos e Usos do IBGE, no ano de 2009 o setor de alimentos e bebidas ocupou a primeira posição no *ranking* de principais setores consumidores de plástico no país, com uso de 16% do total de plástico produzido e utilizado pelos diversos setores de serviços (ABIPLAST, 2016).

As embalagens plásticas de alimentos podem se apresentar na forma rígida, como garrafas e caixas, e também na forma de materiais flexíveis como os filmes e sacolas. Os filmes plásticos vêm ganhando grande espaço no mercado devido a sua variedade de utilização como no recobrimento de frutas, produtos de confeitaria, embalagens de manteiga e margarina, produtos minimamente processados ou já porcionados como carnes e vegetais; possibilitando assim, a redução da troca de umidade entre o alimento e o ambiente, a absorção de oxigênio, migração de lipídeos e melhorias nas propriedades de barreira e proteção física do alimento (SARANTÓPOULOS et al., 2002; SOUSA et al., 2002).

Porém, além de serem considerados como polímeros não biodegradáveis devido ao longo período que necessitam para serem decompostos pelo meio ambiente, os materiais plásticos também são derivados do petróleo, um recurso

não renovável. Seu descarte inadequado é causa de poluição ambiental, com efeito prejudicial sobre a vida selvagem, florestas e cidades (SHAH et al., 2008).

A consciência sobre esses resíduos e seu impacto sobre o meio ambiente tem despertado a preocupação da população mundial e também um grande interesse acerca dos polímeros biodegradáveis, sendo diversos estudos e projetos realizados e propostos com o objetivo de se buscar alternativas viáveis à substituição desses materiais (AZEVEDO et al., 2015; KROCHTA; MULDER-JOHNSTON, 1997; SIRACUSA et al., 2008).

2.2 Polímeros biodegradáveis

O termo “material biodegradável” é usado para descrever materiais que são degradados pela ação enzimática de organismos vivos, tais como bactérias, leveduras e fungos, obtendo como produtos finais da degradação o dióxido de carbono (CO_2), água, biomassa, hidrocarbonetos e gás metano (CH_4) (AVELLA et al., 2005).

Os polímeros biodegradáveis são geralmente divididos em dois grupos com base em sua origem: os sintéticos e os naturais. O primeiro grupo pode ser produzido a partir da síntese química de monômeros naturais; pela mistura destes com monômeros de petróleo; ou ainda produzidos por microrganismos. Já os naturais são diretamente extraídos da biomassa, como os polissacarídeos e proteínas (DOPPALAPUDI et al., 2014).

Esses materiais naturais vêm sendo muito estudados e considerados como potenciais substitutos aos polímeros sintéticos por apresentarem

principalmente dois benefícios: biodegradabilidade e por serem derivados total ou parcialmente de fontes renováveis (AZEVEDO et al., 2015; DIAS et al., 2014; GUERRERO et al., 2014). Como exemplo de materiais que podem originar filmes biodegradáveis tem-se: amido, quitosana, celulose, albumina, gelatina, isolado proteico de soro de leite, poliésteres, poliaminoácidos, polihidróxibutirato, e vários outros (DOPPALAPUDI et al., 2014).

Sendo assim, o uso de materiais biodegradáveis na produção de embalagens alimentares pode contribuir para a solução do problema ambiental relacionado à produção e descarte inadequado das embalagens sintéticas, contribuindo para a preservação e desenvolvimento sustentável (JIMÉNEZ et al., 2012).

2.3 Soro de leite

A Portaria de número 53/2013 (MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) cria o “Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Soro de Leite” e define esse produto como sendo “o líquido obtido a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos, caseína ou produtos lácteos similares” (BRASIL, 2013, p. 6).

O soro de leite é um líquido de cor amarelo-esverdeado, considerado rico nutricionalmente por conter grande variedade de macro e micronutrientes como carboidrato (lactose), lipídeos, proteínas, cálcio, magnésio e vitaminas do complexo B (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006).

Dos nutrientes presentes, destacam-se principalmente as proteínas, pois cerca de 20% de seu total no leite permanecem no soro após o processamento,

sendo consideradas de grande valor nutricional por apresentarem em sua constituição alta concentração e variedade de aminoácidos essenciais. Esses aminoácidos são necessários ao metabolismo humano, mas não são sintetizados por ele, sendo então supridos por meio da alimentação. As principais proteínas presentes no soro de leite são as β -lactoglobulinas, α -lactalbuminas, albumina de soro bovino, imunoglobulinas e proteose-peptonas, que quando adicionadas aos produtos alimentícios, acrescentam valor nutricional e propriedades funcionais tecnológicas muito desejáveis como solubilidade, emulsificação e formação de espuma (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006; ORDOÑEZ, 2005; PAGNO et al., 2009).

Em média, para cada quilo de queijo produzido, são gerados 9 kg de soro de leite. Há alguns anos, a grande maioria desse subproduto era descartada em rios, mares e esgoto, causando um grande problema ambiental devido à alta taxa de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) que esse material apresenta, cerca de 100 vezes maior que a do esgoto doméstico, o que o torna então, um produto muito poluente (GHALY; KAMAL, 2004; ZACARCHENCO et al., 2013).

Porém, hoje em dia, inúmeros produtos já estão sendo desenvolvidos pela indústria de alimentos a fim de aumentar sua utilização e aproveitamento. Dentre eles podemos citar: soro de leite em pó, concentrado proteico de soro de leite (CPS), isolado proteico de soro de leite (IPS), bebidas lácteas, doce de leite, sorvetes, lactose, entre outros (GIROTO; PAWLOWSKY, 2001).

Assim sendo, tendo em vista seu alto valor nutricional, variedade de aplicação e o grande impacto que seu descarte inadequado acarreta ao meio ambiente, o estudo de sua utilização e aplicação na indústria de alimentos torna-se muito interessante.

2.3.1 Filmes biodegradáveis de isolado proteico de soro de leite

Os produtos CPS e IPS são obtidos a partir da concentração do soro de leite por filtração e diferem entre si basicamente pelo teor de proteínas e lactose presentes. Nesses produtos, observamos uma relação inversa entre esses dois nutrientes, onde na medida em que o teor de proteína aumenta, o de lactose diminui. Para o CPS o teor proteico pode variar de 35% a 80% e para o IPS essa concentração deve ser acima de 90% (KRESIC et al., 2008; PAGNO et al., 2009).

Filmes biodegradáveis geralmente são produzidos pelo método *casting* (“processo úmido”), onde a base do filme é dissolvida em solvente e depois seca. A escolha da base polimérica é importante para a obtenção de filmes facilmente removíveis de suas superfícies de secagem sem apresentar enrugamento ou rasgamento do material (THARANATHAN, 2003).

O IPS tem sido utilizado com muito sucesso como base polimérica na produção de filmes biodegradáveis em virtude de essas embalagens serem capazes de impedir mudanças na qualidade de alimentos processados, aumentando sua vida útil por apresentarem excelentes propriedades de barreira ao oxigênio, odores e aromas. Além disso, também apresentam elevada transparência, são facilmente removidos durante o processo de produção por *casting* e altamente disponíveis como subproduto da indústria de queijos (AZEVEDO et al., 2015; GOUNGA; XU; WANG, 2007; HERNANDEZ-IZQUIERDO; KROCHTA, 2008; SABATO et al., 2001; SEYDIM; SARIKUS, 2006).

Em contrapartida, devido à natureza hidrofílica das proteínas, esses filmes apresentam alta permeabilidade ao vapor de água e solubilidade

(KOKOSZKA et al., 2010; RAMOS et al., 2013), além de se apresentarem frágeis e pouco maleáveis, necessitando da adição de materiais de reforço que sejam capazes de incrementar essas propriedades (AZEVEDO et al., 2015; GOUNGA; XU; WANG, 2007; RAMOS et al., 2013; SOTHORNVIT; RHIM; HONG, 2009).

2.4 Nanopartículas em embalagens

A nanotecnologia pode ser definida como a ciência que estuda materiais com partículas que apresentem pelo menos uma de suas dimensões em escala nanométrica, na ordem de 1–100 nm. Esses materiais são chamados de nanopartículas e por apresentarem grande área superficial, frequentemente exibem propriedades físicas e químicas diferentes do mesmo material em escala macroscópica (AZEREDO, 2009).

A produção de nanopartículas pode ser realizada utilizando-se duas metodologias: “*top down*” e “*bottom up*”. A mais utilizada em escala industrial se refere à abordagem *top-down*, onde os materiais em escala nanométrica são obtidos a partir do cisalhamento do material em maior escala. Já para a abordagem *bottom-up*, as nanopartículas são obtidas através da junção de átomos ou moléculas que possuam capacidade de se auto agregarem (AZEREDO, 2009; SOZER; KOKINI, 2009).

As aplicações da nanotecnologia estão mais comumente presentes nas ciências médicas e de diagnósticos, produção de energia, computação molecular e materiais estruturais. A indústria de alimentos, por outro lado, apresenta lenta adaptação a essa área da ciência que pode ser explicada pela crescente preferência dos consumidores a produtos “naturais” e uma ligeira preocupação

em relação às nanopartículas no que diz respeito à falta de conhecimento sobre seus possíveis efeitos sobre a saúde humana e o meio ambiente, já que suas propriedades físicas, químicas e biológicas podem ser diferentes dos materiais convencionais, e por isso seus efeitos e impactos não podem ser previstos (CHAU; WU; YEN, 2007; DUNCAN, 2011; SOZER; KOKINI, 2009). Ainda, existem poucos regulamentos e são referentes a nanopartículas específicas. Esse fato está associado à falta de ferramentas legais e científicas e informações de forma a se controlar o crescimento desse mercado (ASSIS et al., 2012).

Porém, pesquisadores e indústria confirmam o grande potencial de utilização da nanotecnologia em todos os segmentos da indústria de alimentos: agricultura, processamento, embalagens e suplementos alimentares, e ainda, destacam o setor de embalagens como o mais promissor devido a uma maior aceitação dos consumidores por essa junção, visto que a nova tecnologia estaria presente “fora do alimento” e não adicionada diretamente ao produto. Como exemplos dos benefícios que as nanopartículas podem trazer às embalagens de alimentos, citam-se o auxílio na produção de sensores de microrganismos patogênicos, de gases ou de violação do produto e de proteção contra raios U.V, além da formação de filmes poliméricos mais fortes e impermeáveis e liberação controlada de compostos (AZEVEDO et al., 2015; BOUWMEESTER et al., 2009; DIAS et al., 2014; DUNCAN, 2011).

A nanotecnologia aplicada a polímeros é definida como uma grande área de pesquisa, desenvolvimento e atividade industrial que envolve o projeto, fabricação, processamento e a aplicação de materiais de base polimérica preenchidos por nanopartículas. O fato de as nanopartículas apresentarem maior superfície de contato que o material em escala macroscópica favorece a interação desse material com a matriz polimérica dos biopolímeros

incrementando as características finais do filme (AZEREDO, 2009; SILVESTRE; DURACCIO; CIMMINO, 2011).

Dentre as inúmeras vantagens de se ter nanopartículas misturadas às matrizes poliméricas de filmes biodegradáveis ressaltam-se vantagens econômicas e ambientais, a segurança de não se ter nenhuma interação crítica (direta) entre as nanopartículas e os alimentos acondicionados, diminuição do gasto de energia necessário para a reciclagem, aumento da biodegradabilidade, incremento da barreira ao vapor de água e propriedades mecânicas, entre outros (AZEVEDO et al., 2015; DIAS et al., 2014; SANTOS et al., 2014; SILVESTRE; DURACCIO; CIMMINO, 2011).

Apesar da sua ampla variedade de aplicação, pouco se sabe acerca dos efeitos das nanopartículas sobre o meio ambiente e saúde humana, visto que os materiais apresentam elevada superfície de contato e propriedades químicas e físicas diferentes dos materiais em escala macroscópica (ASSIS et al., 2012), sendo necessários estudos sobre a migração dessas partículas adicionadas às embalagens para os alimentos e seus efeitos toxicológicos (MUNK et al., 2015).

2.4.1 Nanofibra de celulose

Além de ser amplamente distribuída pelo planeta, a celulose é derivada de fontes renováveis e tida como biodegradável, sendo considerada como uma substituta promissora às matérias-primas derivadas do petróleo (JONOOBI et al., 2015; SIRÓ; PLACKETT, 2010). Além disso, o fato de serem subprodutos da indústria e apresentarem baixo custo são atrativos à sua utilização.

Ela é produzida por plantas, árvores e bactérias através da polimerização e condensação de moléculas de glicose oriundas do processo de fotossíntese. Em sua forma nativa, a celulose se apresenta principalmente na forma cristalina, mas também são encontradas regiões amorfas na estrutura, que permitem a quebra da molécula em porções menores, por exemplo, durante a hidrólise ácida (EICHHORN, 2011).

A nanofibra de celulose pode ser obtida por meio da hidrólise ácida, onde se originam estruturas puramente cristalinas, chamadas na literatura de *whiskers* de celulose; ou ainda por meio do processamento mecânico que podem incluir metodologias de cisalhamento, microfluidização, sonificação, dentre várias outras, e que vão originar estruturas de nanocelulose que apresentam regiões cristalinas e amorfas (BUFALINO, 2014; EICHHORN, 2011). E elas também podem ser obtidas a partir de diversos materiais celulósicos como: eucalipto, algodão, beterraba, banana, cana de açúcar, celulose bacteriana, palha, entre outros (JONOBI et al., 2015; MORAIS et al., 2013).

Diversos estudos têm demonstrado a eficácia da adição de nanofibra de celulose a polímeros biodegradáveis com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas e de barreira, resultando em nanocompósitos com alta rigidez, boa ductilidade e com excelentes propriedades de permeabilidade ao vapor de água, devido principalmente à alta interação que essas nanopartículas apresentam com a matriz polimérica dos filmes. Estudos relatam que a adição de pequenas concentrações é suficiente para se obter o resultado desejado, e que existe uma tendência em se obter uma baixa concentração para a melhoria das propriedades, visto que a adição de concentrações elevadas pode provocar a redução ou manutenção das propriedades iniciais (ABDULKHANI et al., 2014; AZEREDO et al., 2010; SANCHEZ-GARCIA; GIMENEZ; LAGARON, 2008; SANTOS et al., 2014; REDDY; RHIM, 2014).

2.5 Embalagens ativas antioxidantes

As funções básicas de uma embalagem são a de isolar o alimento do ambiente externo e protegê-lo das ações de microrganismos, poeira, luz, gases, forças mecânicas e odores que podem vir a modificar as características esperadas para aquele produto. Também é atribuída a ela a função de venda, visto que a maioria dos consumidores associa a embalagem à qualidade do produto acondicionado (SUNG et al., 2013).

Porém, com as mudanças contínuas nas tendências do mercado e demandas dos consumidores atuais, as embalagens de alimentos passam a adquirir novas funções atreladas às já existentes. As exigências dos consumidores e as tendências da produção mundial demandam produtos frescos, saborosos, convenientes e com prazo de validade prolongado, associados a uma qualidade controlada e satisfatória (DAINELLI et al., 2008).

Para suprir essa demanda, surgem no mercado as embalagens ativas e inteligentes. Essas embalagens apresentam como principal característica a interação embalagem-produto e/ou embalagem-meio. Nas embalagens inteligentes tem-se o monitoramento das condições do alimento armazenado ou do ambiente externo à embalagem que indicam ao consumidor a qualidade do produto acondicionado. Já as embalagens ativas são aquelas que têm por objetivo a extensão da vida útil do produto, mantendo ou até mesmo melhorando sua qualidade (DAINELLI et al., 2008; DUTTA et al., 2009).

Dentre as embalagens ativas mais estudadas e já disponíveis no mercado temos as que atuam na absorção de oxigênio, de etileno, no controle de umidade, eliminação ou emissão de CO₂, sobre o controle de sabores e odores e as que liberam de forma progressiva agentes antimicrobianos, antioxidantes, etanol e

preservadores de cor, dentre outros (AZEVEDO et al., 2015; AZEREDO; FARIA; AZEREDO, 2000; CHI; ZIVANOVIC; PENFIELD, 2006; DIAS et al., 2014; PIRES et al., 2013; VERMEIREN et al., 1999).

Dessa forma as embalagens ativas têm ganhado espaço e atenção, pois além de oferecerem as proteções básicas de uma embalagem de alimentos também acrescentam funções que permitem a extensão da vida útil e a melhoria da qualidade do produto, com conseqüente aumento da intenção de compra pelos consumidores.

A oxidação é o principal fator de deterioração de alimentos que contêm lipídeos, provocando redução de seu valor nutritivo pela perda de ácidos graxos essenciais e pela formação de substâncias secundárias potencialmente tóxicas ao organismo. O principal substrato da oxidação são os ácidos graxos insaturados, sendo suas duplas ligações, centros ativos que podem reagir com o oxigênio (MOURE et al., 2001; ORDOÑEZ, 2005).

A oxidação lipídica pode ocorrer por meio das vias de fotoxidação, autoxidação e oxidação enzimática. A fotoxidação se dá pela reação de ácidos graxos insaturados com a radiação UV na presença de sensibilizadores (ex: clorofila, mioglobina) e oxigênio como intermediário reativo, com formação de hidroperóxidos (produtos primários da degradação) e aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos (produtos finais da degradação) (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A autoxidação é um processo que evolui ao longo do tempo, podendo-se distinguir três etapas (CHLOE; MIN, 2006): iniciação, propagação e término (Figura 1).

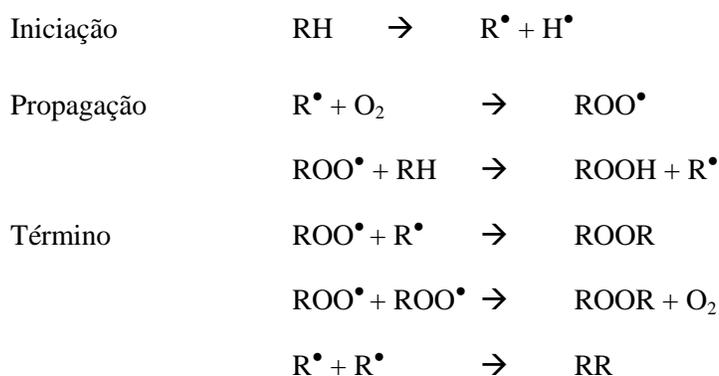


Figura 1 Etapas de desenvolvimento da autooxidação. (RH = ácido graxo insaturado; R^{\bullet} = radical livre; ROO^{\bullet} = radical peróxido; $ROOH$ = radical hidroperóxido).

Na etapa de iniciação ocorre a formação de radicais livres resultantes da retirada do átomo de hidrogênio do carbono alílico da molécula de ácido graxo, sendo a reação acelerada na presença de catalisadores metálicos como o cobre e ferro, e na presença de enzimas, luz e calor. Na etapa de propagação, os radicais livres (susceptíveis ao ataque de oxigênio) atuam como propagadores da reação e são convertidos em produtos primários da oxidação lipídica (peróxidos e hidroperóxidos). No final da reação, os radicais combinam-se formando produtos estáveis, chamados produtos secundários (alcanos, alcenos, aldeídos e cetonas), obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (CHLOE; MIN, 2006).

Para a oxidação enzimática tem-se a atuação da enzima lipoxigenase, com formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações e semelhante ao processo de autooxidação, podendo formar diversos produtos, com a diferença de ser mais específico quanto ao substrato e produtos da oxidação (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Antioxidantes podem ser definidos como substâncias que em concentrações menores que as do substrato oxidável, retardam a oxidação

(rancificação), diminuindo a velocidade da reação e, conseqüentemente, a deterioração do produto (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Os antioxidantes podem ser classificados em dois grupos: primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia de radicais por ceder hidrogênio ao radical lipídico livre ou aos produtos gerados durante a fase de propagação, fazendo com que estes assumam a forma de radical estável, conforme Figura 2 (APAK et al., 2013).

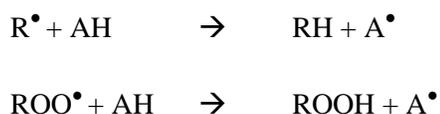


Figura 2 Mecanismo de atuação de antioxidantes primários. (R^{\bullet} = radical livre; AH = antioxidante primário; ROO^{\bullet} = radical peróxido).

Como exemplo de antioxidantes pertencentes a esse grupo tem-se os polifenóis, como o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) que são sintéticos, e os tocoferóis que são naturais (RAMALHO; JORGE, 2006).

Já os antioxidantes classificados como secundários atuam na diminuição da etapa de iniciação da oxidação, por serem, por exemplo, agentes quelantes de catalisadores metálicos como o ferro e o cobre; sequestradores de oxigênio, por atuarem na decomposição de hidroperóxidos formando espécies não radicais, absorvendo radiação UV, dentre outros (APAK et al., 2013; LUZIA; JORGE, 2009).

Como forma de retardar o processo de oxidação dos alimentos, a indústria opta por adicionar antioxidantes sintéticos diretamente sobre os produtos, sendo os mais comuns utilizados atualmente, o BHT, BHA e TBHQ. Porém, devido à crescente preocupação da sociedade por alimentos mais “naturais” e que ao mesmo tempo não deixem de ser práticos no preparo e consumo, abre-se uma nova demanda no mercado por antioxidantes naturais que apresentem a mesma eficácia dos sintéticos (COSKUN et al., 2014; NERIN et al., 2006; NISA et al., 2015).

Antioxidantes naturais são extraídos de vegetais e plantas. Sua ação é proveniente principalmente dos diversos compostos fenólicos que podem apresentar, os quais podem conferir outras propriedades interessantes, como antimicrobiana e antifúngica (ANDREO; JORGE, 2006).

Embalagens ativas incorporadas com antioxidantes naturais também é uma alternativa interessante à nova demanda da população, pois a adição do composto antioxidante na matriz polimérica do filme que entrará em contato com o alimento, e não diretamente no produto, é capaz de trazer o benefício de retardo da oxidação, com conseqüente aumento da vida útil do produto, assim como de diminuir as possíveis mudanças sensoriais resultantes da aplicação direta do antioxidante no alimento (CHI; ZIVANOVIC; PENFIELD, 2006; KIM; USTUNOL, 2001; NERIN et al., 2006; PIRES et al., 2013).

Pesquisas sobre a aplicação de embalagens ativas antioxidantes e seus efeitos sobre a oxidação dos alimentos estão disponíveis na literatura. Camo, Beltrán e Roncalés (2008) avaliaram o efeito de filmes ativos de alecrim e orégano sobre a oxidação de bifés de carne de cordeiro e observaram uma maior estabilidade oxidativa em ambos os tratamentos quando comparados ao filme controle. Lorenzo, Batlle e Gómez (2014) avaliaram o efeito de filmes ativos de poliestireno contendo 2% de óleo essencial de orégano sobre a prevenção da

oxidação de bifes de carne bovina durante 15 dias de armazenamento à temperatura de $2 \pm 1^\circ\text{C}$, e também encontraram redução dos valores do índice de oxidação das carnes acondicionadas pelo filme ativo comparado ao controle durante o tempo de armazenamento.

Sendo assim, embalagens ativas antioxidantes apresentam grande potencial para aplicações comerciais, principalmente aquelas onde são utilizados antioxidantes naturais.

2.6 Óleo essencial de tomilho

Óleos essenciais podem ser definidos como os óleos extraídos de plantas, sendo utilizados dois métodos principais de extração: por arraste a vapor ou através da prensagem do pericarpo para os casos onde a matéria-prima é cítrica. São compostos principalmente por mono e sesquiterpenos e de fenilpropanóides que lhes conferem suas características sensoriais. As matérias-primas para sua produção incluem folhas, flores, cascas, rizomas e frutos e suas principais aplicações estão na área de perfumaria e cosméticos, alimentos e medicamentos (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

O tomilho (*Thymus vulgaris* L.) é uma erva aromática originária da Europa e amplamente consumida no Brasil. É utilizado como erva medicinal e também na culinária, sendo parte de vários pratos tradicionais, intensificando o sabor de preparações a base de carne, peixe e cozidos (DEL RÉ; JORGE, 2012).

Nos últimos anos, o óleo essencial de tomilho (OET) vem sendo amplamente estudado devido principalmente às suas características antioxidante e antimicrobiana (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008; LEE et al., 2005; SOLIMAN; BADEAA, 2002). Dentre os principais compostos com

atividade antioxidante encontrados no OET destacam-se o timol e o carvacrol, pertencentes à classe dos fenilpropanóides (LEE et al., 2005; MIRANDA, 2010), cujas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 3.

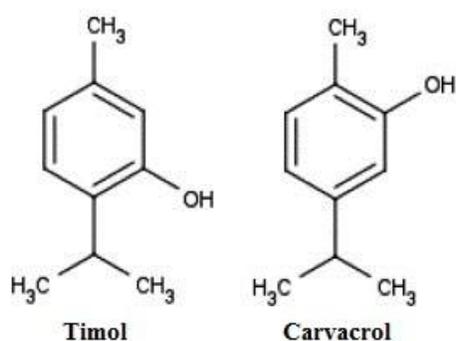


Figura 3 Estrutura química dos principais compostos antioxidantes presentes no OET. Fonte: Ramos et al., (2012).

Como antioxidantes, esses compostos podem atuar de várias formas: ligando-se aos radicais livres, tornando-os estáveis; quelando metais de transição, que atuam como catalisadores da reação de oxidação; interrompendo a fase de propagação; reparando a lesão das moléculas atacadas pelos radicais livres; dentre muitos outros mecanismos (DEL RÉ; JORGE, 2012).

Além disso, o OET apresenta ação antimicrobiana efetiva contra uma ampla variedade de microrganismos, como as bactérias gram-positivas *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, gram-negativas *Escherichia coli* e *Salmonella sp.*, e ainda contra leveduras e fungos (WU; LIN; ZHONG, 2014). De modo resumido, os compostos antimicrobianos do OET podem atuar degradando a parede celular do microrganismo por afetar a dupla camada fosfolipídica da membrana e suas proteínas, com consequente aumento de sua

permeabilidade e perda dos constituintes celulares. Também podem agir alterando o fluxo de elétrons e o mecanismo de transporte ativo, coagulando as estruturas internas da célula e ainda, inibir uma ampla variedade de enzimas ao inativar ou destruir seu material genético (JAYASENA; JO, 2013).

O uso de OET como agente antioxidante em embalagens ativas de alimentos vem sendo amplamente estudado e os resultados são positivos. Jouki et al. (2014) avaliaram o efeito antioxidante de filmes de mucilagem de semente de marmelo adicionados de diferentes concentrações de óleo de tomilho e observaram um aumento da atividade sequestradora de radicais, pelo método DPPH, dos filmes que apresentavam o OET em sua constituição. Coskun et al. (2014) estudaram a eficácia do OET na diminuição da oxidação de hambúrgueres de carne moída e observaram menores concentrações de peróxido, comprovando que o óleo foi capaz de retardar a oxidação.

2.7 Carne moída

A carne bovina é um dos alimentos mais consumidos pela população mundial devido a seu elevado valor nutricional, sendo fonte de proteínas de alto valor biológico, vitaminas, minerais e outros nutrientes (MELO, 2010). O Brasil ocupa o segundo lugar no *ranking* de produção de carne bovina do mundo, sendo ultrapassado apenas pelos Estados Unidos. Em relação aos valores de exportação do produto, o país se consolida em primeiro lugar já há alguns anos, com valor total de exportação de mais de 1,3 milhão de toneladas no ano de 2015 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA EXPORTADORAS DE CARNE - ABIEC, 2015; BRASIL, 2015).

Ela é normalmente comercializada *in-natura*, sendo nessa condição altamente perecível devido à sua composição química, ao elevado teor de

nutrientes e à elevada atividade de água, que favorece o crescimento microbiano, principal fator de deterioração do produto (TORNUK et al., 2015). Além deste fator, a oxidação lipídica e de pigmentos também é causa de sua deterioração, inclusive em armazenamento sob refrigeração, interferindo em suas características de odor, sabor, aroma, cor e textura, com consequente diminuição da aceitabilidade do produto pelo consumidor (BARBOSA-PEREIRA et al., 2014; RAMOS; GOMIDE, 2007).

A carne bovina moída é definida como “o produto cárneo obtido a partir da moagem de massas musculares de carcaças de bovinos, seguido de imediato resfriamento ou congelamento” (BRASIL, 2003, p. 29) e oferece grande risco de contaminação e oxidação devido a sua maior superfície de contato e grande manipulação (NASCIMENTO et al., 2014).

Um dos atributos mais observados pelos consumidores na hora da escolha da carne para compra é a cor do produto (LIMA JUNIOR et al., 2011). Esse parâmetro está associado principalmente à natureza e conteúdo do pigmento mioglobina (Mb), sendo a oxidação um fator que interfere na coloração final. Assim, estratégias que minimizem a formação dos radicais livres e a propagação da reação de oxidação podem ter efeito sobre a coloração da carne bovina e a aceitação do produto por parte do consumidor (RAMOS; GOMIDE, 2007).

Alguns métodos são utilizados para a avaliação da oxidação lipídica das carnes, podendo ser usadas as análises de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de cor objetiva da carne (RAMOS; GOMIDE, 2007).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da nanotecnologia atrelado à criação de embalagens que favoreçam a extensão da vida útil do alimento acondicionado por meio da adição de agentes antioxidantes aumenta consideravelmente o número de possibilidades de novos estudos na área de embalagens alimentares.

O desenvolvimento desses novos tipos de materiais e a caracterização de suas propriedades pelas diversas técnicas existentes são a base para a futura aplicação dessas novas embalagens alimentares, visando à melhoria da qualidade dos alimentos ofertados pelo mercado.

REFERÊNCIAS

ABDULKHANI, A. et al. Preparation and characterization of modified cellulose nanofibers reinforced polylactic acid nanocomposite. **Polymer Testing**, Essex, v. 35, p. 73-79, May 2014.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 319-336, jul./dez. 2006.

APAK, R. et al. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC technical report). **Pure Applied Chemistry**, Raleigh, v. 85, n. 5, p. 957-998 Feb. 2013.

ASSIS, L. M. et al. Review: characteristics of nanoparticles and their potential applications in food. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 99-109, Apr./June 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO PLÁSTICO. **Perfil 2014**: indústria brasileira de transformação de material plástico. Disponível em: <http://file.abiplast.org.br/download/links/2015/perfil_abiplast_2014_web.pdf>. Acesso em: 14 dez. 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. **Brasil avança na reabertura do mercado mundial de carne bovina e projeta aumento das exportações para 2016**. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/noticia.asp?id=1403#.Vm6Z10orLIV>>. Acesso em: 14 dez. 2015.

AVELLA, M. et al. Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. **Food Chemistry**, London, v. 93, n. 3, p. 467-474, Dec. 2005.

AZEREDO, H. M. C. et al. Nanocellulose reinforced chitosan composite films as affected by nanofiller loading and plasticizer content. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, n. 1, p. 1-7, Jan./Feb. 2010.

AZEREDO, H. M. C.; FARIA, J. A. F.; AZEREDO, A. M. C. Embalagens ativas para alimentos. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 337-341, set./dez. 2000.

AZEREDO, H. M. C. Nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**, Barking, v. 42, n. 9, p. 1240-1253, Nov. 2009.

AZEVEDO, V. M. et al. Whey protein isolate biodegradable films: influence of the citric acid and montmorillonite clay nanoparticles on the physical properties. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 43, p. 252-258, Jan. 2015.

BARBOSA-PEREIRA, L. et al. Development of new active packaging films containing bioactive nanocomposites. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 26, p. 310-318, Dec. 2014.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectiva. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, abr. 2009.

BOUWMEESTER, H. et al. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Duluth, v. 53, n. 1, p. 52-62, Feb. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Bovinos e bubalinos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 14 dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 83, de 21 de novembro de 2003. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de carne moída de bovino. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 24 nov. 2003. Seção 1, p. 29. Disponível em: <[http://www.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/4207980b27b39cf903257a0d0045429a/\\$FILE/IN%20N%C2%BA%2083-2003.pdf](http://www.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/4207980b27b39cf903257a0d0045429a/$FILE/IN%20N%C2%BA%2083-2003.pdf)>. Acesso em: 10 set. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 53**, de 10 abril de 2013. Cria o regulamento técnico de identidade e qualidade de soro de leite. Brasília, 2013. Disponível em: <<http://www.terra.com.br/terra/brasil/2013/04/10/portaria-53-2013-cria-regulamento-tecnico-de-identidade-e-qualidade-de-soro-de-leite>>. Acesso em: 10 set. 2015.

BUFALINO, L. **Filmes de nanocelulose obtidos a partir de resíduos madeireiros da Amazônia**. 2014. 107 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia da Madeira) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

CAMO, J.; BELTRÁN, J. A.; RONCALÉS, P. Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. **Meat Science**, Barking, v. 80, n. 4, p. 1086-1091, Dec. 2008.

CHAU, C. F.; WU, S. H.; YEN, G. C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 18, n. 5, p. 269-280, May 2007.

CHI, S.; ZIVANOVIC, S. C. S.; PENFIELD, M. P. Application of chitosan films enriched with oregano essential oil on bologna: active compounds and sensory attributes. **Food Science and Technology**, London, v. 12, n. 2, p. 111-117, Apr. 2006.

CHLOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 5, n. 4, p. 169-186, Sept. 2006.

COSKUN, B. K. et al. Antioxidant active packaging with soy edible films and oregano or thyme essential oils for oxidative stability of ground beef patties. **Journal of Food Quality**, Westport, v. 37, n. 3, p. 203-212, June 2014.

DAINELLI, D. et al. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 19, n. 2, p. 103-112, Feb. 2008.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.

DIAS, M. V. et al. Development of chitosan/montmorillonite nanocomposites with encapsulated α -tocopherol. **Food Chemistry**, London, v. 165, p. 323-329, Dec. 2014.

DOPPALAPUDI, S. et al. Biodegradable polymers: an overview. **Polymers for Advanced Technologies**, Malden, v. 25, n. 5, p. 427-435, May 2014.

DUNCAN, T. V. Application of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 363, n. 1, p. 1-24, Nov. 2011.

DUTTA, P. K. et al. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, London, v. 114, n. 4, p. 1173-1182, June 2009.

EICHHORN, S. J. Cellulose nanowhiskers: promising materials for advanced applications. **Journal Soft Matter**, Cambridge, n. 2, p. 303-315, Aug. 2011.

GHALY, A. E.; KAMAL, M. A. Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. **Water Research**, New York, v. 38, n. 3, p. 631-644, Feb. 2004.

GIROTO, J. M.; PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Brasil Alimentos**, São Paulo, n. 10, p. 43-46, set./out. 2001.

GOUNGA, M. E.; XU, S. Y.; WANG, Z. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 83, n. 4, p. 521-530, Nov. 2007.

GUERRERO, P. et al. Optical and mechanical properties of thin films based on proteins. **Materials Letters**, Amsterdam, v. 124, p. 286-288, June 2014.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 124, n. 1, p. 91-97, May 2008

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. de. Proteínas do soro de leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 4, p. 479-488, jul./ago. 2006.

HERNANDEZ-IZQUIERDO, V. M.; KROCHTA, J. M. Thermoplastic processing of proteins for film formation: a review. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, n. 2, p. 30-39, Mar. 2008.

JAYASENA, D. D.; JO, C. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: a review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 34, n. 2, p. 96-108, Dec. 2013.

JIMÉNEZ, A. et al. Edible and biodegradable starch films: a review. **Food Bioprocess Technology**, New York, v. 5, n. 6, p. 2058- 2076, Aug. 2012.

JONOOBI, M. et al. Different preparation methods and properties of nanostructured cellulose from various natural resources and residues: a review. **Cellulose**, Amsterdam, v. 22, n. 2, p. 935-969, Apr. 2015.

JOUKI, M. et al. Characterization of antioxidant-antibacterial quince seed mucilage films containing thyme essential oil. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 99, p. 537-546, Jan. 2014.

KIM, S. J.; USTUNOL, Z. Sensory attributes of whey protein isolate and candelilla wax emulsion edible films. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 66, n. 6, p. 909-911, Aug. 2001.

KRESIC, G. et al. Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 87, n. 1, p. 64-73, July 2008.

KOKOSZKA, S. et al. Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films. **International Dairy Journal**, Barking, v. 20, n. 1, p. 53-60, Jan. 2010.

KROCHTA, J. M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, Chicago, v. 51, n. 2, p. 60-74, Feb. 1997.

LEE, S. J. et al. Identification of volatile compounds in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus Vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, London, v. 91, n. 1, p. 131-137, June 2005.

LIMA JUNIOR, D. M. et al. Alguns aspectos qualitativos da carne bovina: uma revisão. **Acta Veterinária Brasilica**, Mossoró, v. 5, n. 4, p. 351-358, jan. 2011.

LORENZO, J. M.; BATLLE, R.; GÓMEZ, M. Extension of the shelf-life of foal meat with two antioxidant active packaging systems. **LWT- Food Science and Technology**, Zürich, v. 59, n. 1, p. 181-188, Nov. 2014.

LUIZA, D. M. M.; JORGE, N. Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em testes de estocagem acelerada. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 946-949, jan. 2009.

- MELO, A. A. M. **Efeito de filme ativo incorporado com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na conservação de carne de frango resfriada.** 2010. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.
- MIRANDA, C. A. S. F. **Atividade antioxidante de óleos essenciais de folhas de diversas plantas.** 2010. 152 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, 2010.
- MORAIS, J. P. S. et al. Extraction and characterization of nanocellulose structures from raw cotton linter. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 91, n. 1/3, p. 229-235, Jan. 2013.
- MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, London, v. 72, n. 2, p. 145-171, Feb. 2001.
- MUNK, M. et al. Direct and indirect toxic effects of cotton-derived cellulose nanofibres on filamentous green algae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 122, p. 399-405, Dec. 2015.
- NASCIMENTO, M. V. D. et al. Avaliação da qualidade microbiológica da carne moída fresca comercializada no mercado central em Campina Grande – PB. **Revista Saúde e Ciência**, Campina Grande, v. 3, n. 1, p. 56-68, jan./abr. 2014.
- NERIN, C. et al. Stabilization of beef meat by a new active packaging containing natural antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 20, p. 7840-7846, Oct. 2006.
- NISA, I. U. et al. Development of potato starch based active packaging films loaded with antioxidants and its effect on shelf life of beef. **Food of Science and Technology**, Chicago, v. 52, p. n. 11, p. 7245-7253, Nov. 2015.
- ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos e processos.** Porto Alegre: Artmed, 2005. v. 1, 294 p.
- PAGNO, C. H. et al. Obtenção de concentrados proteicos de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 20, n. 2, p. 231-239, abr./jun. 2009.
- PIRES, C. et al. Hake protein edible films incorporated with essential oils: physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 224-231, Jan. 2013.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, jul./ago. 2006.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias**. Viçosa, MG: UFV, 2007. 599 p.

RAMOS, M. et al. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 109, n. 3, p. 513-519, Apr. 2012.

RAMOS, O. L. et al. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 110-122, Jan. 2013.

REDDY, J. P.; RHIM, J. W. Characterization of bionanocomposite films prepared with agar and paper-mulberry pulp nanocellulose. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 110, p. 480-488, Sept. 2014.

SABATO, S. F. et al. Mechanical and barrier properties of cross-linked soy and whey protein based films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 3, p. 1397-1403, Mar. 2001.

SANCHEZ-GARCIA, M. D.; GIMENEZ, E.; LAGARON, J. M. Morphology and barrier properties of solvent cast composites of thermoplastic biopolymers and purified cellulose fibers. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 71, n. 2, p. 235-244, Jan. 2008.

SANTOS, T. M. et al. Fish gelatin films as affected by cellulose whiskers and sonication. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 41, p. 113-118, Dec. 2014.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. et al. **Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação das propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, 2002. 267 p.

SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, Barking, v. 39, n. 5, p. 639-644, June 2006.

SHAH, A. A. et al. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 3, p. 246-265, May/June 2008.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para a avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, jan./fev. 1999.

SILVESTRE, C.; DURACCIO, D.; CIMMINO, S. Food packaging based on polymer nanomaterials. **Progress in Polymer Science**, Elmsford, v. 36, n. 12, p. 1766-1782, Dec. 2011.

SIRACUSA, V. et al. Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 19, n. 12, p. 634-643, Dec. 2008.

SIRÓ, I.; PLACKETT, D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. **Cellulose**, Amsterdam, v. 17, n. 3, p. 459-494, June 2010.

SOLIMAN, K. M.; BADEAA, R. I. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, n. 11, p. 1669-1675, Nov. 2002.

SOTHORNVIT, R.; RHIM, J. W.; HONG, S. I. Effect of nano-clay type on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/clay composite films. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 91, n. 3, p. 468-473, Apr. 2009.

SOUSA, J. P. et al. Influência do armazenamento refrigerado em associação com atmosfera modificada por filmes plásticos na qualidade de mangas “Tommy Atkins”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 665-668, dez. 2002.

SOZER, N.; KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trend in Biotechnology**, Barking, v. 27, n. 2, p. 82-89, Feb. 2009.

SUNG, S. et al. Antimicrobial agents for food packaging application. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 33, n. 2, p. 110-123, Oct. 2013.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trend in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 14, n. 3, p. 71-78, Mar. 2003.

TORNUK, F. et al. LLEDPE based food packaging incorporated with nanoclays grafted with bioactive compounds to extend shelf life of some meat products. **LWT- Food Science and Technology**, Zürich, v. 64, n. 2, p. 540-546, Dec. 2015.

VERMEIREN, L. et al. Developments in the active packaging of foods. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 10, n. 3, p. 77-83, Mar. 1999.

WU, J. E.; LIN, J.; ZHONG, Q. Physical and antimicrobial characteristics of thyme oil emulsified with soluble soybean polysaccharide. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 144-150, Aug. 2014.

ZACARCHENCO, P. B. et al. Tecnologias para industrialização do soro de leite. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 12.; WORKSHOP DE POLÍTICAS PÚBLICAS, 12.; SIMPÓSIO DE SUSTENTABILIDADE DA ATIVIDADE LEITEIRA, 13., 2013, Porto Velho. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 2013. Disponível em:
<<http://www.cnpqgl.embrapa.br/congresso2013/anais/artigos/qualidade/827.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2015.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

EFEITO DA NANOFIBRA DE CELULOSE COMO MATERIAL DE REFORÇO EM BIOPOLÍMEROS DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE

RESUMO

A adição de nanopartículas em filmes biodegradáveis é uma alternativa interessante para o reforço de suas propriedades. Foram estudados os efeitos da adição de diferentes concentrações de nanofibra de celulose (NFC) (0; 2; 4 e 6% p/p) sobre as propriedades de espessura, solubilidade, morfológica (MEV), mecânica, de permeabilidade ao vapor de água (PVA) e óptica de biopolímeros de isolado proteico de soro de leite (IPS) pelo método *casting* de produção. O experimento foi conduzido em três repetições e houve diferença significativa entre os filmes adicionados de NFC e o filme controle ($p < 0,05$). O filme com 2% (p/p) de NFC apresentou o menor valor de solubilidade. A análise de MEV indicou aglomeração das nanopartículas no filme adicionado da maior concentração de NFC (6% p/p). A resistência à perfuração, resistência à tração e o módulo de elasticidade aumentaram com a adição de NFC nas concentrações de 2 e 4% (p/p), com diminuição da deformação (exceto para NFC4) e porcentagem de alongamento na ruptura, caracterizando filmes mais rígidos e menos elásticos. O biofilme NFC4 apresentou menor valor de PVA. A adição de NFC não resultou em mudanças significativas em suas propriedades ópticas. A partir dos resultados, conclui-se que a adição de 4% (p/p) de NFC originou filmes com melhores propriedades mecânicas e de barreira, características importantes para sua aplicação em alimentos.

Palavras-chave: Nanobiocompósitos. Propriedades mecânicas. Permeabilidade ao vapor de água.

1 INTRODUÇÃO

Embalagens produzidas a partir de plásticos sintéticos estão se tornando um problema cada vez maior para o meio ambiente devido à sua resistência à degradação natural, descarte inadequado, tratamentos pós-consumo que geram poluição (incineração e aterros sanitários) e utilização de recursos não renováveis como matéria-prima para sua produção (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

O uso de polímeros biodegradáveis para a produção de embalagens é uma alternativa interessante ao problema ambiental, pois esses materiais ao serem descartados no meio ambiente serão passíveis de decomposição sendo também derivados de fontes renováveis (PEELMAN et al., 2013; SIRACUSA et al., 2008; TANG et al., 2012).

O isolado proteico de soro de leite (IPS) vem sendo estudado na produção de embalagens alimentares do tipo filme, e desperta grande interesse, pois além de ser um material biodegradável é obtido como um subproduto da indústria de queijos, sendo também um produto comestível (KOKOSZKA et al., 2010; OSÉS et al., 2009; AZEVEDO et al., 2015).

Filmes produzidos a partir de IPS como base polimérica apresentam excelente barreira ao oxigênio, característica importante, pois quando em contato com o alimento, o oxigênio pode provocar degradação e perda de suas características sensoriais e nutritivas por meio do processo de oxidação. Além disso, esses biopolímeros também apresentam boa barreira a aromas, elevada transparência, capacidade de formar filmes e podem ser usados como embalagens ativas, transportando aditivos alimentares, antioxidantes,

antimicrobianos, nutrientes, dentre outros (HONG; KROCHTA, 2003; RAMOS et al., 2012, AZEVEDO et al., 2015).

No entanto, devido às cadeias de aminoácidos presentes na base proteica, esses biopolímeros apresentam natureza hidrofílica, característica que influencia diretamente em suas propriedades de barreira ao vapor de água e solubilidade (KOKOSZKA et al., 2010). O parâmetro de solubilidade pode ser desejável ou não, dependendo da finalidade do material a ser empregado no alimento. Para valores de permeabilidade ao vapor de água, biopolímeros destinados à aplicação em alimentos devem possuir reduzidos valores de permeabilidade, de modo a minimizar as trocas de umidade entre o ambiente e o produto acondicionado (RAMOS et al., 2013). Além disso, filmes produzidos a partir de IPS são frágeis e pouco maleáveis, necessitando da adição de outros materiais de reforço que sejam capazes de incrementar suas propriedades mecânicas (OSÉS et al, 2009; RAMOS et al, 2013; GOUNGA; XU; WANG, 2007).

Uma alternativa bastante utilizada a fim de se obter a melhoria do desempenho de biopolímeros é a adição de materiais em escala nanométrica à sua formulação (OYMACI; ALTINKAYA, 2016; AZEVEDO et al., 2015; ZOLFI et al., 2014). Esses materiais apresentam uma maior área de superfície de contato por peso de material quando comparados com o mesmo em escala macrométrica, permitindo uma maior interação com a matriz polimérica do filme e levando ao melhor desempenho do material estudado (ANDRADE; TAPIA; MENEGALLI, 2011).

Dentre os materiais em escala nanométrica adicionados como material de reforço às soluções filmogênicas de biomateriais temos as nanofibras derivadas de celulose (NFC). A celulose está amplamente distribuída na natureza como componente das fibras vegetais. É derivada, principalmente, de

subprodutos da indústria, podendo ser obtida a partir de diferentes fontes como: algodão, eucalipto, madeira, linho, bagaço de cana de açúcar, beterraba, dentre outros; o que torna sua utilização ainda mais vantajosa do ponto de vista ambiental e econômico (ANDRADE; TAPIA; MENEGALLI, 2011). Possui natureza hidrofílica, fato que leva à alta afinidade com formulações poliméricas de base proteica e também com a maioria dos polímeros naturais (EICHHORN, 2010). Quando adicionadas às embalagens, são capazes de conferir alta rigidez, diminuição da permeabilidade ao vapor de água e solubilidade (AZEREDO et al., 2008; SANTOS et al., 2014).

O objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito da adição de nanofibra de celulose (NFC) como material de reforço em filmes de isolado proteico de soro de leite (IPS), produzidos por *casting*, sobre as propriedades de espessura, solubilidade, morfológica, mecânicas, de permeabilidade ao vapor de água e ópticas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Isolado proteico de soro de leite (IPS - 9400) fornecido pela *Hilmar Ingredients* (Hilmar, CA, EUA), glicerol (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA) e nanofibra de celulose (NFC) cedida pelo Departamento de Engenharia Florestal – UFLA. A NFC foi obtida por meio da agitação mecânica de uma solução contendo 1% de polpa branqueada comercial de eucalipto em água destilada durante 20 minutos com posterior desfibrilação realizada com 30 passagens em moinho Super Mass Coloider (Masuko[®], Japão), obtendo-se, assim, uma suspensão de nanofibra de celulose com teor de sólidos de 1,76% (p/v). A nanofibra apresentou diâmetro médio de aproximadamente 25nm,

medido por microscopia eletrônica de transmissão, conforme descrito por Bufalino (2014).

2.2 Planejamento experimental

O experimento foi conduzido usando um delineamento inteiramente casualizado (DIC). As concentrações de NFC testadas foram de 2, 4 e 6% (p/p) em relação ao polímero base. As codificações utilizadas para os tratamentos foram NFC0, NFC2, NFC4 e NFC6, de acordo com a porcentagem de nanopartícula adicionada. O experimento foi conduzido em três repetições.

2.3 Desenvolvimento dos filmes

Os biopolímeros de IPS e NFC foram produzidos no Laboratório de Embalagens da Universidade Federal de Lavras (UFLA), pelo método *casting* e desenvolvidos de acordo com Azevedo et al. (2015), com algumas modificações. IPS e glicerol foram fixados nas quantidades de 6% (p/v) em relação ao volume de solução e 30% (p/p) em relação ao polímero base. Para a produção do filme NFC0 (controle), IPS e glicerol foram dissolvidos separadamente em água destilada e mantidos sob agitação durante 30 minutos. Para os filmes adicionados de NFC (2; 4 e 6g/100g de IPS), esta foi colocada junto ao glicerol para agitação. Depois disso, as duas soluções foram misturadas e agitadas novamente por 10 minutos, o pH foi corrigido para 8,0 com solução de NaOH 1N e a solução foi agitada em homogeneizador ultrassônico para dispersão das nanopartículas (*Sonifier Cell Disruptor Branson – Modelo 450D*, Manchester, UK) por 10 minutos com amplitude de 80% a 25°C. Posteriormente, as soluções foram levadas a banho-maria a 90°C por 30 minutos, resfriadas e vertidas em

placas de vidro com dimensões de 18 x 30 cm onde permaneceram por 48 horas até que o solvente fosse evaporado, com formação dos filmes. O volume final para cada solução vertida foi de 125mL.

2.4 Condicionamento, espessura e solubilidade dos filmes

Após a retirada dos filmes das placas, fez-se o condicionamento a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e $50 \pm 5\%$, respectivamente, durante 48 horas antes do início das análises (ASTM D618-00, 2000).

A espessura média dos filmes foi medida por meio da leitura de 15 pontos distintos, utilizando micrômetro digital Mitutoyo (precisão 0.01 mm; Mitutoyo Sul Americana, Suzano, SP, Brasil).

A solubilidade dos filmes em água foi determinada por meio da porcentagem de matéria solúvel da amostra de biofilme, segundo Gontard et al. (1992), com algumas modificações. As amostras foram cortadas em quadrados de 3x3cm e colocadas em estufa de secagem por 24 horas a 105°C , com posterior resfriamento e pesagem. Em seguida, cada corpo de prova foi mergulhado em 70mL de água destilada e mantidos sob agitação a 175 rpm, a 25°C por 24 horas. Após este período, as amostras foram novamente secas sob as mesmas condições utilizadas inicialmente e pesadas. A solubilidade dos filmes em água foi então determinada conforme Equação 1.

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{M_{\text{inicial}} - M_{\text{final}}}{M_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (1)$$

Onde: $M_{inicial}$ é a massa (g) da amostra seca no início da análise e M_{final} é a massa (g) no final da análise.

2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Microestrutural (LME) da UFLA, em microscópio LEO EVO 40 XVP (*Zeiss*, Cambridge, Inglaterra), com voltagem de aceleração de 20 kV. As amostras dos filmes apresentavam aproximadamente 2x2mm e anterior à análise, foram fixadas a stubs por fita adesiva dupla face de carbono, e revestidas por banho de ouro sob vácuo (metalização).

2.6 Propriedades mecânicas

As análises de perfuração e tração foram realizadas no Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA, em Analisador de Textura Stable Micro Systems (modelo TA-XT2, Inglaterra), com célula de carga de 1kN. Para a análise de perfuração, as amostras dos filmes foram cortadas em quadrados de 3x3cm, submetidas às medidas de espessura em 4 pontos distintos e fixadas em um suporte metálico com orifício central para passagem da sonda de forma perpendicular. Os parâmetros utilizados durante o teste foram: sonda esférica de 5,0mm de diâmetro (sonda A/TG), velocidade de deslocamento da sonda de 0,8mm/s e distância percorrida por ela após tocar a amostra de 1cm. Para cada tratamento foram analisados 15 corpos de prova (ASTM F1306-90, 2001). A resistência à perfuração/espessura (RP, N/mm) foi calculada por meio da divisão do valor da força máxima obtida no ponto de ruptura pela espessura do filme,

com o objetivo de se eliminar o efeito da variação da espessura sobre os resultados. Já a deformação (D, mm) foi determinada por meio do ponto de ruptura dos corpos de prova.

Para o teste de tração, as amostras foram cortadas em tiras de 10x1,5cm; medidas as espessuras em 3 pontos distintos e fixadas no suporte da sonda pelas duas extremidades. Os parâmetros utilizados durante a análise foram: separação inicial entre as garras de 50mm e velocidade de deslocamento de 0,8mm/s. Para cada tratamento foram analisados 15 corpos de prova (ASTM D882-02, 2002). A resistência máxima à tração (RT, Mpa) foi calculada pela divisão da força máxima pela área transversal do corpo de prova. A porcentagem de alongamento na ruptura (ALR) é calculada pela relação entre o alongamento do corpo de prova e seu comprimento inicial. Para o módulo de elasticidade (ME, Mpa) traçou-se uma tangente à curva tensão de tração x deformação na região linear (região elástica), calculando a razão entre a tensão e a deformação correspondente (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

2.7 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água foi realizada no Laboratório de Embalagens da UFLA, pelo método gravimétrico. Os corpos de prova de cada tratamento foram cortados em discos de 8cm de diâmetro e fixados em cápsulas contendo sílica-gel em seu interior. Estas foram acondicionadas em dessecadores com solução saturada de NaCl e umidade relativa de $75 \pm 3\%$ sob temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Após a montagem das cápsulas, fez-se a pesagem em intervalos de 1 hora durante 8 horas para se obter o ganho de peso relacionado à transferência de vapor de água através do filme (ASTM E96-00, 2002). A taxa de

permeabilidade ao vapor de água e a permeabilidade ao vapor de água foram calculadas segundo as Equação 2 e 3, respectivamente:

$$TPVA = G/t \cdot A \quad (2)$$

Onde: TPVA é a taxa de permeabilidade ao vapor de água (g água/(m².dia)); G/t é o coeficiente angular da reta (g água/dia) e A é a área de permeação do corpo de prova (m²).

$$PVA = \frac{TPVA \cdot e}{\rho_s (UR_1 - UR_2)} \quad (3)$$

Onde: PVA é a permeabilidade ao vapor de água (g m⁻¹ s⁻¹ Pa⁻¹); TPVA a taxa de permeabilidade ao vapor de água; e é a espessura média do corpo de prova (μm); ρ_s a pressão de saturação de vapor de água à temperatura de ensaio (2809 Kpa); UR₁ umidade relativa da câmara e UR₂ umidade relativa do interior da cápsula.

2.8 Propriedades ópticas

Os parâmetros obtidos pela análise de cor foram: L^* , a^* , b^* e índice de saturação (C^*), calculado através da fórmula: $C^* = [(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}]$. A análise de cor dos filmes foi realizada no Laboratório de Embalagens da UFPA, e medida utilizando um colorímetro espectrofotométrico modelo CM-700 (Kônica

Minolta, Japão), com fonte de luz D65, ângulo observador de 10° e reflectância especular incluída (SCI). As leituras foram realizadas com os filmes sobrepostos em papel de coloração branca.

A transparência dos filmes foi medida em espectrofotômetro Bel SPECTRO S-2000 (Monza, Itália) a 600nm, retirando-se a medida de porcentagem de transmitância (%T), segundo ASTM D1746-03 (ASTM D1746-03, 2003). Os filmes foram cortados em pedaços de 3x1cm e fixados de forma a permitir que o feixe do equipamento atravessasse os corpos de prova sem nenhum obstáculo. A transparência (T) foi calculada de acordo com a Equação 4:

$$T = (\text{Log } \%T) / \delta \quad (4)$$

Onde: δ é a espessura do filme (mm).

2.9 Análise estatística

Os dados de espessura (mm), solubilidade (%), RP (Mpa), D (mm), RT (Mpa), ALR (%), ME (Mpa), PVA ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$) e de propriedades ópticas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o software SAS[®] (Cary, SC) ($p < 0,05$) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey. Para os resultados de MEV foram realizadas análises descritivas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Espessura e solubilidade

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) para os resultados de espessura e solubilidade quando os filmes de IPS foram adicionados de NFC, conforme Tabela 1.

O controle dos valores de espessura dos filmes é difícil principalmente quando se utiliza metodologia de produção do tipo *casting*. Variações nesse parâmetro podem levar a mudanças nas propriedades mecânicas, de permeabilidade ao vapor de água e ópticas dos materiais, sendo seu controle importante também para se avaliar sua uniformidade (GALDEANO et al., 2013; PARK; CHINNAN, 1995; HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008). A concentração do material polimérico proteico é um ponto chave no processo de controle da espessura, onde a formação de soluções filmogênicas diluídas deve ser acompanhada do conhecimento do volume total de solução, área do suporte onde o filme será formado e nível da mesa utilizada para secagem do material, evitando desníveis e formação de diferentes espessuras durante a secagem dos filmes (SOBRAL, 2000).

Tabela 1 Espessura e solubilidade de biopolímeros de IPS adicionados de NFC

Filmes	Espessura (mm)	Solubilidade (%)
NFC0	0,160 ^a ± 0,04	28,37 ^a ± 0,02
NFC2	0,147 ^{ab} ± 0,06	25,77 ^b ± 0,49
NFC4	0,135 ^{ab} ± 0,08	28,14 ^a ± 0,16
NFC6	0,133 ^b ± 0,01	29,56 ^a ± 0,53

* Médias observadas em colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Para filmes ativos em que se deseja a liberação controlada de alguns compostos, valores razoáveis de solubilidade são interessantes, pois vão auxiliar na difusão e atuação do componente ativo no alimento. Da mesma forma, um filme com fraca resistência à água, ou seja, com solubilidade elevada, dissolve-se rapidamente perdendo o composto ativo. De forma oposta, para filmes em que se deseja diminuir os valores de permeabilidade ao vapor de água e a manutenção da integridade do produto, serão necessários reduzidos valores de solubilidade, de forma a impedir a dissolução do material no alimento (KROCHTA; BALDWIN; NISPEROS-CARRIEDO, 1994; OZDEMIR; FLOROS, 2008).

A variação da espessura dos filmes de IPS adicionados de NFC foi pequena, com diferença significativa ($p < 0,05$) apenas para o tratamento NFC6, com redução do parâmetro comparado ao filme controle (Tabela 1). Os resultados de espessura encontrados estão próximos aos obtidos por Machado et al. (2014) em biopolímeros de amido e nanocelulose de fibra de coco verde, onde, para os filmes adicionados da maior concentração de nanopartícula a espessura encontrada foi de $0,147 \pm 0,02$ mm. Maté & Krochta (1996) também reportaram espessuras variando de 0,135 a 0,127mm para filmes produzidos com diferentes concentrações de IPS e glicerol pelo método *casting*.

Todos os filmes avaliados apresentaram-se intactos, inteiros e maleáveis após o ensaio de solubilidade. No aspecto visual, os biopolímeros ficaram menos transparentes apresentando-se ligeiramente opacos. O tratamento NFC2 apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais filmes, com redução de 9,16% da solubilidade em água quando comparado ao controle (NFC0), indicando que os filmes de IPS alcançaram a maior resistência à água com a adição de 2% (p/p) de NFC (Tabela 1). Para os tratamentos com maior porcentagem de NFC (4 e 6% p/p), o parâmetro de solubilidade se manteve igual

ao encontrado para o filme controle. A redução da solubilidade com a adição de baixa concentração de nanopartícula pode ser explicada pela atuação da NFC como uma barreira física junto à matriz polimérica de IPS, dificultando de forma direta a absorção e a solubilização dos filmes (MACHADO et al, 2014). Ainda, baixos valores de solubilidade foram encontrados para biopolímeros de IPS por diversos autores (GOUNGA et al, 2007; OZDEMIR; FLOROS, 2008; RAMOS et al, 2012) o que pode ser explicado pela alta interação entre as moléculas proteicas e pela intensidade das ligações dissulfeto entre as cadeias do polímero.

3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 1 representa as micrografias das superfícies dos biopolímeros de IPS adicionados de NFC por meio da análise de MEV.

O biofilme controle (Figura 1a) apresentou superfície lisa e homogênea. A NFC, nos demais tratamentos, caracteriza-se como irradiações na superfície dos biopolímeros (MULLER; LAURINDO; YAMASHITA, 2009). Para os biopolímeros adicionados da nanopartícula nas concentrações de 2 e 4% (p/p), observa-se uma distribuição homogênea das nanopartículas pela superfície dos filmes (Figura 1b e 1c), sem rachaduras.

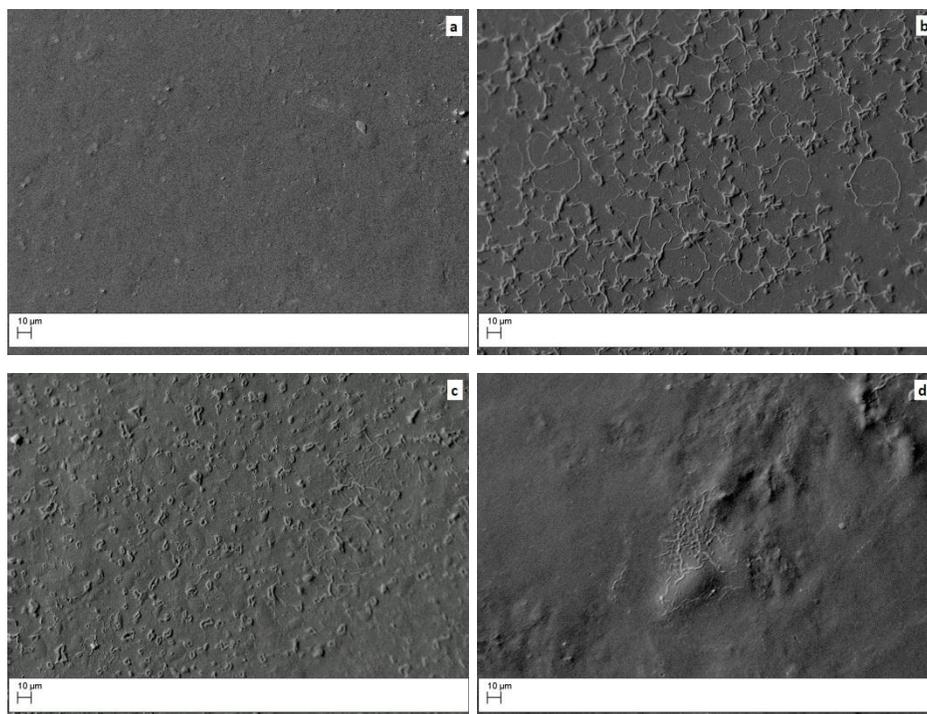


Figura 1 Micrografias de superfície de biopolímeros de IPS adicionados de NFC analisadas por MEV. Aumento de 1000x. a) NFC0; b) NFC2; c) NFC4; d) NFC6.

Para a maior concentração testada (NFC6, Figura 1d) não se tem a mesma distribuição e sim uma aglomeração das NFC em partes distintas da superfície. Resultado semelhante foi encontrado por Santos et al (2014) que estudou o efeito da adição de diferentes concentrações de NFC em biopolímeros de proteína de peixe. Estes autores também observaram a tendência de aglomeração das nanopartículas para o tratamento adicionado de 15% (p/v) de NFC.

A explicação para o encontrado está relacionada a uma possível característica da NFC em apresentar uma concentração ideal para a adição como material de reforço e cujo aumento da concentração está relacionado à maior

interação entra as nanopartículas do que com a matriz polimérica, com consequente aglomeração. Essa formação de pontos de defeito pela matriz está relacionada à manutenção ou piora das propriedades analisadas (SANTOS et al., 2014).

3.3 Propriedades mecânicas

A adição de NFC aos filmes de IPS foi significativa ($p < 0,05$) tanto para os parâmetros avaliados pelo teste de perfuração (RP e D) quanto para o teste de tração (RT, ALR e ME), conforme Tabela 2.

A resistência à perfuração (RP) é definida como a medida da dureza do filme quando este é submetido a uma força aplicada perpendicularmente a sua superfície, e a deformação (D) como a elasticidade que o filme apresenta na mesma situação (DIAS, 2013). Como demonstrado pelos resultados encontrados (Tabela 2), a adição de NFC provocou aumento da RP (N/mm) para os biopolímeros

Tabela 2 Valores de RP, D, RT, ALR e ME de biopolímeros de IPS adicionados de NFC

Filmes	RP (N/mm)	D (mm)	RT (MPa)	ALR (%)	ME (MPa)
NFC0	80,114 ^a ± 0,756	6,012 ^a ± 0,836	5,569 ^{ac} ± 0,001	36,373 ^{ab} ± 2,623	34,219 ^a ± 3,188
NFC2	83,683 ^{ab} ± 4,827	4,214 ^{ab} ± 0,193	7,474 ^b ± 0,001	28,499 ^c ± 1,598	48,101 ^b ± 2,362
NFC4	88,725 ^b ± 2,893	9,931 ^c ± 0,367	6,877 ^c ± 0,001	37,032 ^a ± 0,681	45,447 ^c ± 4,105
NFC6	82,199 ^a ± 4,158	3,537 ^b ± 0,011	6,060 ^a ± 0,006	30,500 ^{bc} ± 1,816	35,643 ^a ± 3,216

* Médias observadas em colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente (P<0,05).

de IPS adicionados das concentrações intermediárias da nanopartícula (2 e 4% p/p), sendo a maior resistência encontrada para o tratamento NFC4; 10,75% a mais que o resultado obtido para o filme controle. Para o tratamento adicionado da maior concentração de NFC (6% p/p) observou-se que o resultado não diferiu estatisticamente do filme controle, e quando comparado ao tratamento NFC4, houve redução de aproximadamente 7,5% do valor. Essa tendência de comportamento também foi relatada por outros autores a partir da utilização de diversas bases poliméricas e adição de NFC (AZEREDO et al., 2009; ABDULKHANI et al., 2014; SANCHEZ-GARCIA; GIMENEZ; LAGARON, 2008) e pode ser atribuído a dificuldade de se obter uma dispersão adequada da nanopartícula pela matriz polimérica dos filmes quando se tem uma concentração elevada do composto. Eles ainda ressaltaram que uma das vantagens da utilização de nanopartículas como material de reforço em filmes é a necessidade de se utilizar baixas concentrações para de obter excelentes resultados, sendo que ao se adicionar concentrações acima da ideal, podem ocorrer aglomerações devido à elevada atração entre as nanopartículas, com formação de ligações de hidrogênio e conseqüente redução do efeito desejado. Essa tendência também foi observada para o presente trabalho, podendo ser confirmada pelos resultados de MEV (Figura 1). A deformação (D/mm) dos filmes quando uma força vertical é aplicada à sua superfície, ou seja, a distância que o material percorre até o momento de sua ruptura, nos remete à sua elasticidade (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Para os resultados de D, observa-se um comportamento de diminuição dos valores exceto para o tratamento NFC4. Esse tratamento apresentou os maiores valores de RP e D, caracterizando um filme com maior resistência à perfuração e elasticidade. Reddy; Rhim (2014) relacionam a diminuição da elasticidade dos filmes a uma maior concentração de nanocelulose, restrição da mobilidade das cadeias do polímero e aumento de sua rigidez.

A resistência à tração (RT) é a resistência máxima oferecida pelo material quando este é submetido à tração (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Para os filmes adicionados de NFC observa-se um comportamento de crescimento nos valores, porém apenas o filme NFC2 apresentou média com diferença significativa dos demais, sendo que a partir da adição de 4% (p/p) de NFC o aumento não se mostrou tão expressivo, não diferindo do filme NFC0. Esse resultado é semelhante ao encontrado para o teste de perfuração, podendo também ser explicado pela tendência de aglomeração das nanopartículas quando adicionadas em concentrações elevadas. A alta concentração de NFC pode reduzir a interação desta com a matriz proteica dos filmes levando a uma distribuição não uniforme da tensão aplicada nos filmes, com conseqüente redução da resistência desses materiais (REDDY; RHIM, 2014). O filme NFC2 apresentou um aumento médio de 34,22% quando comparado ao controle. Santos et al (2014) analisaram o efeito de diferentes concentrações de nanocristais de celulose em filmes à base de proteína de peixe, encontrando resultados de RT de aproximadamente 16,9; 17,0 e 16,8 MPa para as concentrações de 5; 10 e 15% (p/v) de nanocristais, respectivamente, observando também a diminuição do valor para o filme adicionado da maior concentração da nanoestrutura. A melhoria da resistência à tração do filme de IPS incorporado com 2% (p/p) de NFC pode ser explicada devido a uma efetiva dispersão da NFC pela matriz polimérica proteica, com a formação de uma rede rígida e contínua da nanopartícula ao longo do filme (SANCHEZ-GARCIA; GIMENEZ; LAGARON, 2008); esse resultado também pode ser confirmado pelas imagens de MEV obtidas da superfície dos filmes (Figura 1). A porcentagem de alongamento na ruptura (ALR) demonstra a capacidade de o filme esticar antes de seu rompimento durante a análise de tração (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Os valores de ALR diminuíram com a adição de NFC, indicando um menor alongamento do material antes da ruptura. Esse resultado demonstra que a adição de NFC aos filmes diminuiu o efeito plastificante dos materiais e sua capacidade em esticar, interferindo em sua flexibilidade. Esse fato também pode ser

explicado pela diminuição da mobilidade das cadeias poliméricas com o aumento de sua resistência, confirmado pelos resultados de RP e RT e corroborando com os valores encontrados para D no teste de perfuração (GOUNGA; XU; WANG, 2007; REDDY; RHIM, 2014). O módulo de elasticidade (ME) ou Módulo de Young é a razão entre a tensão de tração e a deformação na região linear da curva tensão-deformação (região elástica) do filme, sendo uma medida que expressa sua rigidez (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Os biopolímeros de IPS adicionados de NFC apresentaram aumento do ME (Mpa) conforme aumento da concentração da nanopartícula, exceto para o tratamento NFC6. Esse aumento significa aumento da rigidez e também corroboram com os resultados encontrados para RP e RT. O valor obtido para o filme NFC6 (que não diferiu do controle) também está relacionado à aglomeração e dificuldade de dispersão da nanopartícula em concentração elevada. Resultados semelhantes foram encontrados por Muller et al. (2009) que ao estudarem o efeito da adição de fibras de celulose sobre as propriedades mecânicas de biopolímeros à base de amido, encontraram aumento dos parâmetros de RT e ME e diminuição de ALR comparados ao filme controle. O aumento de RT chegou a 18 vezes o valor do filme controle para o tratamento adicionado de 0,5g de fibra de celulose/ g de amido e 34 vezes para o parâmetro de ME para o mesmo tratamento. No presente estudo, o biofilme adicionado de 2% (p/p) de NFC apresentou o maior valor de ME, com aumento de 40,56% quando comparado ao filme controle.

3.4 Permeabilidade ao vapor de água

A adição de NFC aos filmes de IPS foi significativa ($p < 0,05$) para o parâmetro de permeabilidade ao vapor de água (Tabela 3).

Tabela 3 Permeabilidade ao vapor de água (PVA) de biopolímeros de IPS adicionados de NFC

Filmes	PVA x 10 ⁻¹¹ (g m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)
NFC0	8,75 ^a ± 0,061
NFC2	8,59 ^a ± 0,052
NFC4	6,08 ^b ± 0,040
NFC6	9,09 ^a ± 0,064

* Médias observadas em colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente (P<0,05).

O aumento do teor de umidade em alguns produtos alimentícios pode dar origem a problemas em sua vida útil, pois pode favorecer o crescimento de microrganismos indesejáveis, alterações de cor e sabor, perdas nutricionais e das características sensoriais esperadas para aquele produto. Sendo assim, as embalagens alimentares devem diminuir ou minimizar a troca de umidade entre o alimento e o ambiente, visando à diminuição desses efeitos (SARANTÓPOULOS et al, 2002).

A espessura dos biopolímeros pode interferir de forma direta em suas propriedades de permeabilidade, porém, a relação entre esses dois parâmetros ainda não está totalmente definida. Teoricamente, a taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) varia com o inverso da espessura do filme e a permeabilidade ao vapor de água (PVA) deve ser constante. Como apresentado na Tabela 1, o tratamento com maior espessura (mm) foi NFC0 (controle) e o de menor espessura NFC6 e ambos, neste estudo, não apresentaram diferença estatística nos resultados de PVA (Tabela 3).

As limitações de filmes produzidos a partir de base proteica são bem conhecidas, principalmente aquelas referentes às suas propriedades de barreira. Por apresentarem característica hidrofílica, geralmente filmes proteicos apresentam elevados valores de PVA e inúmeros estudos vem sendo conduzidos com o objetivo de se resolver esse problema, seja por mudanças nas conformações e ligações proteicas (aquecimento e radiação) ou pela adição de materiais de reforço (SABATO et al., 2001; PIRES et al., 2011; SANTOS et al., 2014). Gounga et al (2007) estudaram o efeito de

diferentes concentrações de IPS e plastificante glicerol sobre as propriedades de barreira dos biopolímeros e concluíram que para PVA, quanto maior a concentração de IPS maior os valores desse parâmetro. Segundo os autores, o aumento está relacionado ao maior número de bolhas de ar formadas durante a preparação dos filmes, devido à propriedade funcional das proteínas de formação de espuma, com conseqüente aumento do número e tamanho de poros no filme final que serviriam de local de armazenamento para as fases líquidas do filme (água e plastificante), sendo assim, as moléculas de vapor de água interagiriam facilmente com essas porções hidrofílicas na matriz do biofilme, aumentando a PVA.

O filme NFC4 apresentou grande redução na PVA comparado aos outros tratamentos, com diminuição de aproximadamente 30,51% em sua permeação em relação ao filme controle. A adição de NFC às soluções filmogênicas produzidas a partir de bases poliméricas biodegradáveis é capaz de permitir a formação de filmes mais coesos, e quando a interação entre elas e o polímero é uniforme, também é capaz de diminuir a formação de poros pelos filmes. A restrição da PVA também pode ocorrer pelo fato de as NFC atuarem como verdadeiras barreiras à passagem do vapor de água, diminuindo, assim, a velocidade de difusão das moléculas de água pelo filme (REDDY; RHIM, 2014; AZEREDO et al., 2009). A dispersão da nanopartícula pelo tratamento NFC4 foi eficaz como demonstrado pelos resultados de MEV (Figura 1). Babae et al. (2015) estudaram o efeito da adição de NFC e NFC acetilada em biopolímeros de amido de milho sobre a PVA e observaram a redução de aproximadamente 14% da PVA para os filmes adicionados de 10% (p/v) de NFC comparado ao filme controle.

O tratamento NFC6 apresentou pequeno aumento no valor de PVA em comparação ao filme controle, sem diferença significativa ($p < 0,05$). Porém, quando comparado ao filme NFC4, onde houve diminuição da permeabilidade, sendo o aumento da medida de 49,50%. Esse resultado também pode ser explicado e confirmado pela aglomeração da nanopartícula

quando adicionada em excesso à matriz polimérica (Figura 1). Abdulkhani et al, (2014) também observaram comportamento similar para o estudo de filmes elaborados a partir de ácido polilático adicionado de NFC, em que para a adição de concentrações intermediárias da nanopartícula (1 e 3% p/v) os valores de PVA se mantiveram próximos ao controle, porém para a maior concentração adicionada, 5% (p/v), a PVA aumentou em cerca de 38,5%. O autor reforça que há a interferência de fatores como a proporção entre as estruturas hidrofílicas e hidrofóbicas na matriz polimérica, o processo de produção do filme, o tipo, quantidade e distribuição dos aditivos, presença de vãos e rachaduras pelo filme e o arranjo final da estrutura do polímero sobre as propriedades de TPVA e PVA.

3.5 Propriedades ópticas

A análise das propriedades ópticas de filmes é essencial para auxiliar em sua escolha para aplicação em alimentos. A adição de NFC aos filmes de IPS não foi significativa para o parâmetro cor ($p < 0,05$), com média dos valores de L^* , a^* , b^* , C^* e transparência de 88,46; 0,15; 2,16; 2,17 e 14,35, respectivamente.

Filmes produzidos a partir de IPS como base polimérica são conhecidos por se manterem incolores e transparentes, características interessantes para a aplicação em alimentos onde se objetiva a visualização do produto por parte do consumidor (GOUNGA; XU; WANG, 2007). A adição de NFC a esses biopolímeros poderia interferir nessas propriedades, visto que a solução da nanopartícula é opaca e de coloração esbranquiçada, podendo funcionar como verdadeiros obstáculos à passagem da luz pelo interior dos biopolímeros (REDDY; RHIM, 2014). No entanto, a adição de até 6% (p/p) de NFC aos filmes de IPS estudados neste trabalho não gerou mudanças em nenhuma de suas propriedades ópticas, não sendo responsável,

assim, por variações em seus índices de luminosidade (L^*), cor verde/vermelha (a^*), cor azul/amarela (b^*), saturação (C^*) e transparência ($\log(\%T)/\text{mm}$).

A luminosidade (L^*) indica o grau de claridade da cor, ou seja, se a cor estudada é clara ou escura. Para o sistema CIELAB utilizado na medida desse parâmetro, a escala de luminosidade varia de 0 (preto puro) a 100 (branco puro). Para os parâmetros de a^* e b^* temos que: valores de a^* positivos (+a) indicam o vermelho, a^* negativo (-a) o verde, b^* positivo (+b) indicam o amarelo e b^* negativo (-b) o azul (RAMOS; GOMIDE, 2002). Os valores de L^* , a^* e b^* dos filmes de IPS adicionados de NFC caracterizam materiais claros, com tendência ao verde e amarelo. Osés et al (2009) reportaram valores semelhantes para filmes de IPS sem adição de goma de algaroba para L^* (98,7), a^* (-0,2) e b^* (1,1).

Os resultados da transparência estão de acordo com trabalhos encontrados na literatura para filmes adicionados de diferentes concentrações de NFC. Santos et al. (2014) não encontraram diferença na transparência de biopolímeros feitos a partir de proteína de peixe e adicionados de até 15% (p/p) de NFC. Ao contrário do encontrado por este estudo, Reddy; Rhim (2014) relataram diminuição linear da transparência de filmes de ágar adicionados de NFC com valores variando de 87,7% de transparência para o filme controle e 55,9% para o filme adicionado de 10% (p/v) de NFC. O autor atribui essa redução à diminuição da passagem da luz pelo filme devido às partículas de NFC impermeáveis a luz.

O índice de saturação (C^*) também pode ser chamado de intensidade da cor e é o parâmetro que nos permite distinguir cores fracas de fortes. Sendo assim, reduzidos valores de saturação nos permitem relacionar o objeto de estudo à palidez ou coloração acinzentada, enquanto aqueles com altos valores de saturação são denominados saturados (RAMOS; GOMIDE, 2002). Os valores de saturação encontrados para os filmes de IPS

adicionados de NFC variaram de 1,97 a 2,43 caracterizando a falta de coloração dos materiais, ou seja, sua palidez.

4 CONCLUSÃO

A adição de NFC aos filmes de IPS provocou diminuição da espessura do filme adicionado da maior concentração da nanopartícula (6% p/p). Para a solubilidade, o tratamento NFC2 se apresentou mais resistente à água. As propriedades mecânicas dos filmes foram melhoradas para os tratamentos NFC2 e NFC4, deixando-os mais resistentes e elásticos. Para a análise de PVA, a adição de 4% (p/p) de NFC foi capaz de diminuir a permeabilidade em cerca de 30% em relação ao controle, diferindo dos demais tratamentos. A adição da maior concentração testada (6% p/p) não acarretou em mudanças nas propriedades mecânicas e de PVA, sendo relacionada a aglomeração da nanopartícula quando adicionada em excesso à matriz polimérica. Este resultado foi confirmado pela análise da superfície dos filmes por MEV. Para as propriedades ópticas não houve diferença significativa para nenhum dos valores analisados (L^* , a^* , b^* , C^* e transparência).

Levando em consideração os resultados obtidos, o tratamento NFC4 foi escolhido para estudos posteriores e aplicações, devido às melhorias nas propriedades mecânicas e de PVA apresentadas.

REFERÊNCIAS

- ABDULKHANI, A. et al. Preparation and characterization of modified cellulose nanofibers reinforced polylactic acid nanocomposite. **Polymer Testing**, Essex, v. 35, p. 73-79, May 2014.
- AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS – ASTM. **Standard practice for conditioning plastics for testing. ASTM D618-00**. Philadelphia, 2000.
- AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS – ASTM. **Standard test method for slow rate penetration resistance of flexible barrier films and laminates. ASTM F1306-90**. Philadelphia, 2001.
- AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS – ASTM. **Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. ASTM D882-02**. Philadelphia, 2002.
- AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS – ASTM. **Standard test method for transparency of plastic sheeting. ASTM D1746-03**. Philadelphia, 2003.
- AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS – ASTM. **Standard test methods for water vapor transmission of materials. ASTM E96-00**. Philadelphia, 2002.
- ANDRADE, M. M. M.; TAPIA, B. D. R.; MENEGALLI, F. C. Filmes biodegradáveis: Incorporação de microfibras e nanofibras de celulose obtidas de fontes vegetais. **Revista Especializada en Ingeniería de Procesos em Alimentos y Biomateriales**, Bogotá, v. 5, p. 11-28, Ago. 2011.
- AZEREDO, H. M. C. et al. Propriedades mecânicas e de barreira de filmes nanocompósitos de quitosana e celulose microcristalina. In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais - 18º CBECiMat, 24-28 nov. **Anais...Porto de Galinhas – PE**, 2008.
- AZEREDO, H. M. C. et al. Nanocomposite edible films from mango puree reinforced with cellulose nanofibers. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 74, n. 5, p. 31-35, June 2009.
- AZEVEDO, V. M. et al. Whey protein isolate biodegradable films: Influence of the citric acid and montmorillonite clay nanoparticles on the physical properties. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 43, p. 252-258, Jan. 2015.

BABAEE, M. et al. Biodegradability and mechanical properties of reinforced starch nanocomposites using cellulose nanofibers. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 132, p. 1-8, Nov. 2015.

BUFALINO, L. **Filmes de nanocelulose obtidos a partir de resíduos madeireiros da Amazônia**. 2014. 107 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia da Madeira) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2014.

DIAS, M. V. **Filmes a base de quitosana incorporados com α -tocoferol e montmorillonita para aplicação em embalagens funcional e antioxidante**. 2013. 175 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2013.

DIAS, M. V. et al. Development of chitosan/montmorillonite nanocomposites with encapsulated α -tocopherol. **Food Chemistry**, London, v. 165, p. 323-329, Dec. 2014.

EICHHORN, S. J. Cellulose nanowhiskers: promising materials for advanced applications. **Journal Soft Matter**, Cambridge, v. 7, p. 303-315, Aug. 2011.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 811-816, Jul./Ago. 2006.

GALDEANO, M. C.; et al. Influence of thickness on properties of plasticized oat starch films. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 56, n. 4, p. 637-644, July/Aug. 2013.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30, n.1, p. 3- 15, Ago. 1996.

GOUNGA, M. E.; XU, S-Y.; WANG, Z. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 83, n. 4, p. 521-530, Dec. 2007.

HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 231–240, Jan./Mar. 2008.

HONG, S. I.; KROCHTA, J. M. Oxygen barrier properties of whey protein isolate coatings on polypropylene films. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 68, n. 1, p. 224-228, Jan. 2003.

KOKOSZKA, S. et al. Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films. **International Dairy Journal**, Barking, v. 20, n. 1, p. 53-60, Jan. 2010.

KROCHTA, J. M.; BALDWIN, E. A.; NISPEROS-CARRIEDO, M. **Edible coatings and films to improve food quality**. Basel, Suíça: Technomic Publishing AG. 460 p. 1994.

MACHADO, B. A. S.; REIS, J. H. O.; SILVA, J. B.; et al. Obtenção de nanocelulose da fibra de coco verde e incorporação em filmes biodegradáveis de amido plastificado com glicerol. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 8, p. 1275–1282, Ago. 2014.

MATÉ, J. I.; KROCHTA, J. M. Comparison of oxygen and water vapor permeabilities of whey protein isolate and β -lactoglobulin edible films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 8, p. 3001-3004, Aug. 1996.

MILLER, K. S.; KROCHTA, J. M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: a review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 8, n. 7, p. 228-237, July 1997.

MULLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; YAMASHITA, F. Effect of cellulose fibers addition on the mechanical properties and water vapor barrier of starch-based films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 1328-1333, July 2009.

OSÉS, J. et al. Development and characterization of composite edible films based on whey protein isolate and mesquite gum. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 92, n. 1, p. 56-62, May 2009.

OYMACI, P.; ALTINKAYA, S. A. Improvement of barrier and mechanical properties of whey protein isolate based food packaging films by incorporation of zein nanoparticles as a novel bionanocomposite. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 54, part A, p. 1-9, Mar. 2016.

OZDEMIR, M.; FLOROS, J. D. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for water vapor permeability, water solubility and sensory characteristics. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 86, n. 2, p. 215-224, May 2008.

- PARK, H. J.; CHINNAN, M. S. Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 25, n. 4, p. 497-507, 1995.
- PEELMAN, N. et al. Application of bioplastics for food packaging. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 32, n. 2, p. 128-141, Aug. 2013.
- PIRES, C. et al. Characterization of biodegradable films prepared with hake proteins and thyme oil. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 105, n. 3, p. 422-428, Aug. 2011.
- RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias**. Viçosa, Minas Gerais: UFV, 2007. 599 p.
- RAMOS, O. L. et al. Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. **Food Research International**, Barking, v. 45, n. 1, p. 351-361, Jan. 2012.
- RAMOS, O. L. et al. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 110-122, Jan. 2013.
- REDDY, J. P.; RHIM, J.-W. Characterization of bionanocomposite films prepared with agar and paper-mulberry pulp nanocellulose. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 110, p. 480-488, Sept. 2014.
- SABATO, S. F.; et al. Mechanical and barrier properties of cross-linked soy and whey protein based films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 3, p. 1397-1403, Feb. 2001.
- SANCHEZ-GARCIA, M. D.; GIMENEZ, E.; LAGARON, J. M. Morphology and barrier properties of solvent cast composites of thermoplastic biopolymers and purified cellulose fibers. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 71, n. 2, p. 235-244, Jan. 2008.
- SANTOS, T. M. et al. Fish gelatin films as affected by cellulose whiskers and sonication. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 41, p. 113-118, Dec. 2014.
- SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. et al. **Embalagens plásticas flexíveis: Principais polímeros e avaliação das propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, 267 p., 2002.
- SIRACUSA, V. et al. Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 19, n. 12, p. 634-643, Dec. 2008.

SOBRAL, P. J. DO A. Influência da espessura de biopolímeros feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 6, p. 1251-1259, Jun. 2000.

TANG, X. Z. et al. Recent advances in biopolymers and biopolymer-based nanocomposites for food packaging materials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 5, p. 426-442, 2012.

ZOLFI, M.; et al. The improvement of characteristics of biodegradable films made from kerifan-whey protein by nanoparticle incorporation. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 109, p. 118-125, Aug. 2014.

ARTIGO 2

CARACTERIZAÇÃO DE NANOBIOPOLÍMEROS ATIVOS DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE E NANOFIBRA DE CELULOSE ADICIONADOS DE ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO

RESUMO

A adição de agentes antioxidantes naturais a embalagens alimentares é uma alternativa para se atender a demanda do consumidor atual. Foram avaliados os efeitos da adição de diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho (OET) (20; 30 e 40% p/p) sobre as propriedades morfológicas, estruturais, térmicas, mecânicas, de permeabilidade ao vapor de água e ópticas de nanobio-polímeros de isolado proteico de soro de leite (IPS) e nanofibra de celulose (NFC), pelo método *casting* de produção. O experimento foi conduzido em três repetições e houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os filmes adicionados de OET e o filme controle. A microscopia eletrônica de varredura revelou má dispersão da NFC para todos os filmes. A incorporação de 30 % de OET resultou na formação de bolhas na superfície do filme. A adição de OET foi capaz de diminuir a PVA dos materiais, aumentar a estabilidade térmica (DSC e TGA) e o índice de cristalinidade, podendo ser explicado pela boa interação entre os componentes dos filmes, confirmado pela análise de FTIR. Para as propriedades mecânicas houve diminuição dos parâmetros, caracterizando filmes menos rígidos e elásticos. A análise das propriedades ópticas mostrou que os filmes ficaram menos amarelos (b^*), tendendo ao verde (a^*), mais pálidos (c^*) e menos transparentes com a adição do OET. A adição de até 40% de OET permitiu a formação de filmes com boa interação entre os constituintes da matriz polimérica e melhoria de várias de suas propriedades.

Palavras-chave: Propriedades térmicas. Índice de cristalinidade. FTIR.

1 INTRODUÇÃO

Embalagens produzidas a partir de biopolímeros encontrados na natureza como os polissacarídeos (amido, quitosana, galactomanana, pectina) e as proteínas (caseinato, gelatina, proteína de soro de leite) vêm recebendo grande atenção por ser uma alternativa às embalagens sintéticas produzidas a partir de recursos não renováveis e consideradas como não biodegradáveis (SIRACUSA et al., 2008; OYMACI; ALTINKAYA, 2016).

O isolado proteico de soro de leite (IPS) é um subproduto da indústria de queijos ou caseína e está sendo amplamente estudado na produção de embalagens biodegradáveis para alimentos, obtendo excelentes resultados quanto a suas propriedades de formação de filmes e barreira ao oxigênio (FANG et al., 2002; HONG; KROCHTA, 2006; AZEVEDO et al., 2015). Porém, suas propriedades mecânicas são reduzidas (baixa resistência à tração e rigidez) assim como sua barreira ao vapor de água (RAMOS et al., 2013).

Como forma de superar as deficiências inerentes a esses materiais de embalagem, a adição de diferentes tipos de nanopartículas tem sido amplamente estudada (AULIN; GALLSTEDT; LINDSTROM, 2010; AZEVEDO et al., 2015; OYMACI; ALTINKAYA, 2016). A adição de nanofibra de celulose (NFC) a biopolímeros é uma alternativa interessante devido ao seu baixo peso, biodegradabilidade e renovabilidade, e alta resistência e diminuição da permeabilidade ao vapor de água dos materiais formados (SANCHEZ-GARCIA; LAGARON, 2010; SPENCE et al., 2010). Além disso, sua característica de hidrofiliçidade permite a combinação com polímeros hidrofílicos como o IPS (SIRÓ; PLACKETT, 2010).

As embalagens de alimentos tradicionais são limitadas quanto à capacidade em prolongar a vida útil dos alimentos acondicionados

(DAINELLI et al., 2008). Embalagem ativa é um novo conceito em embalagens de alimentos que surgiu com o objetivo de atender à demanda dos consumidores atuais e às tendências do mercado e pode ser explicada como um tipo de embalagem que tem por objetivo aumentar o prazo de validade do produto acondicionado, ou melhorar sua segurança ou propriedades sensoriais, com manutenção da qualidade do alimento (SOARES et al., 2009).

Antioxidantes são normalmente adicionados a alimentos que apresentam em sua constituição alto conteúdo de lipídeos, como forma de melhorar sua estabilidade à oxidação, prolongando sua vida útil. Porém, a incerteza dos consumidores sobre os efeitos toxicológicos da adição de antioxidantes sintéticos (BHT, BHA e TBHQ), mesmo que incorporados a embalagens ativas e não adicionados diretamente aos alimentos, tem levado à procura de substituintes naturais que apresentem atividade antioxidante sem oferecer risco ao consumidor (SIRIPATRAWAN; HARTE, 2010).

O óleo essencial de tomilho apresenta em sua constituição os monoterpenos fenólicos timol e carvacrol que são os principais responsáveis por seu aroma característico e sua ação antioxidante (YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNÝ, 2006). Quando adicionados aos alimentos, são capazes de prevenir a oxidação, prolongando a vida útil do produto (FRATIANNI et al., 2010; TOMAINO et al., 2005), porém, devido ao seu forte aroma, a adição direta a esses produtos é capaz de modificar suas características sensoriais, interferindo na intenção de compra dos consumidores (SCOLLARD; FRANCIS; O'BEIRNE, 2013). Portanto, sua adição ao material da embalagem (embalagem ativa) pode ser capaz de reduzir os prejuízos sensoriais ocasionados pela adição direta ao produto, protegendo e estendendo sua vida útil (HOSSEINI; RAVAZI; MOUSAVI, 2009; COSKUN et al., 2014).

O objetivo deste trabalho foi de avaliar as propriedades morfológicas (MEV), estruturais (difração de raio-X e espectroscopia na região de infravermelho), térmicas (DSC e TGA), mecânicas (tração e perfuração), de permeabilidade ao vapor de água (PVA) e ópticas de nanobiopolímeros de IPS e NFC adicionados de diferentes concentrações de agente antioxidante óleo essencial de tomilho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Isolado proteico de soro de leite (IPS 9400) fornecido pela *Hilmar Ingredients* (Hilmar, CA, EUA), glicerol (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA), nanofibra de celulose (NFC) cedida pelo Departamento de Engenharia Florestal – UFLA e óleo essencial de tomilho (OET) (Ferquima, Vargem Grande Paulista, SP).

2.2 Planejamento experimental

O experimento foi conduzido usando um delineamento inteiramente casualizado (DIC). A concentração de NFC foi fixada em 4% (p/p) baseado nos resultados obtidos e demonstrados no Artigo 1. As concentrações de OET variaram de 0 (controle); 20; 30 e 40% (p/p), sendo os filmes denominados de OET0, OET20, OET30 e OET40. O experimento foi conduzido em três repetições.

2.3 Desenvolvimento dos filmes

Os biopolímeros de IPS e NFC incorporados com OET foram produzidos no Laboratório de Embalagens da Universidade Federal de Lavras (UFLA), pelo método *casting* e desenvolvidos de acordo com Azevedo et al. (2015), com algumas modificações. IPS e glicerol foram fixados nas quantidades de 6% (p/v) em relação ao volume de solução e 30% (p/p) em relação ao polímero base. Para a produção do filme OET0 (controle), IPS foi dissolvido separadamente em água destilada assim como o glicerol e NFC, mantidos sob agitação durante 30 minutos. Depois disso, as duas soluções foram misturadas e agitadas novamente por 10 minutos, o pH foi corrigido para 8,0 com solução de NaOH 1N e a solução foi agitada em homogeneizador ultrassônico para dispersão das nanopartículas (*Sonifier Cell Disruptor Branson* – Modelo 450D, Manchester, UK) por 10 minutos com amplitude de 80% a 25°C. Posteriormente, as soluções foram levadas a banho-maria a 90°C por 30 minutos, resfriadas e vertidas em placas de vidro com dimensões de 18 x 30 cm. O OET (20; 30 e 40% em relação ao polímero base) foi adicionado após a solução filmogênica ter sido resfriada, sendo misturado em ultrassom *Sonifier Cell Disruptor Branson* (Modelo 450D, Manchester, UK) por 5 minutos (ZINOVIADOU; KOUTSOUMANIS; BILIADERIS, 2009). As soluções permaneceram por 48 horas nas placas até que o solvente fosse evaporado, com formação dos filmes. O volume final para cada solução vertida foi de 125mL.

2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Microestrutural (LME) da UFLA, em microscópio LEO EVO 40 XVP (*Zeiss*, Cambridge, Inglaterra), com voltagem de aceleração de 20 kV. As

amostras dos filmes apresentavam aproximadamente 2x2mm e, anterior à análise, foram fixadas a stubs por fita adesiva dupla face de carbono, e revestidas por banho de ouro sob vácuo (metalização).

2.5 Difração de raios x (DRX)

A difração de raios X foi conduzida em difratômetro de raios-X D2-Phaser (Bruker, Karlsruhe, Alemanha), com radiação de filtro de Cu- $k_{\alpha 1}$ ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$), operando a 30kV e 30mA. As amostras foram fixadas em suporte de alumínio e analisadas a uma taxa de varredura de $0,02^\circ \text{ s}^{-1}$, com 2θ variando de $4^\circ - 50^\circ$ e temperatura ambiente. As curvas foram tratadas com o software Origin 8.0 e o índice de cristalinidade relativa (IC) dos nanobiopolímeros foram calculados de acordo com a equação 1 (SEGAL et al., 1959):

$$IC = 1 - (I_{\min}/I_{\max}) \times 100 \quad (1)$$

Onde: IC é o índice de cristalinidade (%); I_{\min} é a intensidade mínima obtida entre os picos localizados a $2\theta = 9,4$ e a $2\theta = 19,4$; I_{\max} = é a intensidade máxima do pico cristalino localizado a $2\theta = 19,4$.

2.6 Espectroscopia na região do infravermelho

Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada no Departamento de Química da UFLA, em espectrômetro FTS 3000 Excalibur Digilab (Estados Unidos), equipado com

detector KBr, faixa espectral de análise de $4000\text{-}50\text{cm}^{-1}$, número de scans de 64 e resolução de 4cm^{-1} para obtenção dos espectros.

2.7 Análises térmicas

As análises térmicas foram realizadas no Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

2.7.1 Temperatura de transição vítrea (T_g)

A análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi realizada em calorímetro DSC60-SHIMADZU (*Shimadzu Corporation*, Kyoto, Japão). Os parâmetros utilizados para a análise foram: peso da amostra de 4-6mg e taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. A sequência utilizada foi: 1) aquecimento de 25 a 200°C com o objetivo de se eliminar a história térmica; 2) resfriamento do material de 200 a -50°C ; 3) novo aquecimento até 200°C (ASTM D3417-99, 1999; ASTM D3418-03, 2003). A partir das curvas de DSC, a temperatura de transição vítrea (T_g) foi analisada.

2.7.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica e perfil de degradação dos nanobiopolímeros ativos foram determinados por análise termogravimétrica (TGA) em aparelho DTG60H-SHIMADZU (*Shimadzu Corporation*, Kyoto, Japão). A análise foi realizada sob atmosfera de nitrogênio com taxa de fluxo de $50\text{mL}/\text{min}$, aquecimento de 40 a 500°C , razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e peso da amostra de 4-6mg (JONES; MANDAL; SHARMA, 2015).

2.8 Propriedades mecânicas

As análises de perfuração e tração foram realizadas no Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA, em Analisador de Textura Stable Micro Systems (modelo TA-XT2, Inglaterra), com célula de carga de 1kN. Para a análise de perfuração, as amostras dos filmes foram cortadas em quadrados de 3x3cm, submetidas às medidas de espessura em 4 pontos distintos, e fixadas em um suporte metálico com orifício central para passagem da sonda de forma perpendicular. Os parâmetros utilizados durante o teste foram: sonda esférica de 5,0mm de diâmetro (sonda A/TG), velocidade de deslocamento da sonda de 0,8mm/s e distância percorrida por ela após tocar a amostra de 1cm. Para cada tratamento foram analisados 15 corpos de prova (ASTM F1306-90, 2001). A resistência à perfuração/espessura (RP, N/mm) foi calculada por meio da divisão do valor da força máxima obtida no ponto de ruptura pela espessura do filme, com o objetivo de se eliminar o efeito da variação da espessura sobre os resultados. Já a deformação (D, mm) foi determinada por meio do ponto de ruptura dos corpos de prova.

Para o teste de tração, as amostras foram cortadas em tiras de 10x1,5cm; medidas as espessuras em 3 pontos distintos e fixadas no suporte da sonda pelas duas extremidades. Os parâmetros utilizados durante a análise foram: separação inicial entre as garras de 50mm e velocidade de deslocamento de 0,8mm/s. Para cada tratamento foram analisados 15 corpos de prova (ASTM D882-02, 2002). A resistência máxima à tração (RT, Mpa) foi calculada pela divisão da força máxima pela área transversal do corpo de prova. A porcentagem de alongamento na ruptura (ALR) foi calculada pela relação entre o alongamento do corpo de prova e seu comprimento inicial. Para o módulo de elasticidade (ME, Mpa) traçou-se uma tangente à curva tensão de tração x deformação na região linear (região elástica), calculando a razão entre a tensão e a deformação correspondente (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

2.9 Permeabilidade ao vapor de água e espessura

A permeabilidade ao vapor de água foi realizada no Laboratório de Embalagens da UFLA, pelo método gravimétrico. Os corpos de prova de cada tratamento foram cortados em discos de 8cm de diâmetro e fixados em cápsulas contendo sílica-gel em seu interior. Estas foram acondicionadas em dessecadores com solução saturada de NaCl e umidade relativa de $75 \pm 3\%$ sob temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Após a montagem das cápsulas, fez-se a pesagem em intervalos de 1 hora durante 8 horas para se obter o ganho de peso relacionado à transferência de vapor de água através do filme (ASTM E96-00, 2002). A taxa de permeabilidade ao vapor de água e a permeabilidade ao vapor de água foram calculadas segundo as Equação 2 e 3, respectivamente:

$$TPVA = G/t \cdot A \quad (2)$$

Onde: *TPVA* é a taxa de permeabilidade ao vapor de água (g água/(m².dia)); *G/t* é o coeficiente angular da reta (g água/dia) e *A* é a área de permeação do corpo de prova (m²).

$$PVA = \frac{TPVA \cdot e}{\rho_s (UR_1 - UR_2)} \quad (3)$$

Onde: *PVA* é a permeabilidade ao vapor de água (g m⁻¹ s⁻¹ Pa⁻¹); *TPVA* a taxa de permeabilidade ao vapor de água; *e* é a espessura média do corpo de prova (μm); *ρ_s* a pressão de saturação de vapor de água à temperatura de ensaio (2809 Kpa); *UR₁* umidade relativa da câmara e *UR₂* umidade relativa do interior da cápsula.

A espessura média dos filmes foi medida por meio da leitura de 15 pontos distintos, utilizando micrômetro digital Mitutoyo (precisão 0.01 mm; Mitutoyo Sul Americana, Suzano, SP, Brasil).

2.10 Propriedades ópticas

Os parâmetros obtidos pela análise de cor foram: L^* , a^* , b^* e índice de saturação (C^*), calculado através da fórmula: $C^* = [(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}]$. A análise de cor dos filmes foi realizada no Laboratório de Embalagens da UFLA e medida utilizando um colorímetro espectrofotométrico modelo CM-700 (Kônica Minolta, Japão), com fonte de luz D65, ângulo observador de 10° e reflectância especular incluída (SCI). As leituras foram realizadas com os filmes sobrepostos em papel de coloração branca.

A transparência dos filmes foi medida em espectrofotômetro Bel SPECTRO S-2000 (Monza, Itália) a 600nm, retirando-se a medida de porcentagem de transmitância (%T), segundo ASTM D1746-03 (ASTM D1746-03, 2003). Os filmes foram cortados em pedaços de 3x1cm e fixados de forma a permitir que o feixe do equipamento atravessasse os corpos de prova sem nenhum obstáculo. A transparência (T) foi calculada de acordo com a Equação 4:

$$T = (\text{Log \%T}) / \delta \quad (4)$$

Onde: δ é a espessura do filme (mm).

2.11 Análise estatística

Para os resultados de MEV, DSC e TGA, DRX e FTIR foram realizadas análises descritivas. Os dados de RP (Mpa), D (mm), RT (Mpa), ALR (%), ME (Mpa), PVA ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$), espessura e propriedades ópticas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o software SAS[®] (Cary, SC) ($p < 0,05$) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Em relação à NFC, observa-se que houve pior dispersão pelos filmes a partir da adição de OET (Figura 1). O filme controle, adicionado de NFC, e isento de óleo, apresenta distribuição homogênea da nanopartícula por toda a superfície amostrada. Já para os tratamentos OET20, OET30 e OET40, adicionados de óleo, tem-se aglomeração da NFC por pontos aleatórios dos filmes, indicando que o OET interferiu em sua correta dispersão. A NFC foi fixada à formulação por ter apresentado reforço às propriedades mecânicas e de PVA dos filmes de IPS (Artigo 1). A aglomeração das NFC pode estar relacionada à natureza hidrofóbica do OET, visto que assim, as nanopartículas deixariam de apresentar uma interação homogênea por toda a matriz polimérica; onde o óleo estaria presente, com tendência de formar ligações entre elas mesmas.

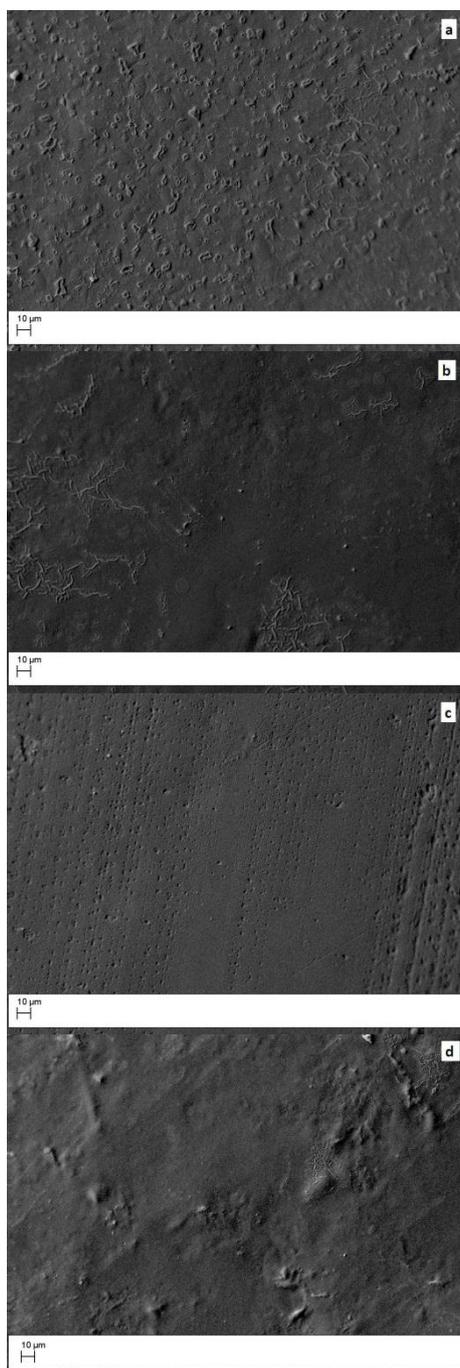


Figura 1 Micrografias de superfície de nanobiopolímeros de IPS e NCF adicionados de OET. Aumento de 1000x. a) OET0; b) OET20; c) OET30; d) OET40.

O filme adicionado de 30% (p/p) de OET apresentou superfície irregular com formação de poros. Hosseini et al (2009) encontraram resultado semelhante ao analisarem a superfície de filmes de quitosana incorporados com 1% de óleo essencial de tomilho, relacionando esse fato à interrupção da cadeia ordenada de polímeros pelas gotículas de óleo. Kavoozi et al (2014) também encontraram resultados semelhantes, com aumento do número de bolhas na superfície de filmes de gelatina incorporados com óleo essencial de *Zataria Multiflora* de acordo com o aumento da concentração de óleo (4; 6 e 8%).

3.2 Difração de raios x (DRX)

Observa-se que os filmes apresentaram dois picos de cristalinidade em $2\theta = 9,4$ e $19,4$ (Figura 2); sendo que a adição de OET não interferiu na estrutura dos filmes no que se diz respeito à formação de novos picos de cristalinidade.

Atef et al. (2015) ao estudarem o efeito da adição de óleo essencial de segurelha em filmes de ágar e celulose, não encontraram diferença na estrutura dos filmes pelos difratogramas com a adição do óleo. Muller et al. (2009) ao estudarem o efeito da adição de fibras de celulose em biopolímeros de amido também observaram dois picos mais intensos para os filmes adicionados do material celulósico com porcentagem de cristalinidade variando de 50 a 53%. Le Tien et al. (2000) ao analisarem o efeito da irradiação e aquecimento em filmes de IPS e celulose concluíram que o aquecimento das proteínas presentes no isolado proteico de soro de leite durante a etapa de formação dos filmes induz a mudanças em sua conformação, tornando-as mais estáveis e ordenadas, com aumento da intensidade do maior pico e maior cristalinidade.

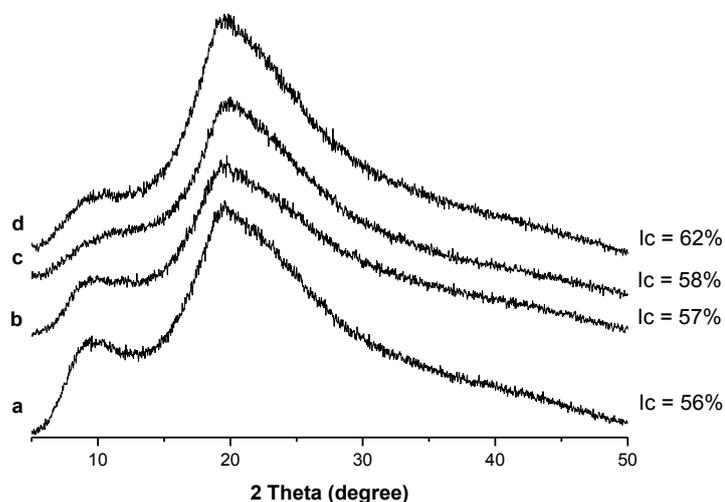


Figura 2 Difratogramas de nanobiopolímeros de IPS e NFC adicionados de OET com seus respectivos índices de cristalinidade (Ic). a) OETO; b) OET20; c) OET40; d) OET30.

Os resultados de índice de cristalinidade (Ic) demonstrados na Figura 2 mostram que a adição do OET levou a um aumento da cristalinidade dos nanobiopolímeros. A cristalinidade de um polímero pode sofrer variações dependendo da forma e ordenação de suas moléculas, sua simetria, ramificação, rigidez, regularidade e pelos parâmetros de processamento (UNGARI, 1999). Os maiores valores de cristalinidade encontrados para os nanobiopolímeros adicionados de OET podem ser explicados devido ao aumento da interação entre as moléculas da matriz, limitando os movimentos da cadeia e aumentando o processo de cristalização (CERQUEIRA et al., 2012). Rubilar et al. (2013), ao estudarem o efeito da adição de carvacrol e extrato de semente de uva em filmes de quitosana, também encontraram um aumento da porcentagem de cristalinidade para os filmes contendo carvacrol.

3.3 Espectroscopia na região do infravermelho

A análise de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) é realizada para determinar possíveis interações e mudanças estruturais dos compostos presentes nos biopolímeros (HAMMAN; SCHMID, 2014).

Os principais picos de absorção estão localizados no intervalo de 800 a 1150 cm^{-1} , 1200 a 1700 cm^{-1} e de 3000 a 3600 cm^{-1} (Figura 3). O primeiro pico é atribuído às bandas de absorção do glicerol, correspondendo às vibrações das ligações C-C e C-O. O segundo pico (1200 a 1700 cm^{-1}) é atribuído à combinação das misturas de vibrações de ligações N-H e C-N (1200-1350 cm^{-1} , amida III), ligações N-H (1400-1550 cm^{-1} , amida II) e vibrações de ligações de grupos C=O e C-N (1600-1700 cm^{-1} , amida I) (RAMOS et al., 2013). As regiões chamadas de amida I e amida II estão relacionadas à presença de proteínas com estrutura secundária. Com o aquecimento para formação do filme, as proteínas perdem essa conformação por se agregarem para formação de novas ligações, e assim as bandas características da estrutura inicial diminuem ou mesmo somem com a formação de novos picos relacionados às ligações intermoleculares do tipo β nos comprimentos de onda de 1612 e 1682 cm^{-1} (HAMMANN; SCHMID, 2014).

A vibração localizada na faixa espectral de 3000 a 3600 cm^{-1} também foi encontrada por diversos autores (LE TIEN et al., 2000; RAMOS et al., 2013) e é atribuída à banda de estiramento dos grupamentos OH e NH livres ou ligados. No presente estudo, para todos os nanobiopolímeros estudados, uma banda forte foi observada a 3275 cm^{-1} . Estudos sobre proteínas demonstram que a banda de estiramento de NH geralmente está localizada a 3254 cm^{-1} (RAMOS et al., 2013). Esse deslocamento da banda pode ser explicado, segundo Le Tien et al (2000), devido à presença de outros compostos na formulação do biofilme, como o glicerol, nanofibra de

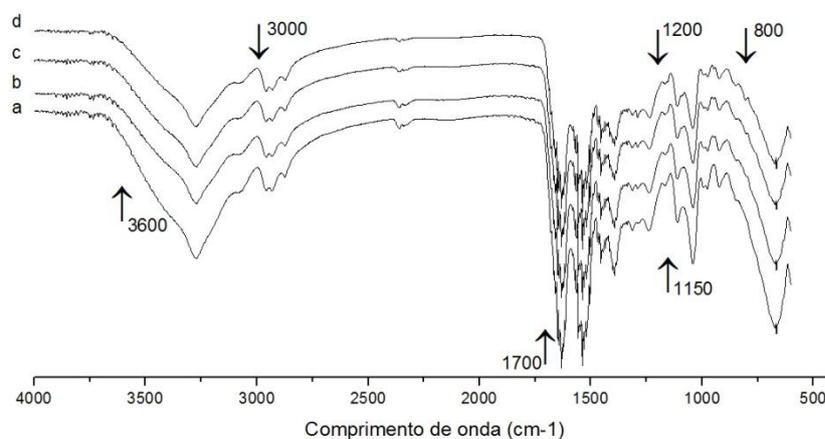


Figura 3 Espectros de FTIR de nanobiopolímeros de IPS e NFC adicionados de OET. a) OET0; b) OET20; c) OET30 e d) OET40.

celulose e o óleo essencial, sendo a NFC característica por apresentar elevado número de grupos hidroxila, capazes de se ligar a outras estruturas.

3.4 Análises térmicas

3.4.1 Temperatura de transição vítrea (T_g)

Materiais que apresentam estruturas amorfas ou parcialmente amorfas passam por uma transição de estado rígido, sólido e vítreo para um estado semelhante à borracha ou altamente viscoso a uma temperatura específica chamada de temperatura de transição vítrea (T_g). O estudo desse parâmetro é muito importante em materiais biodegradáveis e sintéticos por sua influência sobre o uso destes polímeros (GHANBARZADEH; OROMIEHI, 2008). Normalmente, os valores de T_g aumentam com o aumento de cadeias e ligações rígidas, grupos laterais, ligações cruzadas entre as cadeias e o grau de cristalinidade dos polímeros; e diminui de

acordo com o aumento de plastificantes de baixo peso molecular, como a água e glicerol (GALIETTA et al., 1998).

O valor de Tg aumentou a partir da adição de OET aos filmes de IPS e NFC (Tabela 1), caracterizando filmes com estruturas mais rígidas e ligações mais fortes.

Anker et al (1999) encontraram valor de Tg para filmes de IPS variando de -17,0 a -21°C de acordo com o pH empregado para a produção dos filmes. Shaw et al (2002), analisando o efeito de diferentes concentrações de óleo de soja e glicerol sobre as propriedades térmicas de filmes de IPS, encontraram valores de Tg variando de -79,26 a -88,07°C e também relataram a tendência de aumento da Tg com o aumento da concentração de óleo. Ghanbarzadeh & Oromiehi (2008) também reportam aumento da Tg de filmes feitos a partir de zeína e IPS quando adicionados de azeite e relacionam esse aumento com a possível melhoria nas propriedades de barreira dos filmes, devido ao elevado peso molecular que moléculas de óleo apresentam e também a sua hidrofobicidade. O aumento da Tg também foi encontrado por Cerqueira et al (2012) ao estudar o efeito da adição de óleo de milho em filmes de quitosana e também de galactomanana, sendo ambos os comportamentos explicados como resultado do aumento da interação entre os constituintes dos filmes com consequente diminuição da mobilidade da cadeia polimérica pela presença do óleo.

Tabela 1 Temperatura de transição vítrea de nanobiopolímeros de IPS e NFC adicionados de OET

Nanobiopolímeros	Tg* (°C)
OET0	-14,45
OET20	-7,40
OET30	-12,78
OET40	-9,45

*Tg: Temperatura de transição vítrea.

3.4.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) foram realizadas com o objetivo de se determinar a estabilidade térmica dos nanobiopolímeros de IPS e NFC adicionados de OET. As curvas resultantes da análise estão representadas na Figura 4.

Observam-se dois estágios de degradação dos nanobiopolímeros na faixa de temperatura de 45°C a 500°C. Este resultado é semelhante ao encontrado por: Jones et al. (2014) e Pelissari et al. (2009). Estudos que utilizam intervalos de temperatura maiores para a análise termogravimétrica relatam três ou até quatro estágios de decomposição e os relacionam à degradação oxidativa de resíduos de carbono formados durante o segundo estágio (KADAM et al.; 2013; AZEVEDO et al.; 2015).

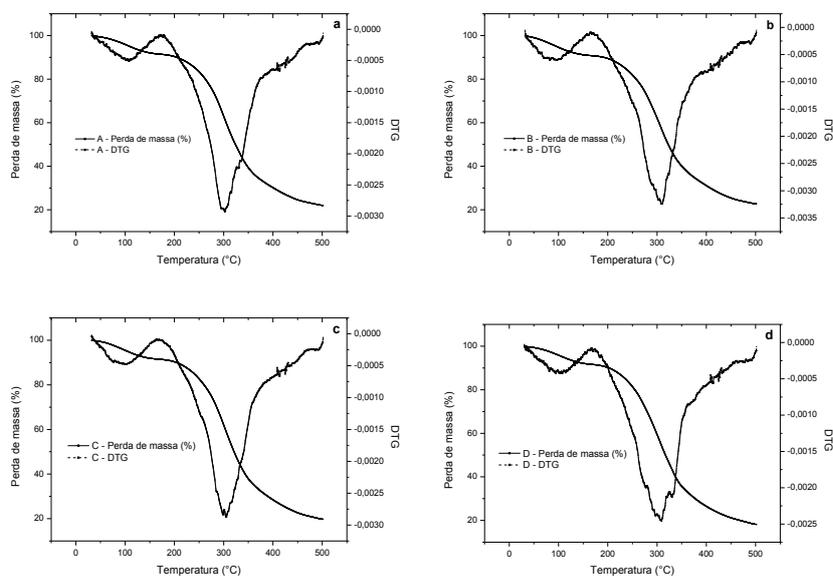


Figura 4 Curvas de TGA e DGT de nanobiopolímeros de IPS e NFC adicionados de OET. a) A: OET0; b) B: OET20; c) C: OET30 e d) D: OET40.

O pico de degradação inicial observado para todos os tratamentos se manteve próximo, variando de 93,2 a 106,8°C. Essa primeira redução de massa das amostras indica a perda de umidade dos nanobiopolímeros (KADAM et al., 2013). Um segundo pico de degradação térmica com maior intensidade é observado entre 160 e 380°C, estando relacionada à decomposição das proteínas presentes, perda do glicerol usado como plastificante nas formulações e degradação do óleo nos nanobiopolímeros adicionados de OET (BASIAK; DEBEAUFORT; LENART, 2016; KADAM et al., 2013), sendo confirmado pela porcentagem de perda de peso no período, conforme Tabela 2.

As T_i de decomposição dos filmes sofreram uma ligeira mudança quando adicionado o OET às formulações, sendo que a maior variação de temperatura foi a redução de 5,6°C na T_i para o filme adicionado de 20% de OET comparado ao controle. As $T_{máx}$ de decomposição foram retiradas dos picos máximos de degradação obtidos pelas curvas de DTG, sendo os resultados encontrados para os filmes adicionados de óleo ligeiramente maiores que para o filme controle, com maior aumento encontrado para o tratamento com 20 % de óleo, 7,4°C a mais que o controle. As T_f de decomposição também aumentaram ligeiramente com a adição de OET, assim como a % PM que pode estar relacionada à perda adicional de óleo dos filmes incorporados com OET (BASIAK; DEBEAUFORT; LENART, 2016).

Tabela 2 Estabilidade térmica dos nanobiopolímeros de IPS e NFC adicionados de OET, obtidos por análise termogravimétrica

Nanobiopolímeros	T_i^* (°C)	$T_{máx}$ (°C)	T_f (°C)	(%) PM (T_i-T_f)	Res _{500°} (%)
OET0	173,4	302,3	375,3	56,5	22,0
OET20	167,8	309,7	379,4	57,6	21,7
OET30	168,6	304,7	380,9	62,1	19,7
OET40	173,6	308,9	381,8	62,3	18,2

* T_i : Temperatura inicial de degradação; $T_{máx}$: Temperatura máxima de degradação; T_f : Temperatura final de degradação; PM: Porcentagem de perda de massa na faixa de degradação; Res_{500°}: Porcentagem de resíduo a 500°C.

Azevedo et al (2015) também encontraram valores semelhantes aos deste estudo para $T_{máx}$, T_f , e resíduo no período final de análise de 301,5; 366,3 e 16%, respectivamente, para filmes de IPS e glicerol. Ramos et al. (2013) encontraram valores de PM variando de 64,0 a 66,4% para biopolímeros de IPS com diferentes concentrações de glicerol. Cerqueira et al (2012) relataram tanto para filmes de quitosana quanto de galactomanana adicionados de glicerol e óleo de milho, um pico extra de perda de massa, encontrado no intervalo de temperatura de 400 a 430°C, sendo associado à decomposição do óleo e principalmente às suas estruturas aromáticas.

3.5 Propriedades mecânicas

A adição de OET aos nanobiopolímeros de IPS e NFC foi significativa ($p < 0,05$) tanto para os parâmetros avaliados pelo teste de perfuração (RP e D) quanto para o teste de tração (RT, ALR e ME), conforme Tabela 3.

A avaliação dos parâmetros obtidos por meio do teste de perfuração em filmes é importante por nos apresentar dados referentes a sua resistência à punctura e deformação, por exemplo, durante sua formação, aplicação em alimentos e transporte do produto acondicionado (COLES; MCDOWELL; KIRWAN, 2003). A incorporação de OET aos nanobiopolímeros reduziu significativamente os valores de RP e D, com diminuição de 53,8% na RP e de 58,1% na D do tratamento adicionado da maior concentração de OET (OET40) em relação ao controle. Esse resultado caracteriza materiais menos fortes e menos elásticos quando comparados ao filme controle. Resultados semelhantes foram encontrados por Zivanovic et al (2005), onde os filmes à base de quitosana e incorporados com óleo essencial de orégano apresentaram a redução da RP de 300N/mm para o filme controle, para aproximadamente 150 e 75 N/mm para os filmes adicionados de 1% e 2% de óleo essencial.

Tabela 3 Valores de RP, D, RT, ALR e ME de nanobiopolímeros de IPS e NFC adicionados de OET

Nanobiopolímeros	RP (N/mm)	D (mm)	RT (MPa)	ALR (%)	ME (MPa)
OET0	87,97 ^b ± 3,52	3,87 ^a ± 1,43	6,00 ^a ± 0,28	22,43 ^b ± 1,48	45,45 ^b ± 2,14
OET20	70,87 ^b ± 5,23	3,04 ^b ± 0,34	5,67 ^a ± 1,29	26,77 ^a ± 2,08	37,48 ^b ± 3,31
OET30	54,19 ^a ± 5,57	1,69 ^c ± 0,71	4,86 ^a ± 1,04	15,69 ^c ± 1,19	27,00 ^{ab} ± 2,95
OET40	40,65 ^a ± 3,96	1,62 ^d ± 0,55	3,40 ^b ± 0,26	13,79 ^c ± 0,78	13,08 ^a ± 1,51

* Médias observadas em colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente (P<0,05).

As propriedades avaliadas pelo teste de tração (RT, ALR e ME) caracterizam a resistência do material quando submetido à tração, sendo também uma importante análise em filmes por essa propriedade estar presente no processo de manuseio das embalagens (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Neste estudo, observou-se a redução da RT e ME apenas para o filme incorporado com a maior concentração de OET (OET40) e para %ALR houve uma tendência de diminuição do parâmetro para todos os filmes, exceto para aquele adicionado de 20% (p/p) de OET. Resultados semelhantes foram encontrados por Pires et al. (2013) ao analisarem o efeito da adição de diferentes tipos de óleo essencial em biopolímeros à base de proteína de peixe.

No estudo, os autores encontraram uma redução dos valores de RT para o tratamento adicionado de 0,25mL de óleo essencial de tomilho/g de proteína, com valor de $4,22 \pm 0,94$ MPa. Pelissari et al. (2009) também observaram a redução de RT em filmes de amido de mandioca e quitosana incorporados com óleo essencial de orégano, com os valores variando de 2,54 a 1,43 MPa, para os filmes controle e adicionado da maior concentração de óleo (1%) e atribuem esse resultado à capacidade plastificante que o óleo apresenta sobre a matriz polimérica dos filmes. Segundo Mor et al (1999), uma matriz proteica adicionada de lipídeos pode ser classificada em dois sistemas: interativa e não interativa. No primeiro caso, o óleo emulsificado na matriz proteica se torna uma parte integrada do sistema e as gotículas dispersas pelo interior do polímero atuam como verdadeiras âncoras, reforçando o material. Para os sistemas não interativos, as gotículas de óleo preenchem os poros na matriz proteica sem interagir de forma ativa com a rede de proteínas, ocasionando prejuízo das propriedades mecânicas. O efeito negativo da adição de OET sobre as propriedades mecânicas de RP, D, RT e ALR dos nanobiopolímeros de IPS e NFC pode ser explicada pela falta de sustentação e lubrificação dos lipídeos dentro da matriz polimérica, podendo haver uma interrupção parcial das interações entre as cadeias de

polímeros devido à presença das moléculas não polares dos lipídeos nos poros da matriz (LIU; KERRY; KERRY, 2006).

3.6 Permeabilidade ao vapor de água e espessura

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) pode ser descrita como o valor de permeação do vapor de água pelo filme a uma temperatura constante, e depende de fatores como: estrutura química do filme, morfologia e espessura, a natureza do permeante e a temperatura do ensaio (SIRIPATRAWAN et al.; 2010). Neste estudo, a análise de PVA dos filmes de IPS e NFC adicionados de OET foi conduzida em temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). A adição de OET aos nanobiopolímeros afetou os resultados de PVA e espessura ($p < 0,05$), conforme demonstrado na Tabela 4.

Observou-se redução da PVA para os filmes adicionados de OET, com diminuição máxima de 46,2% no parâmetro para o filme adicionado da maior concentração em relação ao controle. A diminuição dos valores de PVA de acordo com o aumento da concentração de OET pode ser explicada pela hidrofobicidade do óleo.

Tabela 4 Permeabilidade ao vapor de água (PVA) e espessura de nanobiopolímeros de IPS e NFC adicionados de OET

Nanobiopolímeros	PVA x 10^{-11} ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$)	Espessura (mm)
OET0	$6,25^a \pm 0,05$	$0,148^a \pm 0,01$
OET20	$5,27^b \pm 0,04$	$0,137^b \pm 0,00$
OET30	$3,43^c \pm 0,05$	$0,137^b \pm 0,01$
OET40	$3,36^c \pm 0,04$	$0,151^a \pm 0,01$

* Médias observadas em colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

A PVA geralmente ocorre através da porção hidrofílica do filme, portanto, a taxa de permeabilidade do material depende da relação entre a porção hidrofílica e hidrofóbica dos componentes presentes. Assim, quando se tem aumento da porção hidrofóbica no material, as moléculas de vapor de água passam a encontrá-las como barreiras ao caminho à permeação, resultando em uma menor taxa de permeação e de PVA (GARCÍA; MARTINO; ZARITZKY, 2000). Resultado semelhante foi encontrado por Gennadios et al. (1993), que estudaram o efeito da adição de óleo mineral sobre a propriedade de barreira ao vapor de água de biopolímeros à base de glúten de trigo e encontraram redução de 25% na PVA dos filmes, de $5,6 \times 10^{-11}$ (filme controle) para $4,1 \times 10^{-11}$ para o filme adicionado de óleo.

Ojagh et al (2010) também encontraram redução da PVA em biopolímeros de quitosana incorporados com óleo essencial de canela e, além de atribuir esse resultado à hidrofobicidade do óleo, também citaram a influência de sua estrutura física, demonstrando a partir da análise de microscopia eletrônica de varredura, que os filmes adicionados de óleo apresentaram uma estrutura densa quando analisados superficialmente e a partir de cortes transversais as amostras revelaram-se como folhas empilhadas em camadas compactas, mostrando que o óleo foi incorporado de maneira uniforme ao longo do biofilme. As micrografias de superfície dos filmes em estudo (Figura 1) mostraram irregularidades na dispersão das NFC com a adição do OET, com formação de aglomerados da nanoestrutura pelo biofilme. Esses resultados poderiam interferir de forma a aumentar os valores de PVA, conforme explicado no Artigo 1, porém, a característica hidrofóbica do OET se sobressai, com resultado de diminuição da PVA.

A espessura dos filmes também pode interferir diretamente sobre suas propriedades de permeabilidade. Teoricamente, a taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) varia com o inverso da espessura do material e a permeabilidade ao vapor de água (PVA) deve ser constante. No entanto, estudos demonstram que a PVA aumenta de acordo com a

espessura do material, sendo esse comportamento relacionado a possíveis mudanças estruturais na matriz dos biopolímeros (SOBRAL, 2000). Os tratamentos OET0 e OET40 não diferiram entre si ($p < 0,05$) em suas espessuras e apresentaram os maiores valores, porém, quando compararam-se os resultados a PVA, o filme adicionado de OET apresentou redução da PVA quando comparado ao controle (OET0).

3.7 Propriedades ópticas

A adição de OET foi significativa ($p < 0,05$) para todas as propriedades ópticas analisadas (L^* , a^* , b^* , C^* e transparência), conforme Tabela 5.

Para os resultados de luminosidade (L^*), observa-se aumento da claridade apenas para o filme adicionado de 30% (p/p) de OET. Para o índice de cor vermelho/verde (a^*) tem-se um aumento da tonalidade verde à medida que a concentração de óleo se torna maior, caracterizada pelo aumento do valor negativo de a^* , conforme a escala de cor do sistema CIELAB. O valor do índice de cor amarelo/azul (b^*) sofreu redução significativa apenas da maior concentração de óleo testada (OET40) comparada a todos os tratamentos, indicando diminuição da cor amarela para esse filme. O mesmo resultado foi encontrado para o índice de saturação (C^*), com diminuição progressiva, porém significativa apenas para OET40, caracterizando um filme mais pálido e acinzentado que os demais.

A análise do valor de transparência de filmes destinados à aplicação em alimentos é muito importante, pois prediz sobre a sua utilização. Para produtos onde se objetiva a visualização do conteúdo da embalagem por parte do consumidor, materiais transparentes são necessários, e de modo contrário, existem aqueles produtos que em contato com a luz reagem negativamente, com perda da qualidade e/ou características sensoriais, sendo

Tabela 5 Valores de L^* , a^* , b^* , C^* e transparência ($\log(\%T)/\text{mm}$) de nanobiopolímeros de IPS e NFC adicionados de OET

Nanobiopolímeros	L^*	a^*	b^*	C^*	Transparência ($\log(\%T)/\text{mm}$)
OET0	$88,31^a \pm 0,11$	$-0,08^a \pm 0,05$	$2,21^a \pm 0,24$	$2,21^a \pm 0,23$	$14,15^a \pm 0,85$
OET20	$88,33^a \pm 0,05$	$-0,27^b \pm 0,02$	$1,68^b \pm 0,04$	$1,70^b \pm 0,03$	$13,10^b \pm 0,65$
OET30	$88,66^b \pm 0,05$	$-0,38^b \pm 0,05$	$1,87^{ab} \pm 0,02$	$1,90^{ab} \pm 0,03$	$13,74^b \pm 0,80$
OET40	$88,37^a \pm 0,03$	$-0,67^c \pm 0,03$	$0,38^c \pm 0,12$	$0,77^c \pm 0,08$	$11,68^c \pm 0,18$

* Médias observadas em colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

então, necessária a utilização de materiais de embalagem que protejam o alimento da luz (ROBERTSON et al., 1992). O valor de transparência dos nanobiopolímeros de IPS e NFC adicionados de OET sofreu redução conforme o aumento da concentração de OET. Ramos et al (2012) encontraram valores de transparência variando de 1,35 a 3,43 (A_{600}/mm) para filmes de IPS adicionados de diferentes agentes antimicrobianos. Shaw et al. (2002) encontraram aumento da opacidade de filmes de IPS e glicerol conforme o aumento da concentração de óleo de soja nas formulações, atribuindo esse fato às gotas de óleo dispersas pela matriz proteica, sendo que quanto maior o volume de emulsão presente na solução de formação dos filmes, maior a opacidade final. Fernández-Pan et al (2012) avaliaram a cor de filmes de IPS incorporados com diferentes tipos de óleo essencial e, concluíram que, de modo geral, a cor dos filmes aumentou (a^* e b^*) enquanto a transparência diminuiu de acordo com o aumento da concentração dos óleos.

4 CONCLUSÃO

A adição de até 40% de OET aos nanobiopolímeros de IPS e NFC permitiu a formação de materiais com boa interação entre os constituintes da matriz, com resultados positivos para a PVA, estabilidade térmica e cristalinidade dos nanobiopolímeros. Em relação às propriedades ópticas, verificou-se que os filmes ficaram menos amarelos (b^*), tendendo ao verde (a^*), mais pálidos (c^*) e menos transparentes com a adição do OET. As propriedades mecânicas sofreram redução, caracterizando filmes menos rígidos e elásticos e a MEV revelou prejuízo na dispersão da NFC com a incorporação de OET e formação de bolhas na superfície do tratamento OET30. A adição de até 40% (p/p) de OET aos nanobiopolímeros de IPS e NFC permitiu a formação de materiais com boa interação entre os constituintes e melhoria de várias de suas propriedades.

REFERÊNCIAS

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for enthalpies of fusion and crystallization of polymers by differential scanning calorimetry (DSC). ASTM D 3417-99.** Philadelphia, 1999.

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS – ASTM. **Standard test method for slow rate penetration resistance of flexible barrier films and laminates. ASTM F1306-90.** Philadelphia, 2001.

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS - ASTM. **Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. ASTM D882-02.** Philadelphia, 2002.

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS – ASTM. **Standard test methods for water vapor transmission of materials. ASTM E96-00.** Philadelphia, 2002.

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for transition temperatures of polymers by differential scanning calorimetry. ASTM D3418-03.** Philadelphia, 2003.

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS – ASTM. **Standard test method for transparency of plastic sheeting. ASTM D1746-03.** Philadelphia, 2003.

ANKER, M.; STADING, M.; HERMANSSON, A-M. Effects of pH and the gel state on the mechanical properties, moisture contents and glass transition temperatures of whey protein films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 5, p. 1878-1886, May 1999.

ATEF, M.; REZAEI, M.; BEHROOZ, R. Characterization of physical, mechanical, and antibacterial properties of agar-cellulose bionanocomposite films incorporated with savory essential oil. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 45, p. 150-157, Mar. 2015.

AULIN, C.; GALLSTEDT, M.; LINDSTROM, T. Oxygen and oil barrier properties of microfibrillated cellulose films and coatings. **Cellulose**, Amsterdam, v. 17, n. 3, p. 559-574, June 2010.

AZEVEDO, V. M. et al. Whey protein isolate biodegradable films: Influence of the citric acid and montmorillonite clay nanoparticles on the physical properties. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 43, p. 252-258, Jan. 2015.

BASIAK, E.; DEBEAUFORT, F.; LENART, A. Effect of lamination between plasticized starch layers on film properties. **Food Chemistry**, Easton, v. 195, p. 56-63, Mar. 2016.

CERQUEIRA, M. A.; et al. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films – A comparative study. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 175-184, May 2012.

COLES, R.; MCDOWELL, D.; KIRWAN, M. J. **Food Packaging Technology**. Ed. Blackwell Publishing, Oxford, 346 p., 2003.

COSKUN, B. K.; et al. Antioxidant active packaging with soy edible films and oregano or thyme essential oils for oxidative stability of ground beef patties. **Journal of Food Quality**, Wastport, v. 37, n. 3, p. 203-212, May 2014.

DAINELLI, D.; et al. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 10, n. 1, p. S103-S112, Nov. 2008.

FANG, Y.; et al. Tensile and barrier properties of edible films made from whey proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 1, p. 188-193, Jan. 2002.

FERNÁNDEZ-PAN, I.; ROYO, M.; MATÉ, J. I. Antimicrobial activity of whey protein isolate edible films with essential oils against food spoilers and foodborne pathogens. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 77, n. 7, p. M383-M390, July 2012.

FRATIANNI, F.; et al. Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, n. 8, p. M528-M535, Oct. 2010.

GALIETTA, G.; et al. Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 12, p. 3123-3130, Dec. 1998.

GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Lipid addition to improved barrier properties of edible starch-based films and coatings. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 65, n. 6, p. 941-947, Aug. 2000.

GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F. Modification of physical and mechanical barrier properties of edible wheat gluten-based films. **Cereal Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 426-429, 1993.

- GHANBARZADEH, B.; OROMIEHI, A. R. Studies on glass transition temperature of mono and bilayer protein films plasticized by glycerol and olive oil. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 109, n. 5, p. 2848-2854, Sept. 2008.
- HAMMAN, F.; SCHMID, M. Determination and quantification of molecular interactions in protein films: a review. **Materials**, Basel, v. 7, n. 12, p. 7975-7996, Dec. 2014.
- HONG, S. -I.; KROCHTA, J. M. Oxygen barrier performance of whey protein coated plastic films as affected by temperature, relative humidity, base film and protein type. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 77, n. 3, p. 739-745, Dec. 2006.
- HOSSEINI, M. H.; RAVAZI, S. H.; MOUSAVI, M. A. Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. **Journal of Food Processing and Preservation**, Malden, v. 33, n. 6, p. 727-743, Dec. 2009.
- JONES, A.; MANDAL, A.; SHARMA, S. Protein-based bioplastics and their antibacterial potential. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 132, n. 18, p. 41931, DOI: 10.1002/APP.41931, May 2015.
- KADAM, D. M.; et al. Preparation and characterization of whey protein isolate films reinforced with porous silica coated titania nanoparticles. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 117, n. 1, p. 133-140, July 2013.
- KAVOOZI, G.; et al. Effects of essential oil on the water binding capacity, physico-mechanical properties, antioxidant and antibacterial activity of gelatin films. **LTW - Food Science and Technology**, London, v. 57, n. 2, p. 556-561, July 2014.
- LE TIEN, C.; et al. Development of biodegradable films from whey proteins by cross-linking and entrapment in cellulose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 11, p. 5566-5575, Nov. 2000.
- LIU, L.; KERRY, J. F.; KERRY, J. P. Effect of food ingredients and selected lipids on the physical properties of extruded edible films/casings. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 295-302, Mar. 2006.
- MOR, Y.; SHOEMAKER, C. F.; ROSENBERG, M. Compressive properties of whey protein composite gels containing fractionated milkfat. **Food Engineering and Physical Properties**, Malden, v. 64, n.6, p. 1078-1083, Nov. 1999.

MULLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; YAMASHITA, F. Effect of cellulose fibers on the crystallinity and mechanical properties of starch-based films at different relative humidity values. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 77, n. 2, p. 292-299, June 2009.

OJAGH, S. M.; et al. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. **Food Chemistry**, Easton, v. 122, n. 2, p. 161-166, Sept. 2010.

OYMACI, P.; ALTINKAYA, S. A. Improvement of barrier and mechanical properties of whey protein isolate based food packaging films by incorporation of zein nanoparticles as a novel bionanocomposite. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 54, part A, p. 1-9, Mar. 2016.

PELLISSARI, F. M.; et al. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 16, p. 7499-7504, Aug. 2009.

PIRES, C.; et al. Hake protein edible films incorporated with essential oils: physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 224-231, Jan. 2013.

RAMOS, O. L.; et al. Feature and performance of edible films obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobials compounds. **Food Research International**, Barking, v. 45, n. 1, p. 351-361, Jan. 2012.

RAMOS, O. L.; et al. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 110-122, Jan. 2013.

ROBERTSON, G. L. **Food packaging: Principles and practice**. New York: Marcel Dekker, 876 p. 1992.

RUBILAR, J. F.; et al. Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 114, n. 4, p. 466-474, Apr. 2013.

SANCHEZ-GARCIA, M. D.; LAGARON, J. M. On the use of plant cellulose nanowhiskers to enhance the barrier properties of polylactic acid. **Cellulose**, Amsterdam, v. 17, n. 5, p. 987-1004, Oct. 2010.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; et al. **Embalagens plásticas flexíveis: Principais polímeros e avaliação das propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, 267 p., 2002.

SCOLLARD, J.; FRANCIS, G. A.; O'BEIRNE, D. Some conventional and latent anti-listerial effects of essential oils, herbs, carrot and cabbage in fresh-cut vegetable systems. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 77, p. 87-93, Mar. 2013.

SEGAL, L.; et al. An empirical method for estimated the degree of cristallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786-794, Oct. 1959.

SHAW, N. B.; et al. Effect of soya oil and glycerol on physical properties of composite WPI films. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 51, n. 4, p. 299-304, Mar. 2002.

SIRACUSA, V.; et al. Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 19, n. 12, p. 634-643, Dec. 2008.

SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B. R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 770-775, Nov.-Dec. 2010.

SIRÓ, I.; PLACKETT, D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. **Cellulose**, Amsterdam, v. 17, n. 3, p. 459-494, June 2010.

SOARES, N. F. F.; et al. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 4, p. 370-378, Jun. 2009.

SOBRAL, P. J. DO A. Influência da espessura de biopolímeros feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 6, p. 1251-1259, Jun. 2000.

SPENCE, K. L.; et al. The effect of chemical composition on microfibrillar cellulose films from wood pulps: water interactions and physical properties for packaging applications. **Cellulose**, Amsterdam, v. 17, n. 4, p. 835-848, Aug. 2010.

TOMAINO, A.; et al. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, Easton, v. 89, n. 4, p. 549-554, Mar. 2005.

UNGARI, M. B. **Estudo da influência do grau de cristalinidade nas propriedades mecânicas do polietileno tereftalato (PET) processado a baixas taxas de resfriamento**. 1999. 106 p. Dissertação (Mestrado em

Engenharia e Ciência dos Materiais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – 1999.

YANISHLIEVA, N. V.; MARINOVA, E.; POKORNÝ, J. Natural antioxidants from herbs and spices. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Malden, v. 108, part B, p. 776-793, Oct. 2006.

ZIVANOVIC, S.; CHI, S.; DRAUGHON, A. F. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, n. 1, p. M45-M41, Jan. 2005.

ZINOVIADOU, K. G.; KOUTSOUMANIS, K. P.; BILIADERIS, C. G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. **Meat Science, Barking**, n. 82, n. 3, p. 338-345, July 2009.

ARTIGO 3

EFEITO DA APLICAÇÃO DE NANOBIOPOLÍMEROS DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE E NANOFIBRA DE CELULOSE INCORPORADOS COM ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO NA OXIDAÇÃO LIPÍDICA E COR DE CARNE MOÍDA

RESUMO

A adição de óleo essencial de tomilho (OET) em filmes biodegradáveis é uma alternativa interessante aos antioxidantes sintéticos comumente utilizados hoje em dia. Foram investigadas as propriedades antioxidantes do OET e o efeito de sua adição em diferentes concentrações (20; 30 e 40% p/p) sobre as propriedades antioxidantes de nanobiopolímeros de isolado proteico de soro de leite (IPS) e nanofibra de celulose (NFC). Também foi avaliado o efeito dos filmes ativos sobre a prevenção da oxidação de carne moída (*Biceps femoris*) pela análise do índice TBARS e cor objetiva (L^* , a^* , b^* , C^* e h^*) das carnes pelo período de 4 dias de armazenamento a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O experimento foi conduzido em três repetições e houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos estudados. A atividade antioxidante (%) dos filmes ativos aumentou de acordo com o aumento da concentração de OET. O OET apresentou atividade antioxidante. Os filmes adicionados de OET foram capazes de reduzir os valores de oxidação das amostras de carne moída medidas pelo índice TBARS ao final do experimento, comparadas ao controle. Para a análise da cor objetiva, a adição da menor concentração de OET (20% p/p) foi suficiente para a manutenção da cor vermelha das carnes (a^* e h^*), assim como do índice de saturação da cor (C^*). Sugere-se que a aplicação de nanobiopolímeros de IPS e NFC contendo 20% (p/p) de OET já seja suficiente para reduzir a oxidação e manter a cor vermelha da carne moída no período e condições estudadas.

Palavras-chave: Embalagens ativas. Índice de TBARS. Oxidação da carne moída.

1 INTRODUÇÃO

A carne é um dos alimentos mais consumidos em todo o mundo por ser fonte de proteínas de alto valor biológico, vitaminas, minerais e outros nutrientes. Nos países em desenvolvimento, na medida em que se aumenta o poder aquisitivo da população, há também o aumento do consumo de carne (MELO, 2010). O Brasil ocupa o segundo lugar no *ranking* de produção de carne bovina do mundo, sendo ultrapassado apenas pelos Estados Unidos. Em relação aos valores de exportação do produto, o país se consolida em primeiro lugar já há alguns anos, com valor total de exportação de mais de 1,3 milhão de toneladas no ano de 2015 (MAPA, 2015; ABIEC, 2015).

A carne bovina normalmente é comercializada *in-natura*, sendo nessa condição altamente perecível devido à sua composição química, ao elevado teor de nutrientes e à elevada atividade de água, que favorece o crescimento microbiano, principal fator de deterioração do produto (TORNUK et al, 2015). Além deste fator, a oxidação lipídica e de pigmentos também é causa de sua deterioração, inclusive em armazenamento sob refrigeração, interferindo em suas características de odor, sabor, aroma, cor e textura, com consequente diminuição da aceitabilidade do produto pelo consumidor (BARBOSA-PEREIRA et al, 2014; RAMOS; GOMIDE, 2007).

A carne moída é definida como “o produto cárneo obtido a partir da moagem de massas musculares de carcaças de bovinos, seguido de imediato resfriamento ou congelamento” (MAPA, 2003) e oferece grande risco de contaminação e oxidação devido a sua maior superfície de contato e grande manipulação (NASCIMENTO et al., 2014).

Como modo de prevenir a oxidação em carnes e produtos cárneos, a adição de antioxidantes é bastante utilizada pela indústria de alimentos, sendo os principais de origem sintética como o butil-hidroxi-tolueno (BHT),

butil-hidroxi-anisol (BHA) e o terc-butil-hidroxiquinona (TBHQ). Esses antioxidantes são escolhidos para utilização devido, principalmente, ao seu menor custo e por serem eficientes (COSKUN et al, 2014). Contudo, o efeito de antioxidantes sintéticos sobre a saúde dos consumidores ainda não está totalmente esclarecido e por isso, estudos têm sido realizados com o objetivo de encontrar produtos naturais que apresentem atividade antioxidante e que possam, então, serem utilizados em alimentos ou associados aos antioxidantes sintéticos, diminuindo sua concentração final no produto (NISA et al., 2015; ORTUÑO; SERRANO; BAÑÓN., 2015; COSKUN et al., 2014).

A adição de antioxidantes naturais em carne *in natura* vem sendo amplamente estudada, sendo utilizados produtos como: ervas aromáticas (alecrim), vitaminas (α -tocoferol, ácido ascórbico), óleos essenciais de plantas e especiarias (sálvia, orégano, tomilho, alho), dentre outros (SUN; HOLLEY, 2012; HYGREEVA; PANDEY; RADHAKRISHNA, 2014).

Os óleos essenciais são largamente conhecidos por sua proteção antioxidante, antimicrobiana e antifúngica em alimentos, sendo constituídos por uma gama de substâncias ativas derivadas da planta de origem, compostos aromáticos e voláteis. O tomilho (*Thymus vulgaris* L.) é uma erva aromática, muito utilizada como tempero de pratos à base de carne, peixes e cozidos. O óleo essencial de tomilho apresenta atividade antioxidante intensa, principalmente devido à presença de compostos fenólicos e flavonóides, sendo os principais agentes com atividade, pertencentes à classe dos fenilpropanóides, timol e carvacrol (DEL RÉ; JORGE., 2012; RIMINI; PETRACCI; SMITH., 2014; PIRES et al., 2011).

Porém, ao serem adicionados diretamente sobre os alimentos, os óleos essenciais podem interferir nas características de sabor, odor, aroma e cor desses produtos, modificando a aceitabilidade do alimento por parte do consumidor (HYGREEVA; PANDEY; RADHAKRISHNA., 2014; RIMINI;

PETRACCI; SMITH, 2014; CAMO; BÉLTRAN; RONCÁLES, 2008). Como forma de minimizar as modificações sensoriais decorridas da adição direta do agente antioxidante sobre o alimento, tem-se estudado o desenvolvimento de embalagens ativas adicionadas de óleos essenciais (CHI; ZIVANOVIC; PENFIELD, 2006; PIRES et al, 2013). O princípio de funcionamento desse tipo de embalagem consiste na incorporação ao material do filme, de agentes que possuam alguma atividade sobre o alimento, em menores concentrações, e que vão atuar no produto por meio de liberação controlada, mantendo sua vida útil por mais tempo (GÓMEZ-ESTACA et al, 2014; LORENZO; BATLLE; GÓMEZ, 2014; ARFAT et al, 2015).

Embalagens produzidas a partir de materiais biodegradáveis minimizam os danos ambientais ocasionados pelas embalagens sintéticas, podendo também ser formuladas a partir de subprodutos da indústria. Filmes ativos produzidos a partir de isolado proteico de soro de leite (IPS) têm sido estudados, apresentando resultados positivos sobre algumas propriedades importantes das embalagens alimentares como elevada barreira ao oxigênio, capacidade de liberação de agentes antimicrobianos, antioxidantes, corantes, dentre outros (JANJARASSKUL; TANANUWONG; KROCHRA, 2011; VONASEK; LE; NITIN, 2014). Quando adicionados de nanopartículas, como as nanofibras de celulose (NFC), esses filmes são incrementados quanto às propriedades mecânicas e de permeabilidade ao vapor de água (SANTOS et al., 2014; AZEREDO et al., 2008), tornando-se ainda mais interessantes à aplicação em alimentos.

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito antioxidante de nanobiopolímeros ativos de IPS e NFC incorporados ao óleo essencial de tomilho, e sua ação na prevenção da oxidação de carne moída, para manutenção da qualidade da carne armazenada em temperatura de refrigeração ($4 \pm 1^\circ\text{C}$).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Isolado proteico de soro de leite (IPS 9400) fornecido pela *Hilmar Ingredients* (Hilmar, CA, EUA), glicerol (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA), nanofibra de celulose (NFC) cedida pelo Departamento de Engenharia Florestal – UFLA e óleo essencial de tomilho (OET) (Ferquima, Vargem Grande Paulista, SP).

2.2 Planejamento experimental

O experimento foi conduzido usando um delineamento inteiramente casualizado (DIC). A concentração de NFC foi fixada em 4% (p/p) baseado nos resultados obtidos e demonstrados no Artigo 1. As concentrações de OET variaram de 0 (controle); 20; 30 e 40% (p/p), sendo os filmes denominados de OET0, OET20, OET30 e OET40. O experimento foi conduzido em três repetições.

Para a avaliação do efeito antioxidante dos filmes em carne moída, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 5 x 5, sendo quatro nanobiopolímeros (OET0, OET20, OET30 e OET40) mais a amostra controle (sem aplicação de biofilme), e cinco tempos de armazenamento (0; 1; 2; 3 e 4 dias), condicionados a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, com três repetições.

2.3 Desenvolvimento dos filmes

Os biopolímeros de IPS e NFC incorporados com OET foram produzidos no Laboratório de Embalagens da Universidade Federal de Lavras (UFLA), pelo método *casting* e desenvolvidos de acordo com

Azevedo et al. (2015), com algumas modificações. IPS e glicerol foram fixados nas quantidades de 6% (p/v) em relação ao volume de solução e 30% (p/p) em relação ao polímero base. Para a produção do filme OET0 (controle), IPS foi dissolvido separadamente em água destilada assim como o glicerol e NFC, mantidos sob agitação durante 30 minutos. Depois disso, as duas soluções foram misturadas e agitadas novamente por 10 minutos, o pH foi corrigido para 8,0 com solução de NaOH 1N e a solução foi agitada em homogeneizador ultrassônico para dispersão das nanopartículas (*Sonifier Cell Disruptor Branson* – Modelo 450D, Manchester, UK) por 10 minutos com amplitude de 80% a 25°C. Posteriormente, as soluções foram levadas a banho-maria a 90°C por 30 minutos, resfriadas e vertidas em placas de vidro com dimensões de 18 x 30 cm. O OET (20; 30 e 40% em relação ao polímero base) foi adicionado após a solução filmogênica ter sido resfriada, sendo misturado em ultrassom *Sonifier Cell Disruptor Branson* (Modelo 450D, Manchester, UK) por 5 minutos (ZINOVIADOU; KOUTSOUMANIS; BILIADERIS, 2009). As soluções permaneceram por 48 horas nas placas até que o solvente fosse evaporado, com formação dos filmes. O volume final para cada solução vertida foi de 125mL.

2.4 Quantificação de timol e carvacrol no OET e nos nanobiopolímeros ativos

A análise de cromatografia gasosa (CG) foi realizada no Departamento de Química da UFLA, com o objetivo de quantificar os teores dos dois compostos majoritários e com atividade antioxidante no OET e nos nanobiopolímeros ativos: timol e carvacrol (PIRES et al, 2011).

A extração do óleo essencial dos nanobiopolímeros ativos foi desenvolvida conforme descrito por Chi et al (2006), com algumas modificações. Para a extração, 1,0g de filme foi cortado em pequenos pedaços e misturado a 10mL de hexano em agitador magnético durante 1

hora à temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). O extrato foi separado do filme e novamente agitado com 5mL de hexano para máxima extração do óleo. Posteriormente, uma alíquota de 1 μL do conteúdo total extraído, foi levada para a análise cromatográfica.

A análise cromatográfica do OET e dos extratos dos nanobiopolímeros ativos foi realizada de acordo com Guimarães et al (2011), com algumas modificações. Para realizar a quantificação dos constituintes, utilizou-se o equipamento Cromatógrafo Gasoso *Shimadzu GC-2010* (Kyoto, *Japão*) equipado com detector por ionização de chamas, com condições de operação: coluna RTX-5MS, temperatura do injetor de 250°C ; programação da coluna com temperatura inicial de 40°C , sendo acrescidos $15^\circ\text{C}/\text{min}$ até atingir 300°C , gás carreador (fase móvel) hélio; taxa de split 1:10, e volume de injeção de 1 μL .

Para a quantificação do timol e carvacrol, uma curva padrão com diferentes concentrações conhecidas das duas substâncias foi obtida, com utilização dos padrões timol (Sigma-Aldrich, 99,5% de grau de pureza) e carvacrol (Sigma-Aldrich, 98% de grau de pureza).

2.5 Análise da atividade antioxidante do OET e dos nanobiopolímeros ativos

2.5.1 Análise de potencial antioxidante por sequestro de radicais DPPH[•]

A avaliação da atividade antioxidante do OET e dos nanobiopolímeros ativos foi realizada no Laboratório de Embalagens da UFLA, por meio do sequestro de radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH[•], foi realizada de acordo com as metodologias de Lopes-Lutz et al. (2008) e Sousa et al. (2007), com algumas modificações. Foram preparadas: solução de DPPH em metanol na concentração de $40\mu\text{g mL}^{-1}$, mantida ao

abrigo de luz e sob refrigeração até o momento do uso; e soluções de OET também em metanol nas concentrações de 4000; 3000; 2000; 1000; 500 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A mesma metodologia foi utilizada para o antioxidante sintético BHT, com intuito de se comparar a atividade antioxidante deste com o OET.

A extração dos compostos com atividade antioxidante dos nanobiopolímeros ativos foi realizada de acordo com Siripatrawan & Harte (2010), com algumas modificações: 0,1g de amostra foi pesada e cortada em pequenos pedaços, adicionado de 3mL de metanol 80% e misturado em agitador de tubos vortex durante 3 minutos, seguido de repouso por 3 horas em temperatura ambiente ($23\pm 2^\circ\text{C}$) e ao abrigo de luz. Após esse período, os tubos foram novamente agitados em vortex por mais 3 minutos e mantidos em repouso durante 10 minutos nas mesmas condições citadas anteriormente para obtenção do extrato.

Para gerar a reação, 0,3mL das soluções de OET e os extratos obtidos por meio dos nanobiopolímeros foram misturados a 2,7mL de solução de DPPH em metanol em tubo de ensaio. Após 60 minutos de repouso ao abrigo de luz, a leitura foi realizada em espectrofotômetro Bel SPECTRO S-2000 (Monza, Itália) a 515nm. A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) para cada concentração de OET testada e para os extratos dos filmes foi calculada de acordo com a Equação 1.

$$\% \text{AA} = 1 - (A_{\text{amostra}}/A_{\text{controle}}) \times 100 \quad (1)$$

Onde: A_{amostra} se refere à leitura de absorvância das soluções com amostras e DPPH; e A_{controle} é a leitura da absorvância da solução controle (todos os reagentes com exceção dos compostos avaliados).

A partir dos valores obtidos para a atividade antioxidante do óleo essencial e BHT, foram obtidas as equações da reta de %AA e o cálculo de IC_{50} , valor correspondente à quantidade de amostra necessária para se reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH[•].

2.5.2 Análise da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico

A avaliação da atividade antioxidante utilizando o ensaio de branqueamento do β -caroteno para o OET e para os nanobiopolímeros ativos também foi realizada no Departamento de Embalagens da UFLA, de acordo com as metodologias apresentadas por Lopes-Lutz et al. (2008) e Wang et al. (2008) com algumas modificações. Uma solução de β -caroteno em clorofórmio foi preparada ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$), em seguida, 0,4mL dessa solução, 40 μ L de ácido linoleico e 400mg de Tween 20[®] foram misturados e o clorofórmio evaporado em rotaevaporador. Após a evaporação, 100 mL de água destilada saturada com oxigênio (30 minutos sob oxigenação) foram adicionados de forma lenta sobre a mistura, com agitação constante e submetida à homogeneização em homogeneizador ultrassônico Sonifier Cell Disruptor Branson (Modelo 450D, Manchester, UK) por 1 minuto com amplitude de 50% (Emulsão A). Em seguida, 5mL da emulsão A foram adicionados a tubos de ensaio e acrescidos de 200 μ L das soluções metanólicas de OET nas concentrações de 4000; 3000; 2000; 1000; 500 e 100 μ g mL^{-1} .

Para a análise dos nanobiopolímeros, 4mL da emulsão A foram adicionados aos tubos de ensaio contendo amostras de 2x2cm dos nanobiopolímeros cortados em pequenos pedaços (PHOOPURITHAM et al, 2011). Paralelamente, foram preparadas duas soluções, uma sem o

antioxidante (controle) e outra com os mesmos reagentes da emulsão A, sem o β -caroteno (emulsão B – branco).

As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro Bel SPECTRO S-2000 (Monza, Itália) a 470nm, nos tempos 0, após adição do antioxidante sobre a emulsão A, e após 60 minutos de incubação dos tubos de ensaio em banho-maria a 50°C. A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) para cada concentração de OET testada e para os extratos dos filmes foi calculada de acordo com a Equação 2.

$$\%AA = 100 \times (DC - DA) / DC \quad (2)$$

Onde: DC se refere ao grau de degradação do controle = $[\ln(a/b)/60]$; DA é o grau de degradação na presença da amostra = $[\ln(a/b)/60]$; a = absorvância no tempo 0; b= absorvância final (após 60 minutos de incubação).

2.6 Preparação da carne moída e acondicionamento

A preparação da carne moída e acondicionamento foram realizados no Laboratório de Carnes do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA. Cortes de coxão duro (*Biceps femoris*) foram obtidos em açougue local no dia do preparo. A carne foi cortada em pedaços menores e moída em moedor de carnes elétrico (BECCARO® modelo Picador PB-22, Brasil), utilizando-se uma placa com orifícios de 8mm de diâmetro. A carne moída foi dividida em cinco porções iguais, correspondentes aos 5 tratamentos: amostra controle (sem nanobiofilme), filme controle (OET0), e nanobiopolímeros incorporados com 20; 30 e 40% (p/p) de OET: OET20, OET30 e OET40. Em seguida, cerca de 60g de carne moída foram pesadas e

dimensionadas sob pressão em forma de hambúrguer com o uso de formas plásticas de 10cm de diâmetro. As amostras foram colocadas em bandejas de poliestireno, cobertas superficialmente pelos nanobiopolímeros e embalados com filmes comerciais de cloreto de polivinila (PVC). A carne embalada foi acondicionada em câmara climática tipo BOD (modelo EL202, EletroLab, Brasil), à temperatura controlada de $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sendo submetidas a fotoperíodo de 12 horas (luz/escuro). As análises de oxidação lipídica e cor foram realizadas nos tempos 0; 1; 2; 3 e 4 dias.

2.7 Índice de TBARS

A análise foi realizada no Laboratório de Carnes do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA. A oxidação lipídica das amostras de carne moída foi analisada pelo índice de TBARS e foi realizada segundo metodologia descrita por Raharjo; Sofos; Schmidt (1992), com modificações descritas por Cardoso et al. (2016).

Foram pesados 10g de amostra e adicionados de 40mL de solução de ácido tricloroacético 5% (TCA) e 1mL de solução de BHT (2,6-di-tert-butil-4-methylphenol) 0,3% (em etanol), sendo a mistura triturada em homogeneizador Politron até se obter um líquido homogêneo (5 minutos). Em seguida, a solução foi filtrada em papel filtro e o volume filtrado ajustado para 50mL com TCA 5%. Alíquotas de 2mL foram retiradas e transferidas para tubos de ensaio contendo 2mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,08 M (TBA, diluído em ácido acético glacial 50%). Os tubos foram colocados em banho-maria a 90°C durante 10 minutos e em seguida, resfriados à temperatura ambiente, sendo submetidos à leitura da absorvância em espectrofotômetro SP 2000UV (BEL Photonics) a 532nm.

Os valores foram expressos em miligrama de malonaldeído (MDA) por kilograma de amostra (mg de MDA/kg), de acordo com o cálculo: valor

da absorvância lida x 7,38 (valor de correção para as leituras das absorvâncias) (CARDOSO et al., 2016). Para cada repetição, as médias foram obtidas por meio da média de, pelo menos, duas replicatas.

2.8 Cor objetiva

A análise foi realizada no Laboratório de Carnes do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA. A avaliação objetiva da cor foi realizada com o uso de um colorímetro espectrofotométrico modelo CM-700 (Kônica Minolta, Japão) com porta de abertura de 8 mm, iluminante A, ângulo de 10° para o observador e reflectância especular excluída (SCE).

As leituras foram realizadas na superfície das carnes sem o recobrimento dos filmes e foram retirados os valores de leitura de cinco pontos distintos da superfície de cada amostra.

Os índices de cor: luminosidade (L^*), índice de vermelho (a^*) e índice de amarelo (b^*) foram obtidos pelo valor médio da leitura de cinco pontos distintos da superfície das amostras e a partir deles, os índices de saturação (C^*) e ângulo de tonalidade (h^* ; em graus) foram calculados com utilização das fórmulas (RAMOS; GOMIDE, 2007): $C^* = [(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}]$ e $h^* = \tan^{-1} (b^*/a^*)$.

2.9 Análise estatística

Para as análises de quantificação de timol e carvacrol e análise antioxidante do óleo foi realizada análise de variância (ANOVA) utilizando-se o programa SAS® (Cary, SC) ($p < 0,05$) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey. Para os resultados de análise antioxidante dos filmes, índice de TBARS e cor objetiva das carnes foram realizadas a

análise de variância (ANOVA) e a análise de regressão, cujos modelos linear, quadrático e cúbico foram testados, sendo avaliados pelo coeficiente de regressão R^2 . O experimento foi conduzido em três repetições.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Quantificação de timol e carvacrol no OET e nos nanobiopolímeros ativos

A concentração de timol (5270,80 mg/L) foi cerca de 1,5 vezes o valor encontrado para carvacrol (3572,82 mg/L). Pires et al. (2011) analisaram os principais constituintes do óleo essencial de tomilho comercial por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) para aplicação em nanobiopolímeros de proteína de peixe e encontraram o timol como composto majoritário, com concentração de aproximadamente 14 vezes a mais que a do segundo principal constituinte, o carvacrol. Jouki et al. (2014) utilizando a mesma metodologia de identificação (CG-MS), encontraram como principais constituintes do óleo essencial de tomilho, o timol, ρ -cimeno, carvacrol e γ -terpineno, sendo o ρ -cimeno e γ -terpineno os compostos precursores de timol e carvacrol, com a concentração do timol cerca de 6 vezes maior que a de carvacrol. Hudaib et al. (2002) analisaram a constituição de óleos essenciais de tomilho obtidos a partir de diferentes períodos e ciclos de vida da planta, encontrando diferenças de rendimento do óleo e na concentração de timol e carvacrol entre os tratamentos. Segundo o estudo, plantas jovens (dois anos) obtiveram maior rendimento de óleo e maior concentração de timol e carvacrol do que plantas mais velhas (cinco anos), sendo a variação explicada pelas diferenças durante o cultivo e crescimento das plantas.

Os óleos essenciais têm sua atividade antioxidante relacionada à natureza de seus constituintes e também a sua própria capacidade de resistir à degradação oxidativa. Na maioria das vezes, sua capacidade antioxidante está relacionada à presença de compostos com grupamento hidroxila (-OH) que atuam cedendo um átomo de hidrogênio e impedindo a oxidação por cessar a produção de radicais livres durante o processo (DIMA et al.; 2014). Para o OET, a atividade antioxidante é determinada, principalmente, pela presença dos compostos fenólicos timol e carvacrol, que possuem em sua estrutura um anel aromático ligado a um grupamento hidroxila (DEL RÉ & JORGE, 2012).

Para os nanobiopolímeros incorporados com OET, também pode-se observar a presença de ambos os constituintes (Figura 1). Tendo em vista a quantidade de OET adicionado a cada tratamento e os valores encontrados de timol e carvacrol para o OET puro, as concentrações esperadas para ambos os compostos nos filmes seria de, aproximadamente, 0,104; 0,148 e 0,197mg/g de filme para timol e de 0,07; 0,100 e 0,134mg/g de filme para carvacrol, para os tratamentos OET20; OET30 e OET40, respectivamente.

Entretanto, as concentrações encontradas foram menores que as estimadas (Figura 1). Timol e carvacrol são compostos voláteis, podendo sofrer perda para o ambiente e degradação durante a etapa de secagem dos filmes por *casting*, principalmente quando não se tem controle da temperatura do ambiente (CHI; ZIVANOVIC; PENFIELD, 2006), tornando necessária a verificação da permanência desses compostos após a formação dos nanobiopolímeros.

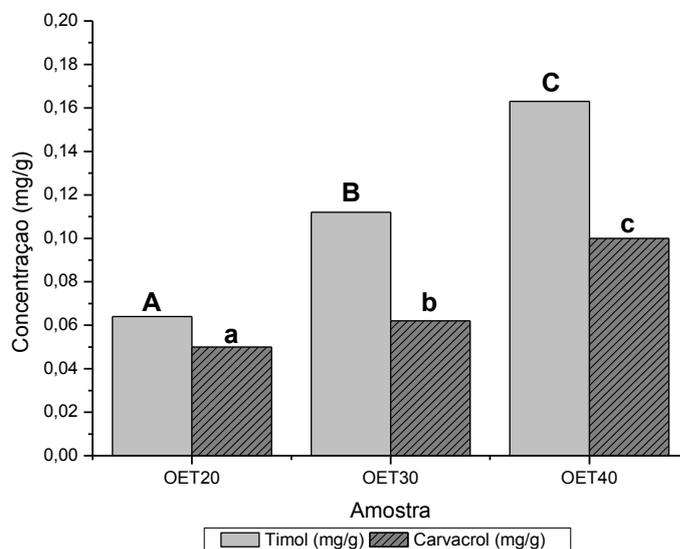


Figura 1 Concentração (mg/g) dos compostos timol e carvacrol presentes em nanobiopolímeros de IPS e NFC incorporados com diferentes concentrações de OET.

Chi et al (2006) analisaram a presença de carvacrol em biopolímeros de quitosana e óleo essencial de orégano produzidos por *casting*, à temperatura de 30°C, e também observaram a diminuição significativa dos níveis deste composto para o valor de $2,1 \pm 0,5 \text{ mg/L}^{-1}$, relacionando este fato à perda dos constituintes voláteis do óleo durante a etapa de secagem dos filmes.

3.2 Análise da atividade antioxidante do OET e nanobiopolímeros ativos

3.2.1 Análise da atividade antioxidante por sistema β -caroteno/ácido linoleico e DPPH para OET

As atividades antioxidantes (%) das diferentes concentrações de OET e BHT avaliadas pelo sequestro de radical livre DPPH e sistema β -caroteno/ácido linoleico estão apresentadas na Tabela 1, com avaliação da

diferença das atividades entre os compostos para cada metodologia separadamente ($p < 0,05$). Observa-se que para os dois métodos testados, a atividade antioxidante foi significativamente maior para praticamente todas as concentrações de BHT, que pode ser explicada pela sua maior dificuldade em se doar um elétron para a estabilização do radical livre DPPH[•] (GUIMARÃES et al, 2011). De modo geral, tem-se tanto para o OET quanto para o BHT o aumento da atividade antioxidante (%) de acordo com as concentrações utilizadas, resultado semelhante ao encontrado por outros estudos (PHOOPURITHAM et al, 2011; JOUKI et al, 2014; KULISIC et al, 2004; WANG et al, 2008).

O método de análise da atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH consiste na doação de hidrogênio por parte do antioxidante para a estabilização do radical DPPH[•] em 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), com mudança da solução de coloração púrpura para amarela, sendo a intensidade da mudança monitorada pelo decréscimo da absorvância (KULISIC et al.; 2004). Já para o método de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, a avaliação é feita pela observação da capacidade do antioxidante em inibir os radicais livres produzidos durante a peroxidação do ácido linoleico, protegendo o substrato β -caroteno da oxidação. Quando este é oxidado pela reação com os radicais formados pela oxidação do ácido linoleico, a solução perde cor (branqueamento do β -caroteno), sendo que na presença de antioxidantes essa descoloração é reduzida, com manutenção da cor amarela da solução (DUARTE-ALMEIDA et al.; 2006).

Tabela 1 Atividades antioxidantes (%) dos compostos estudados diante as metodologias empregadas

Metodologia	Concentrações ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Compostos	
		OET	BHT
Sequestro de DPPH	100	$3,56^a \pm 0,36$	$8,38^b \pm 1,43$
	500	$9,25^a \pm 0,43$	$61,98^b \pm 1,31$
	1.000	$22,16^a \pm 1,33$	$68,83^b \pm 1,25$
	2.000	$36,48^a \pm 1,36$	$71,35^b \pm 0,71$
	3.000	$40,72^a \pm 1,63$	$82,53^b \pm 0,84$
	4.000	$42,13^a \pm 1,70$	$88,19^b \pm 1,72$
Sistema β - caroteno/ácido linoléico	100	$2,88^a \pm 0,35$	$7,36^b \pm 0,45$
	500	$15,55^a \pm 1,11$	$25,33^b \pm 0,50$
	1.000	$28,27^a \pm 0,79$	$31,52^b \pm 1,00$
	2.000	$55,13^a \pm 0,34$	$56,08^a \pm 0,68$
	3.000	$71,03^a \pm 0,59$	$71,05^a \pm 0,57$
	4.000	$78,60^a \pm 1,82$	$85,84^b \pm 1,18$

* Médias observadas em linhas com a mesma letra não diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

Pelos resultados obtidos no sistema β -caroteno/ácido linoleico, a atividade antioxidante do OET se manteve igual à encontrada pelo BHT para as concentrações de 2.000 e 3.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Kulisic et al. (2004) compararam a atividade antioxidante a partir do sistema β -caroteno/ácido linoleico de vários constituintes frente ao óleo essencial de orégano e também encontraram uma atividade maior para o BHT quando comparado ao óleo essencial. Também concluíram, por meio da avaliação de diferentes frações do óleo essencial (CHO, CH e compostos fenólicos) e de seus constituintes majoritários (timol e carvacrol), que o poder de preservação da coloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico foi mais eficiente para a fração CHO do óleo. A maior atividade antioxidante encontrada pela fração CHO do óleo, sugere, segundo eles, que a atividade antioxidante desse óleo também está relacionada aos constituintes mais polares, ampliando a área de ação do composto dentro do sistema, apresentando maior efetividade na proteção do ácido linoleico.

Assim sendo, a presença de timol e carvacrol no OET utilizado na produção e nos nanobiopolímeros ativos (Figura 1) prediz sobre as propriedades antioxidantes dos filmes, confirmadas pelas análises de DPPH e β -caroteno (Tabela 1).

A partir da correlação entre os dados da atividade antioxidante (%AA), resultantes da análise de DPPH, e as diferentes concentrações testadas para o OET e antioxidante sintético BHT, foram obtidos os valores de IC_{50} (Tabela 2), sendo que quanto maior for o consumo de DPPH pela amostra, menor será seu valor de IC_{50} e maior a sua atividade antioxidante (UGALDE, 2014). A maior concentração de OET necessária para a redução de 50% do valor inicial de radical DPPH, quando comparado ao valor obtido pelo antioxidante sintético BHT é encontrado em diversos estudos. Miranda (2010) encontrou valor de IC_{50} de 1.379,54 e 43,95 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o óleo essencial extraído a partir de folhas frescas de tomilho e para o BHT, respectivamente.

Tabela 2 Equações da reta e IC_{50} do OET e BHT estudados pela análise antioxidante DPPH

Amostra	Equação da reta	IC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
OET	$y = -0,00008x + 0,6546$ ($R^2 = 0,8393$)	2470,0
BHT	$y = -0,0001 + 0,6519$ ($R^2 = 0,9714$)	1600,0

3.3 Avaliação do potencial antioxidante por DPPH e sistema β -caroteno/ácido linoleico para os nanobiopolímeros ativos

As atividades antioxidantes dos diferentes tratamentos de nanobiopolímeros ativos de IPS e OET pelos métodos de sequestro de radicais DPPH e oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico é mostrada na Figura 2.

Os filmes com OET apresentaram maiores valores de atividade antioxidante tanto para a metodologia de sequestro de radicais DPPH quanto para as análises realizadas através do sistema β -caroteno/ácido linoleico.

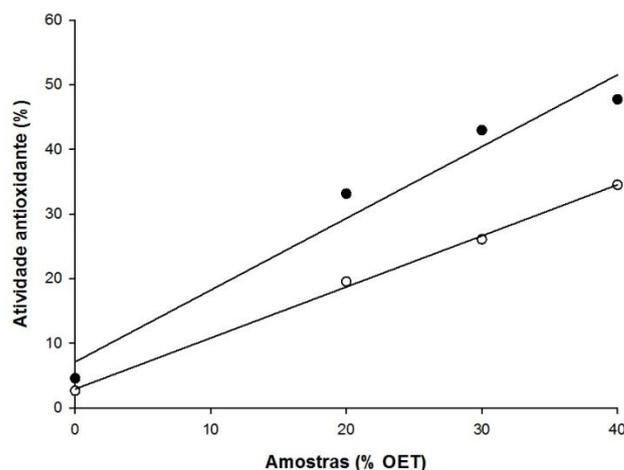


Figura 2 Atividade antioxidante (%) de nanobiopolímeros de IPS e NFC incorporados com diferentes concentrações de OET (0; 20; 30 e 40% p/p) de acordo com metodologias de sequestro de radicais livres DPPH (●) e sistema β -caroteno/ácido linoleico (○). Os pontos representam os dados observados e as linhas representam os dados ajustados.

$$\%AA = 2,9271 + 0,7892 * C \quad R^2 = 0,99$$

$$\%AA = 7,1214 + 1,1099 * C \quad R^2 = 0,95$$

O aumento da atividade antioxidante a partir da adição de OET está relacionado à presença dos compostos fenólicos que são responsáveis por essa atividade no óleo (JOUKI et al, 2014), sendo esses resultados confirmados pela quantificação dos compostos timol e carvacrol nos filmes (Figura 1), onde também houve aumento significativo ($p < 0,05$) da quantidade de ambos os compostos com o aumento da concentração de OET. Pires et al. (2011) encontraram atividade antioxidante correspondente a 38% da atividade do óleo livre para filmes de proteína de peixe adicionados da maior concentração de óleo essencial de tomilho do estudo (0,25ml/g de proteína). Jouki et al. (2014) analisaram a atividade antioxidante de filmes de mucilagem de semente de marmelo adicionados de OET por meio da metodologia de sequestro de radicais DPPH e também observaram aumento da atividade antioxidante dos filmes com o aumento da concentração de OET.

3.4 Avaliação da oxidação lipídica pelo índice TBARS

O efeito antioxidante do filme foi determinado pela avaliação da capacidade de inibir a oxidação dos lipídeos de amostras de carne moída durante o armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$, por 4 dias, pelo método TBARS. Pela análise de variância, verificou-se que houve interação significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações de OET e o tempo.

Com base nas equações, os gráficos foram construídos e apresentados na Figura 3. A amostra controle e aquela acondicionada pelo filme controle apresentaram os maiores valores de TBARS e comportamento quadrático, com ponto máximo de oxidação no segundo dia de armazenamento. A amostra OET20 apresentou redução do índice de TBARS no primeiro dia.

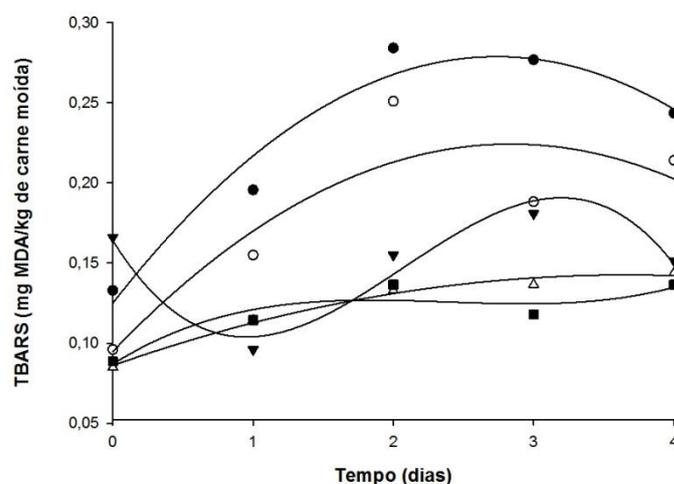


Figura 3 Oxidação lipídica da carne moída embalada em filmes de PVC e em nanobiopolímeros antioxidantes a 4°C por 4 dias: (●) controle; (○) filme controle (OET0); (▼) filme OET20; (△) filme OET30; (■) filme OET40. Os pontos representam os dados observados e as linhas representam os dados ajustados.

Esse comportamento pode estar relacionado à quantidade inicial de óleo presente na superfície dos filmes contribuindo para a redução do parâmetro. Após o segundo dia, observou-se o aumento do índice que pode estar relacionado à baixa difusão do óleo pelo polímero. Para os tratamentos OET30 e OET40 observou-se uma menor variação do índice de TBARS em função do tempo que pode estar relacionada justamente às maiores concentrações de óleo presentes na matriz polimérica. As carnes acondicionadas com os filmes contendo o OET apresentaram valores estatisticamente reduzidos de índice de TBARS no último dia de análise, comparados à amostra controle (sem filme) e ao filme controle (OET0). Esse resultado sugere que a oxidação lipídica das amostras de carne moída pode ser minimizada com a utilização dos filmes de IPS e NFC adicionados de OET, devido à ação antioxidante do óleo essencial (RAMOS et al., 2012). Outra possibilidade é a baixa barreira ao oxigênio apresentada para filmes de IPS, já que o filme controle também apresentou redução no valor (MILLER; KROCHTA, 1997).

Lorenzo et al. (2014) avaliaram o efeito de filmes de poliestireno ativos contendo 2% de óleo essencial de orégano sobre a prevenção da oxidação de bifés de carne bovina durante 15 dias de armazenamento e também encontraram redução dos valores de TBARS do filme ativo comparado ao controle durante as etapas de armazenamento. Siripatrawan & Noipha (2012) analisaram o efeito antioxidante de filmes de quitosana incorporados com extrato de chá verde durante 20 dias, observando valores reduzidos de TBARS tanto para o filme de quitosana quanto para o adicionado de agente antioxidante. Rimini et al. (2014) também observaram diminuição nos valores de TBARS para cortes de frango fresco e armazenados durante 12 e 90 dias quando adicionados diretamente de mistura de óleo essencial de tomilho e laranja e comparados ao controle, com valores variando de 0,501 para o tratamento controle e 0,240 nmol MDA/mg de proteína para a carne adicionada de óleo essencial no 12º dia de armazenamento.

Tem sido reportado que índices a partir de 1,5 mg MDA/kg de carne estão relacionados a mudanças perceptíveis e inaceitáveis nas características sensoriais da carne (LORENZO et al, 2014). Neste estudo, nenhum dos índices encontrados durante o armazenamento das carnes ultrapassou o valor de 0,30mg MDA/kg de carne mostrando que após o período de 4 dias de armazenamento à temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 1$, as carnes provavelmente não apresentaram mudanças sensoriais capazes de influenciar na aceitação do produto, demonstrando o potencial de utilização dos filmes na prevenção da oxidação.

As equações ajustadas para cada tratamento em função do tempo estão apresentadas na Tabela 3, com seus respectivos valores de coeficiente de regressão R^2 .

Tabela 3 Equações ajustadas em função do tempo para os valores de TBARS de carne moída acondicionada em diferentes filmes antioxidantes e amostra controle

Tratamento	Equação	R ²
Controle	$Y = 0.1249 + 0.1125t - 0,0206t^2$	0.95
OET0	$Y = 0.0948 + 0.0912t - 0,0161t^2$	0.88
OET20	$Y = 0,1640 - 0.1404t + 0,0957t^2 - 0,0154t^3$	0.93
OET30	$Y = 0.0860 + 0.0309t - 0,0042t^2$	0.99
OET40	$Y = 0.0869 + 0.0549t - 0,0242t^2 - 0,0034t^3$	0.93

*T: tempo em dias

De forma diferente ao encontrado neste estudo, Coskun et al (2014) avaliaram o efeito de embalagens ativas de isolado proteico de soja adicionadas de óleo essencial de tomilho e orégano, na concentração de 5%, sobre a oxidação de carne moída e não encontraram diferença significativa para nenhum dos tratamentos durante o período de 12 dias de armazenamento a 4°C.

3.5 Cor objetiva

O efeito dos nanobiopolímeros ativos sobre a cor das carnes durante o armazenamento por 4 dias a 4°C ± 1 °C foi avaliado por meio dos parâmetros de cor objetiva L^* , a^* , b^* , C^* e h^* . Pela análise de variância, verificou-se que houve interação significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações de OET e o tempo.

A luminosidade (L^*) da carne bovina geralmente apresenta redução com o tempo de armazenamento do produto (RAMOS; GOMIDE, 2007). No presente trabalho, observou-se que para os tratamentos controle e OET0 houve comportamento diferente do esperado, caracterizado pelo aumento de L^* no primeiro dia (Figura 4a), fato que pode estar relacionado aos inúmeros fatores que podem atuar sobre esse parâmetro como: teor de água, superfície

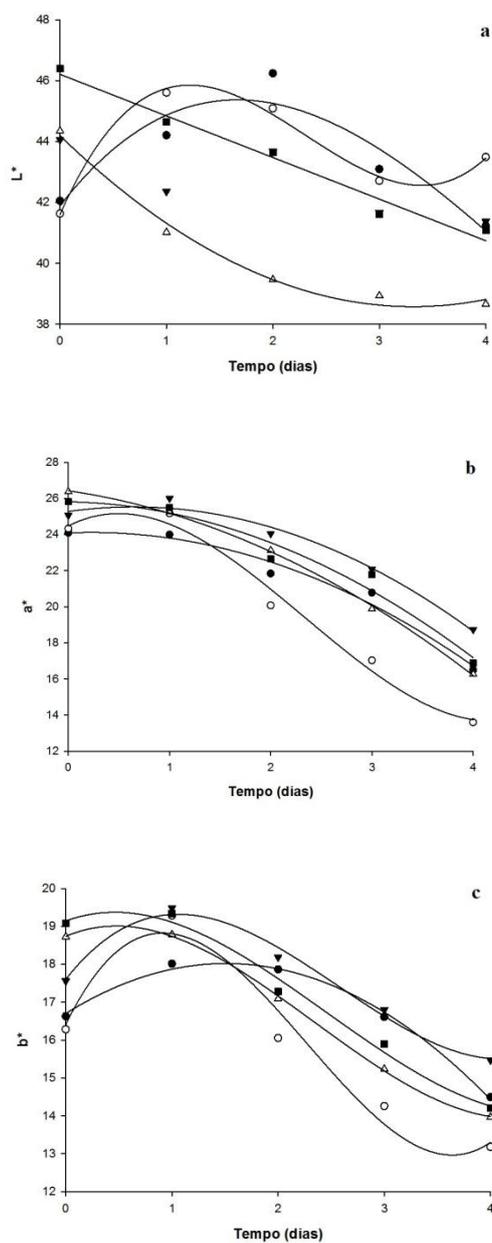


Figura 4 Variação de L^* (4a), a^* (4b) e b^* (4c) da carne moída acondicionada em nanobiopolímeros antioxidantes ao longo do tempo: (●) controle; (○) filme controle (OET0); (▼) filme OET20; (Δ) filme OET30; (■) filme OET40. Os pontos representam os dados observados e as linhas representam os dados ajustados.

de amostragem e variações da luz ambiente (SOUZA et al., 2004; RAMOS; GOMIDE, 2007). Já para os tratamentos OET20 e OET40 o comportamento foi o esperado, com diminuição de L^* durante o período de armazenamento, corroborando os resultados encontrados para índice de TBARS, onde foram encontrados ligeiro aumento da oxidação para esses tratamentos relacionado à diminuição da claridade das amostras. Os valores encontrados para L^* das carnes moídas foram semelhantes aos encontrados por outros autores. Lorenzo et al (2014) também encontraram redução de L^* para bifes de carne bovina acondicionados por embalagens ativas de poliestireno com óleo essencial de orégano, durante estocagem por 14 dias a temperatura de 2°C.

Para o índice a^* , que indica a cor vermelha/verde da superfície das amostras, todos os tratamentos apresentaram redução do valor durante o período de armazenamento (Figura 4b). Esse índice está intimamente relacionado à carne vermelha, sendo a aceitação desse produto diretamente relacionada à manutenção de seu valor (RAMOS; GOMIDE, 2007). Ainda, pode-se observar que o tratamento OET20 apresentou o valor mais elevado de a^* no último dia de armazenamento, indicando uma maior manutenção da cor vermelha para as carnes acondicionadas pelos filmes adicionados da menor concentração de OET testada. Gómez & Lorenzo (2012) também encontraram redução dos valores de a^* durante período de estocagem de carne fresca de potro sob armazenamento a 2°C. Tornuk et al. (2015) avaliaram o efeito do acondicionamento de bifes de carne bovina em filmes ativos de polietileno de baixa densidade adicionados de nanopartículas e dos agentes ativos timol, eugenol e carvacrol sobre as propriedades de cor da carne durante 7 dias a 4°C. Para os valores de a^* , obtiveram aumento do parâmetro no primeiro dia, fato que foi relacionado à possível reação do oxigênio residual presente na embalagem com a mioglobina da superfície das carnes, resultando na intensificação da cor vermelha. Esse resultado também pode ser observado para os tratamentos OET0 (filme controle) e OET40, onde houve aumento do valor de a^* para o primeiro dia de

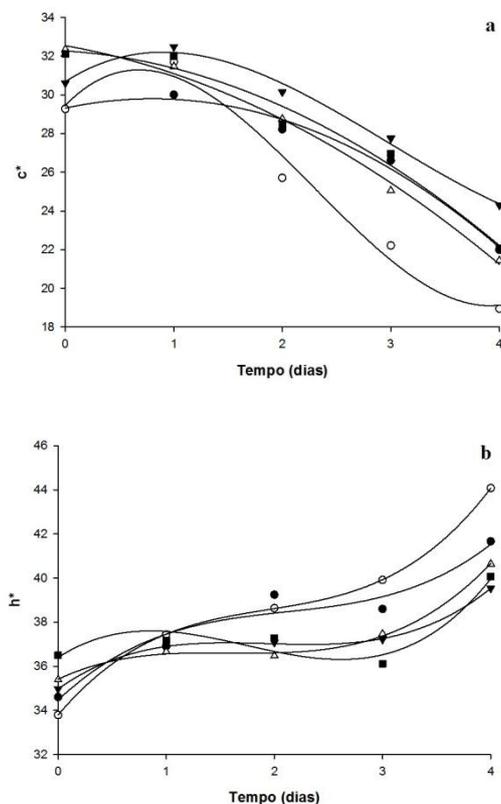


Figura 5 Variação de C^* (5a) e h^* (5b) da carne moída acondicionada em nanobiopolímeros antioxidantes ao longo do tempo: (●) controle; (○) filme controle (OET0); (▼) filme OET20; (Δ) filme OET30; (■) filme OET40. Os pontos representam os dados observados e as linhas representam os dados ajustados.

estocagem e posterior redução até o último dia. A partir do quarto dia, os autores também encontraram redução dos valores de a^* .

Observou-se, também, que as amostras de todos os tratamentos apresentaram diminuição do índice de cor amarela/azul (b^*) durante o período de armazenamento (Figura 4c). Resultado semelhante foi encontrado por Coskun et al (2014), que encontraram valores de b^* variando de 10,42 (primeiro dia de armazenamento) a 09,12 para o 12º dia em bolos de carne

bovina acondicionados em filmes de isolado proteico de soja contendo óleo essencial de tomilho.

O índice de saturação (C^*) está relacionado à intensidade de uma tonalidade. Cores com elevado valor de C^* são consideradas saturadas e aquelas com reduzido valor desse índice, consideradas pálidas (RAMOS; GOMIDE, 2007). O valor de C^* de todas as amostras de carne moída foi reduzido do primeiro para o último dia de armazenamento, indicando perda da intensidade da coloração inicial e aumento da palidez da carne. Porém, assim como observado para os resultados de a^* , o tratamento OET20 apresentou o maior valor de índice de saturação no último dia de armazenamento, indicando uma prevalência da intensidade da cor da carne moída para a amostra revestida pelos nanobiopolímeros adicionados da menor concentração de agente antioxidante testada.

O ângulo de tonalidade (h^*) indica a qualidade da cor (vermelho, verde, azul, etc.) (RAMOS; GOMIDE, 2007). O sólido de cor referente aos valores encontrados para h^* é dividido em quatro quadrantes e os valores compreendidos entre 330° e 25° referem-se à cor vermelha (RAMOS; GOMIDE, 2007). Sendo assim, os valores encontrados para todos os tratamentos em todos os períodos de tempo estimam a coloração predominantemente vermelha das amostras de carne moída analisadas.

As equações ajustadas em função do tempo para os parâmetros avaliados e seus respectivos coeficientes de regressão R^2 estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 Equações ajustadas em função do tempo para os valores de L^* , a^* , b^* , C^* e h^* de carne moída revestida pelos nanobiopolímeros de IPS e NFC com diferentes concentrações de OET e amostra controle

L^*		
Tratamento	Equação	R^2
Controle	$Y = 41,89 + 4,50t + 1,64t^2 + 0,11t^3$	0.88
OET0	$Y = 41,60 + 7,93t - 4,41t^2 + 0,64t^3$	0.99
OET20	$Y = 40,35 - 4,48t + 1,27t^2 - 0,13t^3$	0.99
OET30	Não ajustou	
OET40	$Y = 46,21 - 1,37t$	0.98
a^*		
Tratamento	Equação	R^2
Controle	$Y = 24,08 + 0,23t - 0,52t^2$	0.98
OET0	$Y = 24,47 + 2,88t - 3,24t^2 + 0,46t^3$	0.98
OET20	$Y = 25,27 + 0,79t - 0,61t^2$	0.98
OET30	$Y = 26,42 - 0,81t - 0,44t^2$	0.99
OET40	$Y = 25,80 - 0,10t - 0,51t^2$	0.97
b^*		
Tratamento	Equação	R^2
Controle	$Y = 16,70 + 1,75t - 0,58t^2$	0.99
OET0	$Y = 16,40 + 5,77t - 3,95t^2 + 0,57t^3$	0.95
OET20	$Y = 17,60 + 3,55t - 2,11t^2 - 0,27t^3$	0.98
OET30	$Y = 18,74 + 1,18t - 1,37t^2 + 0,19t^3$	0.99
OET40	$Y = 19,14 + 1,02t - 1,22t^2 + 0,16t^3$	0.99
C^*		
Tratamento	Equação	R^2
Controle	$Y = 29,31 + 1,20t - 0,75t^2$	0.99
OET0	$Y = 29,46 + 5,73t - 4,96t^2 + 0,72t^3$	0.98
OET20	$Y = 30,68 + 3,59t - 2,34t^2 + 0,27t^3$	0.97
OET30	$Y = 32,54 - 0,98t - 0,46t^2$	0.99
OET40	$Y = 32,26 + -0,35t - 0,54t^2$	0.98
h^*		
Tratamento	Equação	R^2
Controle	$Y = 34,46 + 4,62t - 1,94t^2 + 0,31t^3$	0.95
OET0	$Y = 37,79 + 5,82t - 2,60t^2 + 0,44t^3$	0.99
OET20	$Y = 34,97 + 3,47t - 1,86t^2 + 0,32t^3$	0.99
OET30	$Y = 35,41 + 2,30t - 1,45t^2 + 0,31t^3$	0.99
OET40	$Y = 36,40 + 3,17t - 2,46t^2 + 0,47t^3$	0.93

*T: tempo em dias

CONCLUSÃO

Verificou-se a existência da atividade antioxidante (%) no OET para ambas as metodologias de análise empregadas. Para os filmes ativos, houve aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração de timol e carvacrol e aumento linear da atividade antioxidante (%) de acordo com o aumento da concentração de OET. Os filmes adicionados de OET foram capazes de reduzir os valores de oxidação das amostras de carne moída medidas pelo índice TBARS. Para a análise de cor objetiva, a adição da menor concentração de OET (20% p/p) foi suficiente para a manutenção da cor vermelha das carnes (a^* e h^*), assim como do índice de saturação da cor (C^*). Sugere-se que a aplicação de nanobiopolímeros de IPS e NFC contendo 20% (p/p) de OET já seja suficiente para reduzir a oxidação e manter a cor vermelha da carne moída.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. **Brasil avança na reabertura do mercado mundial de carne bovina e projeta aumento das exportações para 2016**. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/noticia.asp?id=1403#.Vm6Z10orLIV>>. Acesso em: 14 dez. 2015.

ARFAT, Y. A. et al. Shelf-life extension of refrigerated sea bass slices wrapped with fish protein isolate/fish skin gelatin-ZnO nanocomposite film incorporated with basil leaf essential oil. **Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 52, n. 10, p. 6182-6193, Oct. 2015.

AZEREDO, H. M. C. et al. Propriedades mecânicas e de barreira de filmes nanocompósitos de quitosana e celulose microcristalina. In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais - 18º CBECiMat, 24-28 nov. **Anais...**Porto de Galinhas – PE, 2008.

AZEVEDO, V. M. et al. Whey protein isolate biodegradable films: influence of the citric acid and montmorillonite clay nanoparticles on the physical properties. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 43, p. 252-258, Jan. 2015.

BARBOSA-PEREIRA, L. et al. Development of new active packaging films containing bioactive nanocomposites. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 26, p. 310-318, Dec. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Bovinos e bubalinos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 14 dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 83, de 21 de novembro de 2003. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de carne moída de bovino. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 24 nov. 2003. Seção 1, p. 29. Disponível em: <[http://www.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/4207980b27b39cf903257a0d0045429a/\\$FILE/IN%20N%C2%BA%2083-2003.pdf](http://www.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/4207980b27b39cf903257a0d0045429a/$FILE/IN%20N%C2%BA%2083-2003.pdf)>. Acesso em: 10 set. 2015.

CAMO, J.; BELTRÁN, J. A.; RONCALÉS, P. Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. **Meat Science**, Barking, v. 80, n. 4, p. 1086-1091, Dec. 2008.

CARDOSO, G. P. et al. Selection of a chitosan gelatin-based edible coating for color preservation of beef in retail display. **Meat Science**, Barking, v. 114, p. 85-94, Apr. 2016.

CHI, S.; ZIVANOVIC, S. C. S.; PENFIELD, M. P. Application of chitosan films enriched with oregano essential oil on bologna: active compounds and sensory attributes. **Food Science and Technology**, London, v. 12, n. 2, p. 111-117, Apr. 2006.

COSKUN, B. K. et al. Antioxidant active packaging with soy edible films and oregano or thyme essential oils for oxidative stability of ground beef patties. **Journal of Food Quality**, Westport, v. 37, n. 3, p. 203-212, June 2014.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.

DIMA, C.; et al. Microencapsulation of essential oil of pimento [*Pimenta dioica* (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex coacervation method. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 22, p. 203-211, Apr. 2014.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH[•]. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, Abr.-Jun. 2004.

GÓMEZ, M.; LORENZO, J. M. Effect of packaging conditions on shelf-life of foal fresh meat. **Meat Science**, Barking, v. 91, n. 4, p. 513-520, Aug. 2012.

GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 35, n. 1, p. 42-51, Jan. 2014.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 464-472, Abr./Jun. 2011.

HUDAIB, M.; et al. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus Vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, n. 4, p. 691-700, July 2002.

HYGREEVA, D.; PANDEY, M. C.; RADHAKRISHNA, K. Potential applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and

antimicrobials in fresh and processed meat products. **Meat Science**, Barking, v. 98, n. 1, p. 47-57, Sept. 2014.

JANJARASSKUL, T.; TANANUWONG, K.; KROCHTA, J. M. Whey protein film with oxygen scavenging function by incorporation of ascorbic acid. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 76, n. 9, p. E561-E568, Nov.-Dec. 2011.

JOUKI, M. et al. Characterization of antioxidant-antibacterial queen seed mucilage films containing thyme essential oil. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 99, p. 537-546, Jan. 2014.

KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, London, v. 85, n. 4, p. 633-640, May 2004.

LOPES-LUTZ, D. et al. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oil. **Phytochemistry**, v. 69 n. 8, p. 1732-1738, May 2008.

LORENZO, J. M.; BATLLE, R.; GÓMEZ, M. Extension of the shelf-life of foal meat with two antioxidant active packaging systems. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 59, n. 1, p. 181-188, Nov. 2014.

MELO, A. A. M. **Efeito de filme ativo incorporado com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na conservação de carne de frango resfriada**. 2010. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

MILLER, K. S.; KROCHTA, J. M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: a review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 8, n. 7, p. 228-237, July 1997.

MIRANDA, C. A. S. F. **Atividade antioxidante de óleos essenciais de folhas de diversas plantas**. 2010. 152p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2010.

NASCIMENTO, M. V. D. et al. Avaliação da qualidade microbiológica da carne moída fresca comercializada no mercado central em Campina Grande – PB. **Revista Saúde e Ciência**, Campina Grande, v. 3, n. 1, p. 56-68, jan./abr. 2014.

NISA, I. U. et al. Development of potato starch based active packaging films loaded with antioxidants and its effect on shelf life of beef. **Food of Science and Technology**, Chicago, v. 52, p. n. 11, p. 7245-7253, Nov. 2015.

- ORTUÑO, J.; SERRANO, R.; BAÑÓN, S. Antioxidant and antimicrobial effects of dietary supplementation with rosemary diterpenes (carnosic acid and carnosol) vs vitamin E on lamb meat packed under protective atmosphere. **Meat Science**, Barking, v. 110, p. 62-69, Dec. 2015.
- PHOOPURITHAM, P. et al. Antioxidant properties of selected plant extracts and application in packaging as antioxidant cellulose-based films for vegetable oil. **Packaging Technology and Science**, London, v. 25, n. 3, p. 125-136, Apr./May 2011.
- PIRES, C. et al. Characterization of biodegradable films prepared with hake proteins and thyme oil. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 105, n. 3, p. 422-428, Aug. 2011.
- PIRES, C. et al. Hake protein edible films incorporated with essential oils: physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 224-231, Jan. 2013.
- RAHARJO, S.; SOFOS, J. N.; SCHMIDT, G. R. Improved speed, specificity and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C18 method for measuring lipid peroxidation in beef. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 40, n. 12, p. 2182-2185, Nov. 1992.
- RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias**. Viçosa, MG: UFV, 2007. 599 p.
- RAMOS, O. L. et al. Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. **Food Research International**, Barking, v. 45, n. 1, p. 351-361, Jan. 2012.
- RIMINI, S.; PETRACCI, M.; SMITH, D. P. The use of thyme and orange essential oils blend to improve quality traits of marinated chicken meat. **Poultry Science**, Oxford, v. 93, n. 8, p. 1-7, Aug. 2014.
- SANTOS, T. M. et al. Fish gelatin films as affected by cellulose whiskers and sonication. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 41, p. 113-118, Dec. 2014.
- SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B. R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 770-775, Nov.-Dec. 2010.
- SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, Mar./Abr. 2007.
- SUN, X. D.; HOLLEY, R. A. Antimicrobial and antioxidative strategies to reduce pathogens and extended the shelf life of fresh red meats.

Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, Chicago, v. 11, n. 4, p. 340-354, July 2012.

TORNUK, F. et al. LLEDPE based food packaging incorporated with nanoclays grafted with bioactive compounds to extend shelf life of some meat products. **LWT- Food Science and Technology**, Zürich, v. 64, n. 2, p. 540-546, Dec. 2015.

UGALDE, M. L. **Biopolímeros ativos com incorporação de óleos essenciais**. 2014. 168p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada – URI, Erechim, Rio Grande do Sul, 2014.

VONASEK, E.; LE, P.; NITIN, N. Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 37, p. 7-13, June 2014.

WANG, W. et al. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. **Food Chemistry**, London, v. 108, n. 3, p. 1019-1022, June 2008.

ZINOVIADOU, K. G.; KOUTSOUMANIS, K. P.; BILIADERIS, C. G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. **Meat Science, Barking**, n. 82, n. 3, p. 338-345, July 2009.