



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS

DESENVOLVIMENTO DE EMBALAGEM ATIVA UTILIZANDO MATÉRIAS-  
PRIMAS RENOVÁVEIS

VIVIANE PATRÍCIA ROMANI  
Engenheira de Alimentos

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. VILÁSIA GUIMARÃES MARTINS  
Orientadora

Prof. Dr. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ  
Co-orientador

RIO GRANDE, RS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS

DESENVOLVIMENTO DE EMBALAGEM ATIVA UTILIZANDO MATÉRIAS-  
PRIMAS RENOVÁVEIS

VIVIANE PATRÍCIA ROMANI

Engenheira de Alimentos

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre  
em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. VILÁSIA GUIMARÃES MARTINS

Orientadora

Prof. Dr. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ

Co-orientador

RIO GRANDE, RS

2015

*Dedico este trabalho aos meus pais Elcio e Marinez e à minha irmã Cintia Eliza, que mesmo longe sempre estiveram presentes nesta caminhada, me apoiando em todas as decisões e me mostrando o sentido da palavra **família**.*

**MUITO OBRIGADA POR TUDO!**

## AGRADECIMENTOS

Sou grata a muitas pessoas que passaram pelo meu caminho desde a escola até hoje e aqui deixo um forte abraço a todos que se fizeram presentes nessa caminhada. No entanto, não posso deixar de agradecer a Deus por estar constantemente me acompanhando e pela presença de algumas pessoas especiais:

Meus pais **Elcio** e **Marinez** e minha irmã **Cintia** por todo o amor, carinho, incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida, vocês são o motivo pelo qual enfrento todos os desafios. Amo vocês!

Meu namorado **Marcos Vinícius** pelo amor, amizade, companheirismo e por estar sempre disposto a me ajudar e a encarar os obstáculos incentivando a conquista de novos sonhos.

Minha orientadora **Profa. Dra. Vilásia Martins** pelas oportunidades oferecidas, pela orientação, paciência, acolhimento e, principalmente por me ajudar a crescer profissionalmente. Muito obrigada!

Meu co-orientador **Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández** pela orientação e ajuda em todos os momentos.

Minha amiga-irmã-colega **Dianini Kringel** pela amizade sincera, por compartilhar momentos de alegria e por estar ao meu lado em momentos difíceis, sou muito grata por conviver contigo, sem você essa caminhada com certeza teria sido mais difícil.

**Profa. Dra. Eliana Badiale-Furlong**, que sempre esteve disposta a compartilhar de seu conhecimento, muito obrigada pelos ensinamentos, por todas as conversas, conselhos, e pela oportunidade de realizar o Estágio de Docência no Laboratório de Micotoxinas, sem dúvidas a senhora fez muita diferença no meu trabalho e na minha vida.

**Profa. Dra. Lucielen dos Santos** agradeço pela atenção sempre que tive dificuldades com os planejamentos experimentais.

Meus amigos e colegas do **Laboratório de Tecnologia de Alimentos** que sempre estiveram dispostos a ajudar, agradeço pelo apoio em momentos de dificuldades e pelos momentos de descontração e alegria no dia a dia e nas festinhas e churrascos.

A técnica do laboratório **Sabrina Aquino**, que contribuiu muito para que fosse possível a realização deste trabalho. Muito obrigada pela paciência, disposição e por me ajudar a encontrar as coisas dentro do laboratório.

A Pós-Doutoranda **Michele Moraes de Souza** pela ajuda nas análises de atividade antioxidante e pelos conselhos e amizade.

Também foram indispensáveis para realização deste trabalho:

A Arrozeira Pelotas que forneceu a quirera de arroz e o Instituto de Ciências Biológicas da FURG que forneceu a pimenta rosa.

Os funcionários da Secretaria da Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Os professores do programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, responsáveis pelos ensinamentos durante o Mestrado.

O CEME-SUL, onde foram realizadas as análises de Difração de Raios X e Microscopia Eletrônica de Varredura.

Os demais laboratórios da Universidade Federal do Rio Grande, que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES, que apoiou financeiramente.

## RESUMO

A indústria de alimentos é uma das responsáveis pelo amplo consumo de embalagens plásticas. As preocupações ambientais provocadas pelo uso de polímeros a base de petróleo tem incentivado a utilização de matérias-primas renováveis e que facilmente se degradam no ambiente. Os polissacarídeos, lipídios e proteínas são capazes de originar matrizes contínuas e coesas, no entanto possuem algumas limitações em relação a aplicação em alimentos, como propriedades mecânicas e barreira. Visando uma melhoria nestas propriedades são elaboradas as blendas utilizando diferentes biopolímeros, pois combinam as vantagens dos materiais utilizados. Outra tendência na indústria de alimentos é a utilização das embalagens ativas, as quais interagem com o alimento visando o aumento da sua vida útil. Entre os aditivos utilizados nesta tecnologia estão os óleos essenciais e compostos fenólicos de plantas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver filmes ativos a partir de blendas de amido de quirera de arroz e proteínas de corvina (*Micropogonias furnieri*) adicionadas de óleo essencial de orégano e extrato fenólico de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi). O amido de arroz foi extraído por método alcalino e as proteínas de pescado foram obtidas pelo processo de *pH shifting*. Os compostos fenólicos da pimenta rosa foram extraídos com metanol e quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu. No OEO e no EFP foi determinada a capacidade antioxidante pelos métodos de DPPH e em um sistema enzimático. As blendas foram obtidas através da técnica de *casting* e utilizou-se 25 % de glicerol como plastificante. Foram realizados dois planejamentos experimentais 2<sup>2</sup> sendo um empregando OEO e o outro EFP em diferentes concentrações, e ambos variando as proporções de amido/proteína. Os filmes foram caracterizados quanto a espessura, solubilidade, propriedades mecânicas, óticas e de barreira. De acordo com as propriedades obtidas na caracterização, um ensaio de cada planejamento experimental foi avaliado quanto a sua morfologia, propriedades térmicas, químicas e capacidade antioxidante. No planejamento utilizando OEO, o ensaio elaborado com a proporção de 50/50 de amido/proteína e 8,82 % de OEO (Ensaio 8), apresentou os melhores resultados, pois apresentou a menor solubilidade (8,0 %) e permeabilidade ao vapor d'água (0,18 g.mm/m<sup>2</sup>.h.kPa), resistência à tração de 5,96 MPa e alongação de 85,5 %. O Ensaio 5 do planejamento utilizando EFP, elaborado com a proporção de 14,75/85,25 de amido/proteína e 6% de EFP, apresentou uma das menores solubilidades (19,5 %) e permeabilidades (0,19 g.mm/m<sup>2</sup>.h.kPa) e a maior alongação (173,3 %) mantendo uma boa resistência à tração (6,50 MPa). Maiores concentrações de amido foram responsáveis por maior resistência, enquanto que as proteínas conferiram maior flexibilidade e originaram filmes mais amarelados. Os compostos ativos adicionados apresentaram o efeito de diminuir a permeabilidade ao vapor d'água e aumentar a alongação. A opacidade não foi influenciada pelas variáveis estudadas. A solubilidade diminuiu com maiores concentrações de OEO e teve o efeito contrário quando adicionado o EFP. Através da avaliação da morfologia verificou-se que os componentes utilizados foram compatíveis. Na determinação da capacidade antioxidante, a blenda adicionada de EFP apresentou maior potencial de inibir o escurecimento enzimático, sendo obtido 76,7 % de inibição. Os resultados indicaram que as blendas se mostraram promissoras para serem aplicadas como embalagens ativas em alimentos.

**Palavras-chave:** amido de arroz, antioxidante, embalagens ativas, óleo essencial de orégano, pimenta rosa, proteínas de pescado.

## ABSTRACT

### ACTIVE PACKAGING DEVELOPMENT USING RENEWABLE RAW MATERIALS

The food industry is one of the responsible for the large consumption of plastic packaging. The environmental concerns caused by the use of petroleum based polymers have encouraged the use of renewable raw materials, which are easily degraded in the environment. Polysaccharides, lipids and proteins are able to form continuous and cohesive matrices, however those have some limitations for application in foods, such as mechanical and barrier properties. Aiming to improve these properties, blends using different biopolymers are prepared, it combine the advantages of each material used. Another trend in the food industry is the use of active packaging, which interact with food in order to increase its useful life. Among the additives used in this technology are the essential oils and phenolic compounds of plants. The aim of this work was to develop active films from blends of broken rice starch and Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) proteins added of oregano essential oil (OEO) and pink pepper phenolic extract (EFP). Starch was extracted by alkaline method and proteins were obtained by pH shifting process. The pink pepper phenolic compounds were extracted with methanol and quantified by the Folin-Ciocalteu method. In the OEO and EFP was determined the antioxidant capacity by the methods of DPPH and in an enzymatic system. The blends were obtained by casting technique and 25 % of glycerol was used as plasticizer. Two 2<sup>2</sup> experimental designs were performed, one using OEO and the other using EFP in different concentrations and varying the proportions of starch/protein. The films were characterized by the thickness, solubility, mechanical, optical and barrier properties. According to the properties obtained in the characterization, one test of each experimental design was evaluated for its morphology, thermal and chemical properties and antioxidant capacity. In experimental design using OEO, the test prepared with the ratio 50/50 of starch/protein and 8.82 % of OEO (test 8), showed better results, it had the lowest solubility (8.0 %) and permeability to water vapor (0.18 g.mm/m<sup>2</sup>.h.kPa), tensile strength of 5.96 MPa and elongation of 85.5 %. The test 5 in experimental design using EFP, prepared with the ratio 14.75/85.25 of starch/protein and 6 % of EFP, presented one of the lowest solubilities (19.5 %) and permeabilities (0.19 g.mm/m<sup>2</sup>.h.kPa) and the greatest elongation (173.3 %) while maintaining good tensile strength (6.50 MPa). Higher starch concentrations were responsible for increasing the strength, whereas proteins gave rise to greater flexibility and more yellowish films. The active compounds added had the effect of decreasing the water vapor permeability and increase the elongation. The opacity was not influenced by the variables studied. The solubility decreased with higher concentrations of OEO and had the opposite effect when EFP was used. Through the evaluation of morphology was found that the constituents were compatible. In the determination of the antioxidant capacity, the blend added of EFP showed greater potential to inhibit the enzymatic browning being obtained 76.7 % of inhibition. The results indicated that the produced blends were promising to be applied as active food packaging.

**Keywords:** rice starch, antioxidant, active packaging, oregano essential oil, pink pepper, fish proteins.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Filmes de macromoléculas naturais adicionados de compostos bioativos .....	26
<b>Tabela 2</b> – Valores utilizados no planejamento experimental 2 <sup>2</sup> para produção das blendas .	36
<b>Tabela 3</b> – Composição proximal das matérias-primas utilizadas .....	41
<b>Tabela 4</b> – Atividade antioxidante do óleo essencial de orégano e do extrato fenólico de pimenta rosa pelos diferentes métodos utilizados .....	44
<b>Tabela 5</b> – Propriedades dos filmes obtidos nos testes preliminares utilizando diferentes matérias-primas proteicas .....	45
<b>Tabela 6</b> – Propriedades dos filmes obtidos nos testes preliminares utilizando diferentes concentrações totais de sólidos.....	47
<b>Tabela 7</b> – Planejamento experimental e resultados obtidos na caracterização das blendas adicionadas de óleo essencial de orégano.....	50
<b>Tabela 8</b> – Planejamento experimental e resultados obtidos na caracterização das blendas adicionadas de extrato fenólico de pimenta rosa .....	61
<b>Tabela 9</b> – Parâmetros de calibração do método cromatográfico utilizado para determinação dos ácidos fenólicos.....	92
<b>Tabela 10</b> – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta espessura.....	93
<b>Tabela 11</b> – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta opacidade.....	93
<b>Tabela 12</b> – Coeficiente de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta resistência à tração.....	93
<b>Tabela 13</b> – Análise de variância (ANOVA) para a resposta resistência à tração .....	94
<b>Tabela 14</b> – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta alongação .....	94
<b>Tabela 15</b> – Análise de variância (ANOVA) para a resposta alongação.....	94
<b>Tabela 16</b> – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta solubilidade.....	95
<b>Tabela 17</b> – Análise de variância (ANOVA) para a resposta solubilidade .....	95
<b>Tabela 18</b> – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta permeabilidade.....	95
<b>Tabela 19</b> – Análise de variância (ANOVA) para a resposta permeabilidade .....	96



<b>Tabela 20</b> – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta diferença total de cor.....	96
<b>Tabela 21</b> – Análise de variância (ANOVA) para a resposta diferença total de cor .....	96
<b>Tabela 22</b> – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta espessura .....	97
<b>Tabela 23</b> – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta resistência à tração .....	97
<b>Tabela 24</b> – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta opacidade .....	97
<b>Tabela 25</b> – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta permeabilidade .....	98
<b>Tabela 26</b> – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta alongação .....	98
<b>Tabela 27</b> – Análise de variância (ANOVA) para a resposta alongação .....	98
<b>Tabela 28</b> – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta solubilidade .....	99
<b>Tabela 29</b> – Análise de variância (ANOVA) para a resposta solubilidade .....	99
<b>Tabela 30</b> – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta diferença total de cor.....	99
<b>Tabela 31</b> – Análise de variância (ANOVA) para a resposta diferença total de cor .....	100

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representação esquemática do grânulo de amido.....	19
<b>Figura 2</b> – Diagrama esquemático das estruturas da amilose e amilopectina .....	20
<b>Figura 3</b> – Métodos de incorporação de substâncias ativas nos alimentos.....	24
<b>Figura 4</b> – Funções básicas das embalagens e interfaces de atuação das embalagens ativas e inteligentes.....	25
<b>Figura 5</b> – <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (frutos maduros de pimenta rosa).....	29
<b>Figura 6</b> – Cromatograma dos compostos fenólicos da pimenta rosa .....	42
<b>Figura 7</b> – Filmes elaborados utilizando (a) proteínas do músculo com amido (FAM) e (b) proteínas da carne mecanicamente separada com o amido (FAR) .....	46
<b>Figura 8</b> – Blenda de amido e proteína na proporção 50/50 adicionada de 3,18 % de óleo essencial de orégano (Ensaio 7).....	48
<b>Figura 9</b> – Superfície de resposta da solubilidade dos filmes em função da concentração de óleo essencial de orégano e da proporção amido/proteína .....	49
<b>Figura 10</b> – Superfície de resposta da permeabilidade ao vapor d'água dos filmes em função da concentração de óleo essencial de orégano e da proporção amido/proteína.....	52
<b>Figura 11</b> – Filmes elaborados com: (a) 14,75/85,25 de amido/proteína e 6 % de óleo essencial de orégano (Ensaio 5) e (b) 85,25 /14,75 de amido/proteína e 6 % de óleo essencial de orégano (Ensaio 6).....	54
<b>Figura 12</b> – Morfologia da superfície da blenda composta por 50/50 de amido/proteína e 8,82 % de óleo essencial de orégano .....	56
<b>Figura 13</b> – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier para a blenda constituída de 50/50 de amido/proteína e 8,82 % de óleo essencial de orégano.....	57
<b>Figura 14</b> – Difratoograma de raios X da blenda constituída de 50/50 de amido/proteína e 8,82 % de óleo essencial de orégano .....	59
<b>Figura 15</b> – Termograma da blenda constituída de 50/50 de amido/proteína e 8,82 % de óleo essencial de orégano .....	59
<b>Figura 16</b> – Superfície de resposta da elongação dos filmes em função da concentração de extrato fenólico de pimenta rosa e da proporção amido/proteína.....	62
<b>Figura 17</b> – Superfície de resposta da diferença total de cor dos filmes em função da concentração de extrato fenólico de pimenta rosa e da proporção amido/proteína.....	64

<b>Figura 18</b> – Filmes elaborados com: (a) 25/75 de amido/proteína e 8 % de extrato fenólico de pimenta rosa (Ensaio 4) e (b) 14,75/85,25 de amido/proteína e 6 % extrato fenólico de pimenta rosa (Ensaio 5).....	65
<b>Figura 19</b> – Inibição da oxidação catalisada enzimaticamente; (a) controle (b) blenda adicionada de 8,82 % de óleo essencial de orégano; (c) blenda adicionada de 6 % de extrato fenólico de pimenta rosa .....	66
<b>Figura 20</b> – Morfologia da blenda composta por 14,75/85,25 de amido/proteína e 6 % de extrato fenólico de pimenta rosa .....	67
<b>Figura 21</b> – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier para a blenda constituída de 14,75/85,25 de amido/proteína e 6 % de extrato fenólico de pimenta rosa.....	68
<b>Figura 22</b> – Difratoograma de raios X da blenda constituída de 14,75/85,25 de amido/proteína e 6 % de extrato fenólico de pimenta rosa .....	69
<b>Figura 23</b> – Termograma da blenda constituída de 14,75/85,25 de amido/proteína e 6 % de extrato fenólico de pimenta rosa .....	69

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo Geral .....	16
2.2. Objetivos Específicos .....	16
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1 Embalagens de alimentos .....	17
3.2 Embalagens biodegradáveis .....	17
3.2.1 Amido .....	18
3.2.2 Proteínas de pescado.....	21
3.2.3 Blendas poliméricas.....	22
3.3 Embalagens ativas .....	23
3.3.1 Óleos essenciais.....	27
3.3.2 Pimenta rosa .....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	31
4.1 Material.....	31
4.2 Métodos .....	31
4.2.1 Caracterização das matérias-primas .....	31
4.2.2 Extração do amido .....	31
4.2.2.1 Determinação do teor de amilose do amido .....	32
4.2.3 Obtenção das proteínas de pescado .....	32
4.2.4 Extração dos compostos fenólicos de pimenta rosa .....	33
4.2.4.1 Perfil de compostos fenólicos do extrato de pimenta rosa .....	34
4.2.4.2 Determinação da capacidade antioxidante do extrato fenólico de pimenta rosa e do óleo essencial de orégano .....	34
4.2.5 Preparo das blendas poliméricas.....	35
4.2.6 Caracterização das blendas .....	37
4.2.6.1 Espessura .....	37
4.2.6.2 Solubilidade em água.....	37
4.2.6.3 Permeabilidade ao vapor d'água.....	37
4.2.6.4 Propriedades óticas .....	38
4.2.6.5 Propriedades mecânicas.....	38
4.2.6.6 Determinação da capacidade antioxidante das blendas.....	39

4.2.6.7 Morfologia .....	39
4.2.6.8 Grupos funcionais por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....	40
4.2.6.9 Cristalinidade por difração de raios X (DRX) .....	40
4.2.6.10 Análise termogravimétrica (TGA) .....	40
4.3 Tratamento dos dados .....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Composição química das matérias-primas utilizadas .....	41
5.2 Caracterização da pimenta rosa.....	42
5.2.1 Atividade antioxidante do óleo essencial de orégano (OEO) e extrato fenólico de pimenta rosa (EFP).....	43
5.3 Testes preliminares .....	45
5.4 Caracterização das blendas .....	48
5.4.1 Planejamento experimental utilizando óleo essencial de orégano (OEO) .....	48
5.4.1.2 Potencial antioxidante da blenda com OEO .....	55
5.4.1.3 Propriedades estruturais da blenda com OEO.....	55
5.4.2 Planejamento experimental utilizando extrato fenólico de pimenta rosa (EFP).....	60
5.4.2.1 Potencial antioxidante da blenda com EFP .....	65
5.4.2.2 Propriedades estruturais da blenda com EFP .....	67
5.5 Blendas elaboradas utilizando OEO x Blendas elaboradas utilizando EFP.....	70
6. CONCLUSÃO.....	72
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74
APÊNDICES.....	91
Apêndice 1 .....	92
Apêndice 2 .....	93
Apêndice 3 .....	97

## 1. INTRODUÇÃO

As embalagens são responsáveis pela proteção dos alimentos desde o final de sua produção até o momento do consumo. Os materiais plásticos convencionais satisfazem as necessidades de custo, praticidade, proteção física, química e ótica, porém levam mais de cem anos para se degradarem no ambiente. Estes influenciam diretamente na poluição ambiental uma vez que são responsáveis por grande parte dos resíduos acumulados na natureza. Em vista disto, são crescentes as preocupações com relação ao uso destes polímeros, e o desenvolvimento de embalagens a partir de matérias-primas renováveis tem recebido maior atenção nos últimos anos (RHIM; PARK; HA, 2013).

Os principais materiais utilizados no desenvolvimento de polímeros biodegradáveis são polissacarídeos, proteínas e lipídios. A utilização de amido como matéria-prima é promissora devido ao seu baixo custo, abundância e biodegradabilidade. Entretanto, eles têm aplicação limitada principalmente devido às propriedades mecânicas e de barreira, que são fortemente influenciadas pela umidade do ambiente (ALVES et al., 2007; FERREIRA et al., 2014).

Visando a obtenção de polímeros com melhores propriedades, podem ser elaboradas blendas de diferentes materiais. O desenvolvimento de blendas a partir de fontes agrícolas possui a vantagem de combinar as características de cada componente utilizado, além de agregar valor às matérias-primas de baixo custo (DIAS et al., 2010). Os polímeros a partir de proteínas tem sido um dos mais promissores objetos de pesquisa, uma vez que as propriedades mecânicas obtidas são melhores quando comparadas aos filmes de polissacarídeos e lipídeos (ROCHA et al., 2013). Desta forma, é interessante o desenvolvimento de blendas biodegradáveis através da combinação de amido com proteínas.

As embalagens tradicionais protegem o alimento do ambiente externo e fornecem informações acerca do produto. Uma tendência no desenvolvimento de embalagens de alimentos são as embalagens ativas. Estas são responsáveis por alterar o ambiente interno da embalagem visando aumento na vida útil ou a melhoria das características do produto, sendo uma inovação no processamento e distribuição de alimentos (OTONI et al., 2014). Entre os compostos empregados na elaboração de embalagens ativas estão os fenóis. Estes compostos são responsáveis por prolongar a vida útil do alimento devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Os compostos fenólicos podem ser obtidos a partir de diferentes fontes, tais como, resíduos agroindustriais e bioprodutos. Estes compostos também

estão amplamente distribuídos em óleos essenciais de plantas (AGUIRRE; BORNEO; LEÓN, 2013).

Diferentes óleos essenciais e extratos naturais têm sido aplicados no desenvolvimento de embalagens ativas. No entanto, os compostos fenólicos da pimenta rosa e o óleo essencial de orégano não foram utilizados como agentes antioxidantes em blendas de amido de arroz e proteínas de pescado. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi elaborar filmes ativos a partir de blendas de amido e proteínas, sendo estes adicionados de óleo essencial de orégano e extrato fenólico de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Desenvolver filmes ativos a partir de blendas de amido de quirera de arroz e proteínas de corvina (*Micropogonias furnieri*) adicionados de óleo essencial de orégano e extrato fenólico de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi).

### 2.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver as blendas com diferentes proporções de amido e proteínas adicionadas de compostos ativos em diferentes concentrações;
- Caracterizar as propriedades mecânicas, óticas e de barreira dos filmes obtidos;
- Avaliar a capacidade antioxidante e as características morfológicas, químicas e térmicas dos filmes com as melhores propriedades.



### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Embalagens de alimentos

As embalagens em geral possuem diferentes funções, sendo as principais de contenção, proteção, conveniência e comunicação (ROBERTSON, 2013). As embalagens exercem papel importante na manutenção da qualidade dos alimentos, sendo responsáveis principalmente pelo suporte mecânico e proteção contra influências externas, como microorganismos, mau odor, luz, entre outros. Desta forma garantem a conveniência durante o manuseio do alimento e preservam sua integridade por um longo período de tempo. Um dos requisitos básicos das embalagens tradicionais que permanecem em contato com os alimentos é ser inerte, havendo o mínimo de interação entre o produto e a embalagem (DAINELLI et al., 2008).

A tecnologia de embalagens de alimentos está constantemente em evolução, em resposta aos desafios da sociedade moderna. Os principais desafios atuais e futuros no setor de embalagens são a legislação, os mercados globais, maior durabilidade, conforto, alimentos mais seguros e saudáveis, preocupações ambientais e desperdício de alimentos (REALINI; MARCOS, 2014).

#### 3.2 Embalagens biodegradáveis

Os materiais plásticos derivados do petróleo vêm sendo amplamente utilizados como embalagens desde meados do século 20. Estes são de baixo custo, de fácil manuseio, com boas propriedades de processamento e excelentes propriedades físico-químicas. Mais de 40 % dos polímeros sintéticos são utilizados como embalagens, sendo metade destes utilizados na área de alimentos na forma de filmes, garrafas, copos, bandejas, entre outros. Apesar das vantagens que as embalagens de plásticos tradicionais apresentam, a utilização destes materiais vem causando sérios problemas ambientais uma vez que não são facilmente degradados no ambiente (RHIM; PARK; HA, 2013).

Além dos problemas relacionados ao acúmulo no ambiente, o preço do petróleo vem aumentando acentuadamente (VROMAN; TIGHZERT, 2009). Diante disso, os polímeros biodegradáveis, os quais foram introduzidos pela primeira vez em 1980, compõem parte importante do cenário de pesquisa nacional e internacional, com trabalhos quanto à

formulação, caracterização e aplicação destes materiais (FARIA; VERCELHEZE; MALI, 2012).

Os plásticos biodegradáveis são materiais poliméricos em que pelo menos uma das etapas do processo de degradação é através do metabolismo de micro-organismos. A biodegradação leva a fragmentação ou degradação dos polímeros sem qualquer resíduo tóxico ou prejudicial para o ambiente sob condições adequadas de umidade, temperatura e disponibilidade de oxigênio (SORRENTINO; GORRASI; VITTORIA, 2007).

Os polímeros biodegradáveis naturais podem ser obtidos a partir de recursos agroindustriais. Os polissacarídeos, como amido e celulose, e as proteínas constituem as principais fontes renováveis de biopolímeros. Os lipídios também podem ser utilizados na melhoria das propriedades mecânicas e de barreira dos polímeros (VROMAN; TIGHZERT; 2009). A elaboração de polímeros biodegradáveis na forma de filmes está baseada na dispersão ou solubilização dos biopolímeros (polissacarídeos, proteínas e/ou lipídios) em um solvente (água, etanol ou ácidos orgânicos) e acréscimo de aditivos (plastificantes ou agentes de liga) sendo obtida uma solução ou dispersão filmogênica. Após o preparo, estes passam por uma operação de secagem para a formação dos filmes (HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008).

Os filmes elaborados a partir de amido ou proteínas apresentam pouca flexibilidade, são quebradiços, possuem baixa maquinabilidade e desta forma se adequam com dificuldade aos processamentos convencionais para a produção de embalagens, sendo necessária a introdução de plastificantes às matrizes poliméricas (SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007). Os plastificantes são utilizados para modificar a estrutura através da diminuição das forças intermoleculares do biopolímero, o que facilita a mobilidade das cadeias e, assim, melhora sua processabilidade e as propriedades mecânicas. Os plastificantes mais estudados são os polióis, como o glicerol e o sorbitol, materiais que são compatíveis com diversos polímeros (LEE et al., 2013).

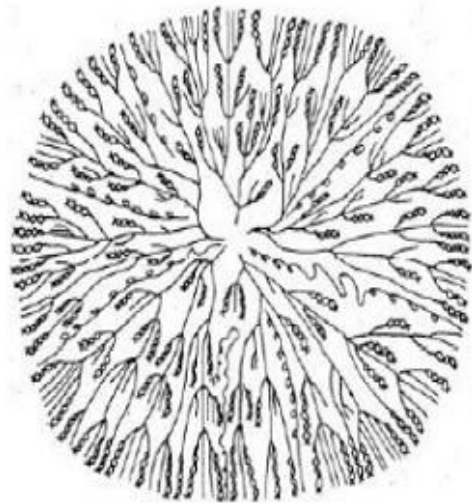
### **3.2.1 Amido**

O amido é um polissacarídeo de reserva encontrado em muitas plantas na forma de grânulos cristalinos insolúveis em água. É um dos polímeros mais abundantes, podendo ser extraído de fontes como arroz, milho, mandioca e batata (AHMED et al., 2012). No arroz (*Oryza sativa L.*) o amido compreende em torno de 90 % da massa seca dos grãos. Além do amido, os teores de proteínas e lipídios também são significativos, estando em torno de 6,5 %

e 0,8 %, respectivamente (DIAS et al., 2010). O beneficiamento do arroz resulta em torno de 14 % de grãos quebrados (quirera) que possuem menor valor comercial comparado aos grãos inteiros. Desta forma, uma alternativa para o aproveitamento da quirera é a extração de amido, tornando essa matéria-prima um produto com maior interesse industrial e comercial (ZAVAREZE et al., 2009).

Os grânulos de amido são compostos essencialmente pelas macromoléculas de amilose e amilopectina. O tamanho, a forma e a estrutura desses grânulos de amido variam com as fontes botânicas. A funcionalidade do amido é devido a proporção das macromoléculas presentes, assim como a organização física das mesmas dentro da estrutura granular (CEREDA, 2001; LIU, 2005). A proporção de amilose e amilopectina, e suas estruturas moleculares diferenciam os amidos das diferentes origens botânicas e condições de cultivo distintas (KITAHARA; COPELAND, 2004). A estrutura e a organização do grânulo são apresentadas na Figura 1.

**Figura 1** – Representação esquemática do grânulo de amido



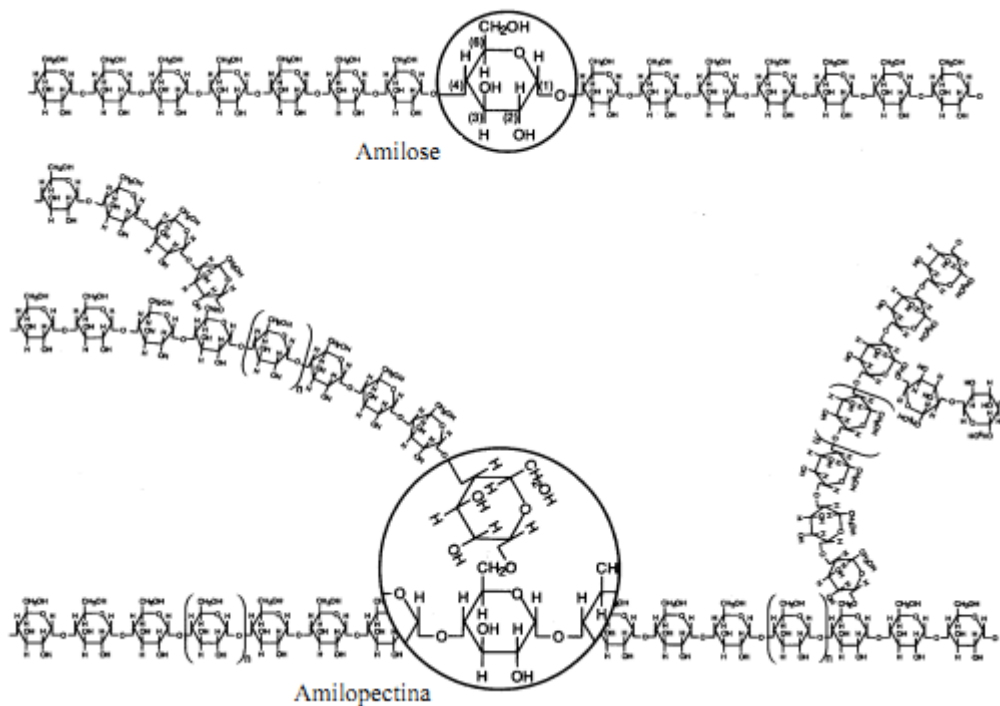
Fonte: FRENCH (1984)

A amilose é um polímero linear com unidades de D-glicose unidas por ligações  $\alpha(1-4)$  e a amilopectina é um polímero altamente ramificado, com unidades de D-glicose unidas através de ligações  $\alpha(1-4)$  e ramificações em  $\alpha(1-6)$  (HOSENEY, 1986). Na Figura 2 são visualizadas as estruturas da amilose e amilopectina.

Quando o amido é aquecido na presença de água ocorre a gelatinização. As pontes de hidrogênio se rompem, o grânulo passa a absorver água e incha, ocorrendo simultaneamente a liberação da amilose para o meio, contribuindo para o aumento da

viscosidade (CIACCO; CRUZ, 1982). A utilização do amido na elaboração de polímeros se baseia nas propriedades químicas, físicas e funcionais da amilose para formar géis e na sua capacidade de formar filmes (YOUNG, 1984). Devido a sua linearidade, quando em solução, as moléculas de amilose tendem a se orientar paralelamente, aproximando-se o suficiente para formar pontes de hidrogênio entre as hidroxilas de polímeros adjacentes. Conseqüentemente, a afinidade do polímero pela água é reduzida formando pastas opacas e filmes resistentes (WURZBURG, 1986).

**Figura 2** – Diagrama esquemático das estruturas da amilose e amilopectina



Fonte: KAPLAN (1998)

Existem grandes possibilidades de utilização dos sistemas de embalagens biodegradáveis à base de amido em especial na área de alimentos, devido ao seu baixo custo e ampla disponibilidade. No entanto, a produção de embalagens exclusivamente de amido não é viável devido a sua alta higroscopicidade e baixa flexibilidade, o que torna estes materiais sensíveis ao contato direto com a água e quebradiços (FARIA; VERCELHEZE; MALI, 2012). Para isso, vários estudos vêm investigando modificações no amido ou adição de outros componentes, para melhoria da estabilidade frente às condições ambientais (WITTAYA, 2012).

### 3.2.2 Proteínas de pescado

No município de Rio Grande (RS), considerada área tradicional de captura de pescado, estão localizadas diferentes indústrias pesqueiras que são responsáveis pelo descarte de subprodutos da pesca. Alguns dos subprodutos do processamento são espécies de baixo valor comercial, destinadas à fabricação de farinha de pescado juntamente com os demais resíduos da indústria ou descartadas no meio ambiente (CENTENARO; MELLADO, 2008).

A corvina (*Micropogonias furnieri*) é considerada, devido a sua abundância, uma das mais tradicionais e importantes espécies da pesca brasileira, argentina e uruguaia. Sua composição proximal varia em função das estações do ano, sexo, tamanho, ciclo reprodutor, alimentação, entre outros. Em geral, apresenta em média 80,2 % de umidade, 18,1 % de proteína, 0,70 % de cinzas e 1,1 % de lipídios (CENTENARO; MELLADO, 2008). Esta espécie atinge menores preços no mercado quando comparada a outras espécies regionais, principalmente as de menor tamanho (CENTENARO; PRENTICE-HERNÁNDEZ; MELLADO, 2009), portanto, constitui uma fonte interessante para a obtenção de proteínas.

Proteínas são moléculas complexas constituídas por carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e, às vezes, também por outros elementos, como enxofre, ferro, cobre, fósforo e zinco. São formadas essencialmente a partir de 20 aminoácidos unidos entre si por ligações peptídicas (ORDOÑEZ, 2005). Estes são capazes de formar ligações intermoleculares resultando em diferentes interações (VROMAN; TIGHZERT, 2009). As proteínas constituem uma importante matéria-prima para aplicações industriais incluindo os polímeros biodegradáveis (AHMED et al., 2012).

As proteínas de origem animal têm sido foco para o desenvolvimento de produtos que permitam seu melhor aproveitamento (CENTENARO; PRENTICE-HERNÁNDEZ; MELLADO, 2009). As proteínas do pescado, dependendo de sua solubilidade podem ser divididas em sarcoplasmáticas, miofibrilares e insolúveis ou do estroma (ORDOÑEZ, 2005). O músculo do pescado possui uma quantidade maior de proteínas miofibrilares e bem menor de proteínas do estroma (OGAWA; MAIA, 1999).

As proteínas musculares são classificadas em intracelulares e intercelulares. As proteínas intracelulares incluem as proteínas sarcoplasmáticas e as miofibrilares, enquanto que as proteínas intercelulares incluem as proteínas do estroma e as proteínas insolúveis (SIKORSKI et al., 1994). As proteínas sarcoplasmáticas (do plasma) compreendem 30 % do total das proteínas do músculo do pescado. As proteínas miofibrilares (actina e miosina) compreendem de 40 a 60 % do total de proteínas do músculo. Estas possuem importância

principalmente por suas propriedades funcionais, sendo que a miosina é responsável pelas propriedades de gelificação, retenção de água e de emulsificação. As proteínas do estroma (colágeno e elastina) são as de menor solubilidade e consistem no resíduo da extração das proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares (AYALA, 2001; OETTERER, 2006).

A obtenção de proteínas provenientes de pescado pode ser realizada através de processo enzimático ou através da aplicação do processo de mudança de pH (ou *pH shifting process*). Este se baseia no princípio de que a solubilidade de um material proteico homogeneizado em água é afetada pelo pH da mistura. Em condições extremamente ácidas ou alcalinas, ocorrem fortes variações positivas e negativas, o que conduz a repulsão e a interação com a água ocorrendo a solubilização (NOLSOE; UNDELAND, 2009). A proteína solubilizada é separada dos lipídios e dos componentes insolúveis e então é levada até o ponto isoelétrico, que é o pH onde as cargas negativas e positivas se equivalem e a solubilidade da proteína é mínima. Neste pH as forças de repulsão eletrostática desaparecem e as moléculas atraem-se formando agregados e precipitados (FREITAS, 2011).

Os polímeros proteicos têm apresentado boa resistência mecânica e baixa permeabilidade, ganhando maior atenção dos pesquisadores quanto ao seu desenvolvimento e aplicação (GU; WANG; ZHOU, 2013). Os filmes à base de proteínas são estabilizados através de interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals, ligações covalentes e pontes dissulfeto (REZVANI et al., 2013). Estes são formados através da desnaturação parcial das cadeias polipeptídicas pela adição de solvente, alteração de pH e aplicação de calor (RHIM; NG, 2007). Primeiramente ocorre a fase de aquecimento, onde a estrutura da proteína é rompida, algumas pontes dissulfeto são quebradas e os grupos sulfídricos e hidrofóbicos são expostos. Após, tem-se a fase de secagem, onde ocorrem novas interações hidrofóbicas e são formadas pontes dissulfeto e de hidrogênio (KROCHTA, 1997).

### **3.2.3 Blendas poliméricas**

Os polímeros biodegradáveis também podem ser desenvolvidos misturando diferentes macromoléculas, como polissacarídeos e proteínas. A combinação de amido e proteína é promissora no desenvolvimento de filmes biodegradáveis aproveitando as vantagens de cada um dos biopolímeros utilizados (SUN; SUN; XIONG, 2013). A mistura de matérias-primas altera as estruturas físicas e químicas de cada polímero devido a compatibilidade/incompatibilidade entre as macromoléculas utilizadas. A compatibilidade

depende da estrutura química, peso molecular e conformação, conseqüentemente afetando as propriedades finais do polímero (CHINMA; ARIAHU; ABU, 2012).

As blendas poliméricas podem ser constituídas pela mistura de diferentes polímeros sem que haja elevado grau de reação química entre os componentes. A interação molecular entre as cadeias dos polímeros é predominantemente do tipo secundária (intermolecular) (UTRACKI, 1989). Além de melhorar as propriedades físicas, químicas e mecânicas, a elaboração de blendas a partir de polímeros biodegradáveis tem a finalidade de aumentar a taxa de biodegradação e reduzir o custo total do material (ISHIAKU et al., 2002).

A miscibilidade, uma característica importante para filmes, está relacionada com a capacidade dos componentes utilizados se misturarem em nível molecular resultando em uma mistura homogênea (MOTHE; AZEVEDO, 2002). Do ponto de vista tecnológico, as blendas são classificadas em compatíveis ou incompatíveis. As blendas são compatíveis quando as propriedades finais apresentam um comportamento aditivo ou sinérgico em relação às propriedades apresentadas pelos componentes individuais. Em um sistema incompatível as propriedades são inferiores as apresentadas pelos componentes em separado (JACOB, 2006).

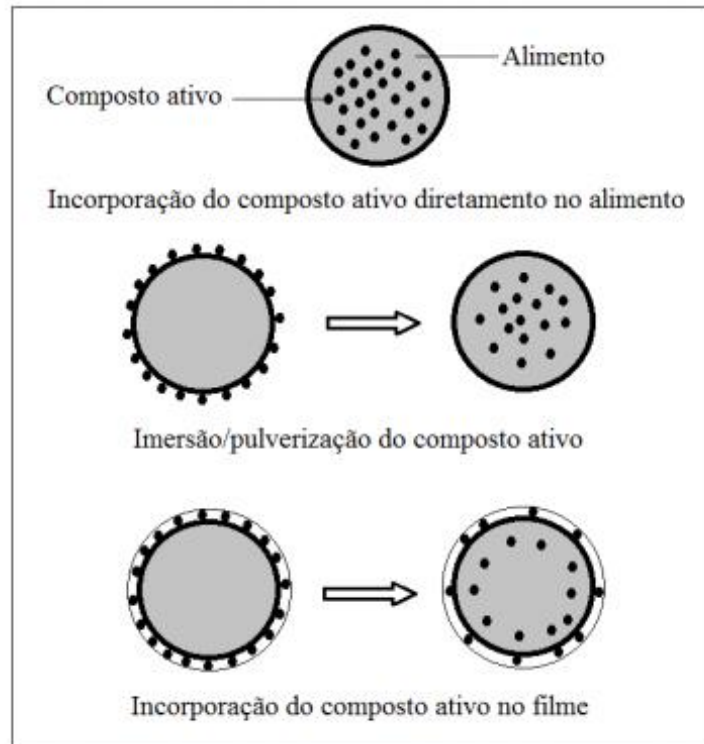
Em geral, blendas combinando biopolímeros têm apresentado resultados promissores nas propriedades mecânicas e de barreira. Zuo, Song e Zheng (2009) observaram que a utilização de glúten de trigo foi responsável por melhorar as propriedades de barreira, enquanto que a metilcelulose provocou uma melhoria nas propriedades mecânicas. Chinma, Ariahu e Abu (2012) verificaram uma melhoria nas características de filmes comestíveis ao combinar amido de mandioca e concentrado proteico de soja, obtendo as melhores propriedades mecânicas e menor permeabilidade ao vapor d'água na proporção 50/50. Guerrero et al. (2013) relataram que a utilização de ágar com isolado proteico de soja formaram matrizes compactas e que reforçaram a rede tridimensional. Sun, Sun e Xiong (2013) também obtiveram propriedades melhores nas blendas de amido de ervilha e proteína de amendoim quando comparado ao biopolímeros separadamente. Estes autores observaram que ao incorporar 50 % de proteínas os filmes ficaram consideravelmente mais flexíveis e houve pouca diminuição na resistência à tração. Além disso, a adição de proteínas também provocou melhoria nas propriedades de barreira à água.

### **3.3 Embalagens ativas**

O emprego de compostos ativos pela indústria de alimentos é indispensável para a manutenção e melhoria da qualidade dos produtos. Na Figura 3 podem ser visualizadas

algumas formas de incorporação dessas substâncias ao produto (por imersão ou pulverização diretamente no alimento e no material da embalagem).

**Figura 3** – Métodos de incorporação de substâncias ativas nos alimentos



Fonte: COMA (2008)

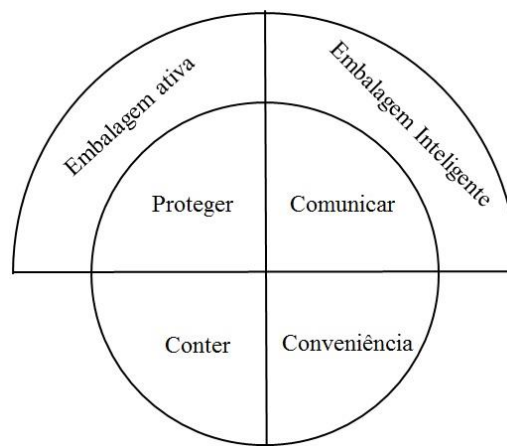
A escolha do método de incorporação do composto no alimento irá depender do produto a ser conservado e da conveniência do processo. Atualmente, os compostos ativos vêm sendo incorporados diretamente nas embalagens à base de macromoléculas naturais e utilizadas para embalar grande variedade de produtos. O emprego destes compostos diretamente no material de embalagem está relacionado com o conceito de embalagem ativa (COMA, 2008). As embalagens tradicionais requerem melhorias para prolongar a vida útil dos produtos alimentícios e atender a demanda dos consumidores por produtos saudáveis, seguros, mais próximos ao natural e com menos conservantes sintéticos. Por isso, novas tecnologias vêm surgindo no setor de desenvolvimento de embalagens para alimentos (SOARES et al., 2009).

Nas últimas décadas, um dos desenvolvimentos mais inovadores na área de embalagens para alimentos são as embalagens ativas e inteligentes, baseadas nas interações com o alimento e o ambiente da embalagem. Além das funções básicas desempenhadas pelas



embalagens tradicionais, as embalagens ativas também atuam na melhoria da qualidade e no aumento do prazo de validade através da adição de diferentes aditivos, tais como, antioxidantes, antimicrobianos, corantes e outros nutrientes (RHIM; PARK; HA, 2013). Enquanto as embalagens ativas são designadas ao aumento da vida útil dos alimentos, as embalagens inteligentes são utilizadas para indicar e monitorar o frescor do alimento embalado (DAINELLI et al., 2008), conforme apresentado na Figura 4.

**Figura 4** – Funções básicas das embalagens e interfaces de atuação das embalagens ativas e inteligentes



Fonte: BRIZIO (2014) adaptado de YAM et al. (2005)

Visto que cada alimento tem seu próprio mecanismo de degradação, que varia em função da sua composição e processamento, diversos mecanismos de embalagens ativas podem ser utilizados (BRAGA; PERES, 2010). Entre estes estão os absorvedores de umidade, atmosfera modificada, filmes com permeabilidade sensíveis a temperatura, embalagens antimicrobianas, emissores de gás carbônico, captadores de oxigênio, embalagens antioxidantes, entre outros (REALINI; MARCOS, 2014). A natureza dos agentes ativos que podem ser utilizados é muito ampla (ácidos orgânicos, enzimas, fungicidas, bactericidas, extratos naturais, entre outros) bem como a natureza dos materiais nos quais estes podem ser inclusos, como papéis, plásticos, metais ou suas combinações (DAINELLI et al., 2008).

Os extratos à base de plantas constituem uma boa alternativa para substituir os conservantes químicos e sua utilização em alimentos atende as expectativas dos consumidores por produtos naturais, proporcionando benefícios para o alimento e para o consumidor (BURT, 2004). Os óleos essenciais (OEs) de plantas são agentes naturais interessantes a serem incorporados em materiais de embalagem, pois possuem efeito antimicrobiano e antioxidante devido à presença de compostos fenólicos (OJAGH et al., 2010). O uso de

compostos fenólicos em embalagens tem sido incentivado devido a sua capacidade de evitar a deterioração oxidativa e microbiana dos alimentos. Os compostos fenólicos estão entre os compostos bioativos mais potentes e abundantes, os quais podem ser obtidos de plantas e resíduos agroindustriais (ARCAN; YEMENICIOGLU, 2011; DAMODARAN, 1996).

Diversos trabalhos em que se utilizaram compostos ativos em embalagens são encontrados na literatura. Na Tabela 1 podem ser visualizados alguns exemplos do emprego de compostos naturais em embalagens de macromoléculas naturais para aplicação em alimentos.

**Tabela 1** – Filmes de macromoléculas naturais adicionados de compostos bioativos

<b>Matriz</b>	<b>Composto ativo</b>	<b>Fonte</b>
Proteína de soja	Óleos essenciais de canela e gengibre	Atarés et al. (2010)
Gelatina de peixe	Extrato de canela, cravo e anis estrelado	Hoque, Benjakul e Prodpran (2011)
Gelatina e metilcelulose	Óleo essencial de orégano e tomilho e extrato de frutas cítricas	Iturriaga, Olabarrieta e Martínez-de-Marañón (2012)
Amaranto, quitosana e amido	Óleo essencial de orégano, canela e erva cidreira	Avila-Rosa et al. (2012)
Alginato	Óleo essencial de orégano	Benavides, Villalobos-Carvajal e Reyes (2012)
Quitosana	Óleo essencial de <i>Zataria multiflora</i> Boiss e extrato de semente de uva	Moradi et al. (2012)
Carragena	Óleo essencial de seriguela ( <i>Satureja hortensis</i> )	Shojaee-Aliabadi et al. (2013)
Polissacarídeo de soja	Óleos essenciais de <i>Zataria multiflora</i> Boiss e <i>Mentha pulegium</i>	Salarbashi et al. (2013)
Amido de trigo e quitosana	Óleos essenciais de manjeriço e tomilho, ácido cítrico e $\alpha$ -tocoferol	Bonilla et al. (2013)
Amido de milho	Óleos essenciais de <i>Zataria multiflora</i> Boiss e <i>Mentha pulegium</i>	Ghasemlou et al. (2013)

**Tabela 1** – Filmes de macromoléculas naturais adicionados de compostos bioativos (continuação)

Gelatina de pescado	Óleos essenciais de raízes	Tongnuanchan, Benjakul e Prodpran (2013)
Amido de mandioca	Óleos essenciais de canela e cravo	Souza et al. (2013)
Gelatina	Extrato etanólico de própolis	Bodini et al. (2013)
Proteína de triticale	Óleo essencial de orégano	Aguirre, Borneo e León (2013)
Glúten de trigo	Cinamaldeído	Balanguer et al. (2013)
Gelatina de pescado	Extrato de chá verde, extrato de semente de uva, extrato de gengibre, extrato de folha de Ginkgo	Li et al. (2014)
Amido de mandioca	Extrato de erva mate e polpa de manga	Reis et al. (2014)
Gelatina suína	Extrato etanólico de cúrcuma	Bitencourt et al. (2014)
Quitosana	Óleo essencial de limão, tomilho e canela	Peng e Li (2014)
Mucilagem das sementes de marmelo	Óleo essencial de orégano	Jouki et al. (2014)

### 3.3.1 Óleos essenciais

Óleos essenciais são compostos naturais complexos e aromáticos obtidos de diferentes partes das plantas, como flores, folhas, sementes, cascas, frutos e raízes (BURT, 2004). Na natureza, os óleos essenciais são metabólitos secundários das plantas possuindo um importante papel na sua proteção como antibacterianos, antifúngicos, inseticidas e antivirais. Além disso, também possuem a função de atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de pólen e sementes, ou repelir insetos indesejáveis. Com relação à composição dos óleos essenciais, estes constituem misturas que possuem de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações, sendo que dois ou três estão em concentrações razoavelmente maiores (20-70%) (BAKKALI et al., 2008).

A extração dos óleos essenciais pode ser realizada por diferentes processos, os quais dependem da natureza do óleo a ser extraído. Os principais métodos de extração utilizados na indústria são destilação por arraste de vapor, enfleurage, maceração, prensagem, extração por solventes e extração com dióxido de carbono supercrítico (DOURADO, 2012).

Os óleos essenciais possuem grande variedade de efeitos biológicos, incluindo propriedades antioxidantes e antimicrobianas, devido à presença de compostos fenólicos como carvacrol, eugenol, linalol e timol e são considerados seguros sendo compostos GRAS (*Generally Recognized As Safe*) de acordo com a FDA (*Food and Drug Administration*) (AHMED et al., 2012).

Os lipídios estão sujeitos a uma série de reações deteriorativas, como a oxidação. Esta é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, tornando os alimentos impróprios para o consumo. Os compostos fenólicos atuam na redução ou inibição dos processos oxidativos não só nos lipídios, mas em outras moléculas como proteínas, DNA, entre outras (SOARES, 2002). Oliveira et al. (2007) relataram que os compostos fenólicos também possuem efeito inibidor em sistemas enzimáticos, tal como a peroxidase, que é uma enzima presente em diferentes seres vivos com a função de proteger as células de possíveis danos e sua atividade se manifesta, principalmente, em situações de desequilíbrios físico-químicos do sistema. Nos alimentos, a ação desta enzima resulta em perdas no aroma, cor e nutrientes. Por isso, vários pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e utilização dos compostos fenólicos em alimentos.

O orégano (*Origanum vulgare*) apresenta diversos benefícios terapêuticos, como por exemplo antisséptico, e tem sido utilizado para diferentes aplicações por todo o mundo. O óleo essencial de orégano tem sido utilizado como agente aromatizante em alimentos, perfumes, em produtos como fungicidas e para aplicações farmacêuticas e veterinárias (ASENSIO; GROSSO; JULIANI, 2015b).

Nos últimos anos vários estudos realizados têm demonstrado a eficácia do óleo essencial de orégano contra diferentes bactérias, tais como, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Enterococcus faecium*, entre outras (BOUHDID et al., 2008; FALCO et al., 2013). Devido aos diferentes grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, sua atividade antimicrobiana provavelmente não seja atribuída a um mecanismo específico, mas a vários alvos nas células, como alterações na membrana citoplasmática, perturbações sobre a força próton motriz, no fluxo de elétrons, no transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula. Nem todos esses

mecanismos atingem alvos separados, sendo que alguns podem ocorrer em consequência de outro mecanismo (BURT, 2004).

O óleo essencial de orégano também tem sido amplamente utilizado como antioxidante em alimentos como queijo cottage (ASENSIO; GROSSO; JULIANI, 2015a), amendoins salgados (OLMEDO et al., 2008, 2009), azeite de oliva (ASENSIO et al., 2011, 2012) e carne de peru (BOTSOGLOU et al., 2003). Os óleos essenciais atuam como antioxidantes por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo constitui a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (SOARES, 2002).

### 3.3.2 Pimenta rosa

A *Schinus terebinthifolius* Raddi, popularmente conhecida como aroeira-vermelha ou pimenta rosa, é uma árvore de folhas perenes pertencente à família Anacardiaceae, originária da América do Sul, especialmente do Brasil, Paraguai e Argentina. Os frutos são do tipo drupa e têm coloração verde no início e depois tornam-se vermelhos (Figura 5) com a casca em uma espécie de concha envolvendo a semente (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; PRADO, 2005).

**Figura 5** – *Schinus terebinthifolius* Raddi (frutos maduros de pimenta rosa)



A pimenta rosa tem sido pouco explorada no Brasil. As partes utilizadas que apresentam propriedades medicinais são a casca, folhas e frutos. Como medicamento é

utilizada devido a sua ação adstringente, antidiarréica, antiinflamatória, depurativa, diurética e febrífuga, e devido a sua composição é usada no tratamento de distúrbios respiratórios. Além disso, também possui propriedades fitoquímicas e alimentícias, sendo empregada como condimento em molhos, bebidas e xaropes, e na indústria de cosméticos e perfumaria (DOURADO, 2012; GUERRA et al., 2000).

A atividade antimicrobiana e antioxidante da pimenta rosa se deve provavelmente a presença de substâncias fenólicas, flavonóides, taninos e óleos essenciais, que são metabólitos secundários com grande aplicação em diferentes segmentos da indústria (LAWRENCE, 1984; QUEIRES; RODRIGUES 1998). Estas substâncias ativas podem ser extraídas de diferentes formas, as quais incluem sistemas aquosos, aceto etílicos e alcóolicos, sob diferentes condições de interações com as estruturas vegetais, visando obter um extrato com todos os compostos de interesse e livre de interferentes como carboidratos e lipídios (BERTOLDI, 2006; SOUZA et al., 2009).

A atividade antimicrobiana da pimenta rosa já foi comprovada contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), bem como na levedura *Candida albicans* (DOURADO, 2012). Bertoldi (2006) comprovou a atividade antioxidante da pimenta rosa ao estudar a fração fenólica, a oleoresina e o óleo essencial. Bendaoud et al. (2010) verificaram que os óleos essenciais de *Schinus terebinthifolius* Raddi e *Schinus molle* L. possuem atividade antioxidante a anticâncer. Bernardes (2014) ao estudar o extrato metanólico de pimenta rosa também constatou que esta possui atividade antioxidante.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

Para a extração do amido foi utilizada a quirera de arroz fornecida pela empresa Arroeira Pelotas localizada em Pelotas (RS). As proteínas de peixe foram obtidas da corvina (*Micropogonias furnieri*) adquirida no comércio da cidade de Rio Grande (RS).

Os reagentes utilizados nos métodos analíticos foram todos de qualidade padrão (PA). O óleo essencial de orégano utilizado foi da marca Quinari com índice de refração de 1,3521 e a pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) foi cedida pelo Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da FURG.

O trabalho experimental da dissertação foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia de Alimentos e na Planta de Processamento de Pescados da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Caracterização das matérias-primas

A quirera de arroz e o músculo da corvina foram caracterizados quanto aos conteúdos de umidade, proteínas, cinzas e lipídios de acordo com os métodos oficiais da AOAC (1995).

#### 4.2.2 Extração do amido

O amido da quirera de arroz foi extraído segundo o método descrito por Wang e Wang (2004), através de uma extração alcalina. A quirera de arroz foi triturada em moinho de facas (TECNAL, TE-633, Brasil), deixada em repouso por 18 h imersa em solução de NaOH 0,1 % (1:2 m/v) e após, homogeneizada em blender (METVISA, 1322, Brasil) por 2 min. Então, sua granulometria foi padronizada em peneira de 63 µm (Mesh 250) e o filtrado foi centrifugado a 1400 x g por 10 min. O precipitado foi ressuspenso em igual volume de solução de NaOH 0,1 % e novamente centrifugado com duas repetições desta operação. O precipitado foi lavado com água destilada e novamente centrifugado. O amido precipitado foi ressuspenso em água destilada, sendo a solução neutralizada a pH 6,5 com solução de HCl 0,1

mol/L<sup>-1</sup> e centrifugado. Após, o amido foi lavado com água destilada e centrifugado, com duas repetições desta operação. O amido foi seco a 40 °C em estufa com circulação forçada de ar (QUIMIS, 314D, Brasil) durante aproximadamente 6 h. Após secagem e moagem à granulometria inferior a 0,15 mm (Mesh 100), foi armazenado em embalagem de vidro e acondicionado sob congelamento a -18 °C até posterior utilização.

#### **4.2.2.1 Determinação do teor de amilose do amido**

O teor de amilose do amido foi determinado por método colorimétrico, conforme descrito por Martinez e Cuevas (1989) adaptado. Uma amostra de 100 mg foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, acrescentando-se 1 mL de álcool etílico 95 % e 9 mL de solução de NaOH 1 mol/L<sup>-1</sup>, completando-se o volume com água destilada e sendo deixada em repouso por aproximadamente 20 h. De cada amostra foi retirada uma alíquota de 5 mL que foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, em que previamente foi adicionado 1 mL de ácido acético 1 mol/L<sup>-1</sup> e 2 mL de solução de iodo 2 % (m/v) preparada três horas antes da análise, completando-se então o volume de cada balão volumétrico com água destilada. Para a quantificação, foi construída uma curva padrão utilizando amilose pura (Sigma-Aldrich) na faixa de 0,005 a 0,03 mg.mL<sup>-1</sup> submetida ao mesmo procedimento utilizado nas amostras do amido extraído. A leitura de absorbância foi realizada 30 min após a adição de iodo a 620 nm.

#### **4.2.3 Obtenção das proteínas de pescado**

Para obtenção das proteínas foram utilizados o músculo e o resíduo da filetagem de corvina (*Micropogonias furnieri*). O resíduo foi passado em uma despoldadeira mecânica (HIGH TECH, HT/2500, Brasil) para separação dos ossos e escamas da carne mecanicamente separada. A obtenção das proteínas foi semelhante ao realizado por Freitas et al. (2011), diferindo apenas no pH de solubilização (pH 11,0). O processo de variação de pH foi utilizado para solubilizar e isolar as proteínas do músculo e da carne mecanicamente separada de pescado.

A matéria-prima foi homogeneizada com água destilada na proporção 1:9 (m:v) e triturada em blender por 1 min. A solubilização das proteínas foi realizada com NaOH 1 mol/L<sup>-1</sup> a 4 °C com temperatura controlada através de banho ultratermostático (QUIMIS, 0214M2, Brasil) durante 20 min sob agitação constante com agitador eixo-hélice (IKA,



RW20DZM.n, Alemanha). As proteínas solubilizadas foram centrifugadas a 9000 x g por 20 min para separá-las dos lipídios (fase superior) e das proteínas insolúveis (fase inferior). As proteínas solúveis (fase intermediária) foram precipitadas ao atingir o ponto isoelétrico (pH 5,5), com adição de soluções diluídas de HCl 1 mol/L<sup>-1</sup> e NaOH 1 mol/L<sup>-1</sup>. A seguir, foi realizada uma segunda centrifugação a 9000 x g por 20 min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi submetido à secagem a 40 °C em estufa com circulação forçada de ar por aproximadamente 6 h. Após seco, foi triturado em moinho de facas, peneirado (Mesh 42), armazenado em embalagem de vidro e acondicionado sob congelamento a -18 °C para posterior uso. Após a obtenção das proteínas realizou-se as determinações de umidade, proteínas, cinzas e lipídios de acordo com os métodos oficiais da AOAC (1995).

#### **4.2.4 Extração dos compostos fenólicos de pimenta rosa**

Os compostos fenólicos da pimenta rosa foram extraídos e quantificados de acordo com Furlong et al. (2003). A amostra (5 g) foi colocada em metanol (40 mL) sob agitação horizontal (200 rpm) durante 2 h a 25 °C, sendo posteriormente interrompida por 15 min, e reiniciada a agitação (1 h) depois de acrescentado 10 mL de metanol. O extrato foi filtrado e lavado três vezes com 10 mL de hexano, sendo retirada a fase aquosa (de baixo). Em seguida, foi clarificado com hidróxido de bário 0,1 mol/L<sup>-1</sup> e sulfato de zinco 5 % e após 20 min de repouso, foi filtrado e o volume aferido a 100 mL com metanol. Para aplicação dos compostos fenólicos nas blendas, após a lavagem com hexano, o metanol foi evaporado em rotaevaporador (QUIMIS, 344.2, Brasil), os compostos fenólicos foram ressuspensos em 10 mL de água destilada utilizando banho ultrassônico (UNIQUE, USC 800, Brasil) e em seguida foi realizada a clarificação.

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada empregando-se o método espectrofotométrico utilizando reagente de Folin-Ciocalteau (FURLONG et al., 2003). Alíquotas de 0,2 mL dos extratos fenólicos foram adicionadas a tubos de ensaio juntamente com 0,8 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 4,5 mL da solução alcalina (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4 %, CuSO<sub>4</sub> 2 % e tartarato duplo de sódio e potássio 4 % na proporção 100:1:1). Os tubos permaneceram em repouso por 15 min em banho-maria a 40 °C. Posteriormente foram adicionados 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteau (diluído 1:2 em água destilada), deixado em repouso por 10 min, e medida a absorbância em comprimento de onda de 750 nm em espectrofotômetro (IONLAB, IL-592, Brasil). Para a quantificação, foi utilizada uma curva de calibração de ácido gálico em concentrações de 0 a 150 µg.mL<sup>-1</sup>.

#### 4.2.4.1 Perfil de compostos fenólicos do extrato de pimenta rosa

A identificação dos compostos fenólicos do extrato foi realizada através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando padrões de referência da Sigma-Aldrich. O extrato de pimenta rosa (5 mL) foi seco sob atmosfera de nitrogênio e ressuspendido na fase móvel (1 mL) composta por 20 % de metanol e 80 % de água acidificada (ácido acético 1%). Esta mistura foi injetada em cromatógrafo líquido (SHIMADZU, CLASS-M10A, Japão) acoplado com detector UV, utilizando coluna Supelco C18 (4,6 x 250 mm) com tamanho de partícula de 5 µm. A vazão da fase móvel foi de 0,7 mL.min<sup>-1</sup> a 35 °C, com tempo de corrida total de 25 min. Nos primeiros 15 min se utilizou gradiente de detecção a 280 nm para detectar o ácido gálico, ácido protocateico, ácido clorogênico, ácido hidroxibenzóico, ácido cafeico, ácido siríngico e vanilina e 10 min com gradiente de detecção a 350 nm para detectar o ácido cumárico e ácido ferúlico.

#### 4.2.4.2 Determinação da capacidade antioxidante do extrato fenólico de pimenta rosa e do óleo essencial de orégano

A avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos foi realizada pelos métodos de capacidade de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) e inibição da oxidação catalisada enzimaticamente.

O consumo do radical livre DPPH pelo extrato fenólico de pimenta rosa foi monitorado conforme metodologia de Herrero et al. (2005), através da determinação do decréscimo da unidade de absorvância (UA) nas soluções. Foram adicionados 3,0 mL da solução metanólica de DPPH ( $5 \times 10^{-5}$  mol/L<sup>-1</sup>), 0,7 mL do extrato fenólico e 1,3 mL de metanol aos tubos. Para o controle foram utilizados 2 mL de metanol em substituição ao extrato fenólico. A mistura reativa permaneceu a temperatura ambiente, sem a incidência de luz e a mudança de cor violeta para amarela foi medida após 30 min de reação. A capacidade de sequestrar o radical livre foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical, e calculado conforme a Equação 1.

$$\% \text{ Inibição} = \frac{UA_{\text{controle}} - UA_{\text{amostra}}}{UA_{\text{controle}}} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde  $UA_{controle}$  corresponde as unidades de absorvância do controle,  $UA_{amostra}$  corresponde as unidades de absorvância da amostra.

A inibição da oxidação catalisada enzimaticamente foi determinada de acordo com Oliveira et al. (2007). A batata rosa (*Solanum tuberosum*) foi empregada como fonte da peroxidase. O extrato enzimático foi obtido de 2 g de polpa de batata homogeneizada com 100 mL de solução tampão fosfato pH 7,0 (20 mmol/L<sup>-1</sup>) sob agitação em blender por 3 min. O homogeneizado foi centrifugado a 3220 x g e 4 °C, por 10 min, e filtrado. O extrato bruto (sobrenadante) foi mantido a aproximadamente 4 °C, para posterior utilização. A reação enzimática foi realizada em temperatura ambiente em pH 7,0 utilizando-se guaiacol 1 % como substrato em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,08 %. O extrato fenólico (0,5 mL) foi adicionado como inibidor da reação. Foram adicionados 1,5 mL de tampão fosfato pH 7,0, 1 mL de água destilada, 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,08 %, 0,5 mL de guaiacol 1 % e 1 mL de extrato enzimático de peroxidase. Os tubos foram agitados e após 15 min a absorvância foi medida a 470 nm em espectrofotômetro (IONLAB IL-592, Brasil). A atividade antioxidante foi expressa como percentual de inibição da reação de escurecimento, em relação ao controle.

A atividade antioxidante do óleo essencial de orégano foi determinada pelos mesmos métodos utilizados para o extrato fenólico de pimenta rosa. Para realização das análises foi preparada uma diluição de 2000 µg.mL<sup>-1</sup> do óleo essencial em álcool metílico.

#### **4.2.5 Preparo das blendas poliméricas**

Os testes preliminares utilizando as proteínas do músculo e do resíduo de corvina juntamente com o amido foram realizados na proporção de 50/50 e com uma concentração total de sólidos de 3 %. Posteriormente foram realizados outros testes utilizando as proteínas do músculo com amido na proporção de 50/50 nas concentrações de 3 e 4 %. Com base nos resultados dos testes preliminares foi utilizada somente a proteína de músculo de pescado juntamente com o amido para o desenvolvimento do trabalho e a concentração utilizada foi de 3 % de sólidos.

As blendas foram elaboradas pela técnica de *casting* semelhante ao realizado por Zavareze et al. (2013). O amido e proteína foram homogeneizados em água destilada utilizando agitador mecânico (FISATOM, 712, Brasil) e o pH da solução foi ajustado para 11,0 utilizando NaOH 1 mol/L<sup>-1</sup>. Então, o glicerol foi adicionado como plastificante na concentração de 25 % em relação a massa total de sólidos. A solução foi levada a 80 °C utilizando um banho termostático (BROOKFIELD, TC-102, Estados Unidos) acoplado a um

reator encamisado de vidro. Esta temperatura foi mantida por 20 min sob agitação para a formação da solução filmogênica. Após o resfriamento a 35 °C foi adicionado o óleo essencial de orégano ou extrato fenólico de pimenta rosa, sendo então, homogeneizados por mais 10 min.

Dois planejamentos experimentais <sup>22</sup> do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com três repetições no ponto central foram elaborados, sendo um empregando o óleo essencial de orégano (OEO) e o outro o extrato fenólico de pimenta rosa (EFP). Em ambos os planejamentos foi variada a proporção de amido/proteína. Com base nos resultados obtidos na caracterização das blendas, um ensaio de cada planejamento foi selecionado para a determinação da capacidade antioxidante, além das análises estruturais. As proporções de amido/proteína utilizadas, bem como as concentrações de OEO e EFP podem ser visualizadas na Tabela 2.

**Tabela 2** – Valores utilizados no planejamento experimental <sup>22</sup> para produção das blendas

Variáveis codificadas	Proporção amido/proteína (%)	OEO ou EFP (g.100 g <sup>-1</sup> de amido/proteína)*
-1,41	14,75/85,25	3,18
-1	25/75	4
0	50/50	6
1	75/25	8
1,41	85,25/14,75	8,82

\*OEO: Óleo essencial de orégano; EFP: Extrato fenólico de pimenta rosa

As soluções filmogênicas foram colocadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) e submetidas a secagem em estufa com circulação de ar (BIOPAR, S150BA) a 40 °C por aproximadamente 12 h. A espessura dos filmes foi padronizada com base na gramatura da solução filmogênica colocada nas placas de Petri. Após a secagem os filmes permaneceram 24 h em dessecadores mantidos a 25 °C e umidade relativa (UR) de 50 %, para análises posteriores. Para controle da UR foi utilizada solução saturada de cloreto de cálcio.

## 4.2.6 Caracterização das blendas

### 4.2.6.1 Espessura

A espessura (mm) dos filmes foi determinada utilizando um micrômetro digital (INSIZE IP54, Brasil) em dez pontos diferentes, sendo um no centro e os demais na periferia da blenda.

### 4.2.6.2 Solubilidade em água

A solubilidade em água dos filmes foi realizada segundo método proposto por Gontard et al. (1994), com algumas modificações. As blendas foram cortadas em discos de 2 cm de diâmetro e levados à estufa (DELEO, A15E, Brasil) a 105 °C para determinação da matéria seca inicial. Após, estas foram imersas em 50 mL de água destilada e mantidas sob agitação lenta a 25 °C por 24 h. Passado esse período as amostras foram removidas e secas a 105 °C para determinação da matéria seca que não dissolveu. Para o cálculo dos valores de solubilidade S (%) foi utilizada a Equação 2.

$$S = \frac{m_i - m_f}{m_i} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde  $m_i$  corresponde a massa seca inicial (g) e  $m_f$  corresponde a massa seca final (g).

### 4.2.6.3 Permeabilidade ao vapor d'água

A permeabilidade ao vapor d'água (PVA) dos filmes foi determinada gravimetricamente segundo o método E96-00 da ASTM (ASTM, 2000), que consiste na pesagem de uma cápsula hermeticamente fechada, contendo o filme na superfície e a substância dessecante (cloreto de cálcio) no interior. A cápsula foi colocada em ambiente com umidade controlada, utilizando solução de cloreto de sódio para manter o ambiente externo a 75 % de umidade relativa. A célula de permeação contendo o filme foi pesada a cada 1 h por 8 h. Para o cálculo dos valores foi utilizada a Equação 3, em que M é o ganho de massa do  $\text{CaCl}_2$  (g); E é a espessura do filme (mm); A é a área de permeação ( $\text{m}^2$ ), t é o tempo (h) e  $\Delta P$  é o diferencial de pressão de vapor (kPa).

$$\text{PVA (g.mm/m}^2\text{.h.kPa)} = \frac{\text{M.E}}{\text{A.t.}\Delta\text{P}} \quad (3)$$

#### 4.2.6.4 Propriedades óticas

A cor e a opacidade das blendas foram determinadas utilizando colorímetro (MINOLTA, CR 400, Japão), através do sistema CIEL\*a\*b. Os parâmetros analisados neste sistema de cores são: L (luminosidade), a\* (verde e vermelho) e b\* (azul e amarelo). A cor das blendas foi expressa como diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ), o qual é calculado conforme Equação 4. Os valores de L\*, a\* e b\* são os valores dos parâmetros de cor padrão (L = 97,39, a\* = 0,14, b\* = 1,94) e L, a e b são os valores dos parâmetros de cor da amostra.

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L)^2 + (a^* - a)^2 + (b^* - b)^2} \quad (4)$$

Para determinação da opacidade foi calculada a relação entre a opacidade do filme sobreposto ao padrão preto ( $Y_{\text{preto}}$ ) e ao padrão branco ( $Y_{\text{branco}}$ ), segundo a Equação 5.

$$\text{Opacidade (\%)} = \frac{Y_{\text{preto}}}{Y_{\text{branco}}} \cdot 100 \quad (5)$$

#### 4.2.6.5 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas das blendas foram determinadas em texturômetro (*Stable Micro Systems*, TA.XTplus, Reino Unido), empregando-se metodologia ASTM D882-02 (ASTM, 2002). As propriedades de tração determinadas foram: resistência à tração (MPa) e alongação (%). As medidas foram conduzidas em temperatura ambiente (25 °C). A separação inicial e a velocidade do *probe* foram de 50 mm e 1 mm/s, respectivamente. As amostras foram cortadas em tiras de 85 mm de comprimento e 25 mm de largura. Para determinação dos valores de resistência à tração (MPa) foi utilizada a Equação 6, em que F é a força no momento da ruptura da blenda (N) e A a área da secção transversal do filme (m<sup>2</sup>).

$$\text{RT (MPa)} = \frac{F}{A} \quad (6)$$

A porcentagem de alongamento (E) foi determinada pela Equação 7, em que  $d_f$  (mm) corresponde a distância final de alongamento da blenda, e  $d_i$  (mm) é a distância inicial entre as garras (50 mm).

$$E (\%) = \frac{d_f}{d_i} \cdot 100 \quad (7)$$

#### 4.2.6.6 Determinação da capacidade antioxidante das blendas

A determinação da atividade antioxidante das blendas foi realizada pelo método do DPPH de acordo com Maniglia (2012). A amostra foi preparada utilizando 100 mg da blenda e adicionados 2 mL de metanol. Essa mistura foi mantida sob agitação horizontal (100 rpm) durante 3 h à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após, uma alíquota de 500  $\mu$ L do sobrenadante foi retirada e foram adicionados também 2 mL de solução de DPPH 0,06 mmol/L<sup>-1</sup> previamente preparada. A mistura foi mantida a temperatura ambiente no escuro por 30 min sendo então lida a absorbância a 517 nm em espectrofotômetro. Como solução controle foram utilizados 500  $\mu$ L de metanol e 2 mL de solução de DPPH. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a Equação 1 já apresentada anteriormente.

A atividade antioxidante das blendas também foi avaliada pelo método da inibição da oxidação catalisada enzimaticamente conforme metodologia descrita anteriormente. A amostra foi preparada da mesma forma realizada para o método do DPPH e foi utilizado 0,5 mL da mistura como inibidor da reação.

#### 4.2.6.7 Morfologia

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da Zona Sul (CEME-SUL) da Universidade Federal do Rio Grande. As amostras foram analisadas para determinar as características de superfície usando um microscópio eletrônico de varredura (JSM 6060, JEOL, Japão) operando a 10 kV. As amostras foram colocadas sobre *stubs* de alumínio e revestidas de camada de ouro antes de obter as imagens. As fotografias foram tiradas com 1000x de ampliação.

#### **4.2.6.8 Grupos funcionais por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

Os filmes foram submetidos à determinação por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) na região de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  com 45 varreduras. Foi utilizada a técnica de Reflectância Total Atenuada Horizontal (ATR-H) empregando equipamento espectrofotométrico (PRESTIGE 210045, SHIMADZU, Japão). Esta análise foi realizada no Laboratório de Síntese e Catálise Inorgânica da Universidade Federal do Rio Grande.

#### **4.2.6.9 Cristalinidade por difração de raios X (DRX)**

A análise de difração de raios X (DRX) foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da Zona Sul (CEME-SUL) da Universidade Federal do Rio Grande. Utilizou-se um difratômetro (BRUKER, D8 Advance, Estados Unidos) com radiação de cobre, operando a 40 kV e 40 mA. As medidas foram obtidas com comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 1,5418Å, incremento de 0,0025 e com intervalos de medida em  $2\theta$  de 5 a 40°.

#### **4.2.6.10 Análise termogravimétrica (TGA)**

A análise termogravimétrica dos filmes foi realizada no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande. Utilizou-se termobalança de um medidor termoanalítico (SHIMADZU, modelo DTG-60, Japão) em atmosfera estática de ar com vazão constante de 20  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A velocidade de varredura foi de 10  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  e a faixa de temperatura percorrida foi de 23 até 550  $^{\circ}\text{C}$  utilizando um porta-amostra de alumínio.

### **4.3 Tratamento dos dados**

Para avaliação dos filmes foi aplicada metodologia de superfície de resposta com objetivo de estudar os efeitos simultâneos das variáveis independentes sobre as respostas. Também foi utilizado o Teste t-Student ao nível de 5 % de significância para comparar as médias obtidas nos testes preliminares.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Composição química das matérias-primas utilizadas

Na Tabela 3 está apresentada a composição proximal das matérias-primas utilizadas.

**Tabela 3** – Composição proximal das matérias-primas utilizadas

<b>Matéria-prima</b>	<b>Umidade (%)*</b>	<b>Proteínas (% b.s)*</b>	<b>Lipídios (% b.s)*</b>	<b>Cinzas (% b.s)*</b>
Músculo de Pescado	80,8 ± 0,15	83,9 ± 0,19	5,0 ± 0,06	4,5 ± 0,15
Proteínas extraídas	9,2 ± 0,09	96,7 ± 0,70	0,7 ± 0,02	1,3 ± 0,08
Quirera de arroz	11,7 ± 0,15	8,4 ± 0,03	0,5 ± 0,02	0,7 ± 0,06

\*Média de 3 repetições ± desvio padrão; b.s: base seca

Embora a composição do pescado varie conforme os tecidos, sexo, idade e estação do ano (YEANNES; ALMANDOS, 2003), os valores obtidos na composição proximal do músculo de corvina são semelhantes aos de Fontana et al. (2009). Estes autores obtiveram e avaliaram concentrados proteicos de corvina processados por extração química e ao caracterizar a matéria-prima encontraram teores de 87,1 %, 5,0 % e 5,7 % de proteínas, cinzas e lipídios, respectivamente.

O rendimento da extração de proteínas foi de aproximadamente 10,7 % e após este processo houve aumento no teor de proteínas (96,7 %) e a diminuição dos teores de lipídios (0,7 %) e cinzas (1,3 %). O reduzido conteúdo lipídico ocorre devido a maior parte dos lipídios ser separada junto com a fração insolúvel durante o processo de concentração de proteínas. Ao realizar o processo alcalino de isolamento das proteínas do músculo de corvina Fontana et al. (2009) observaram comportamento semelhante.

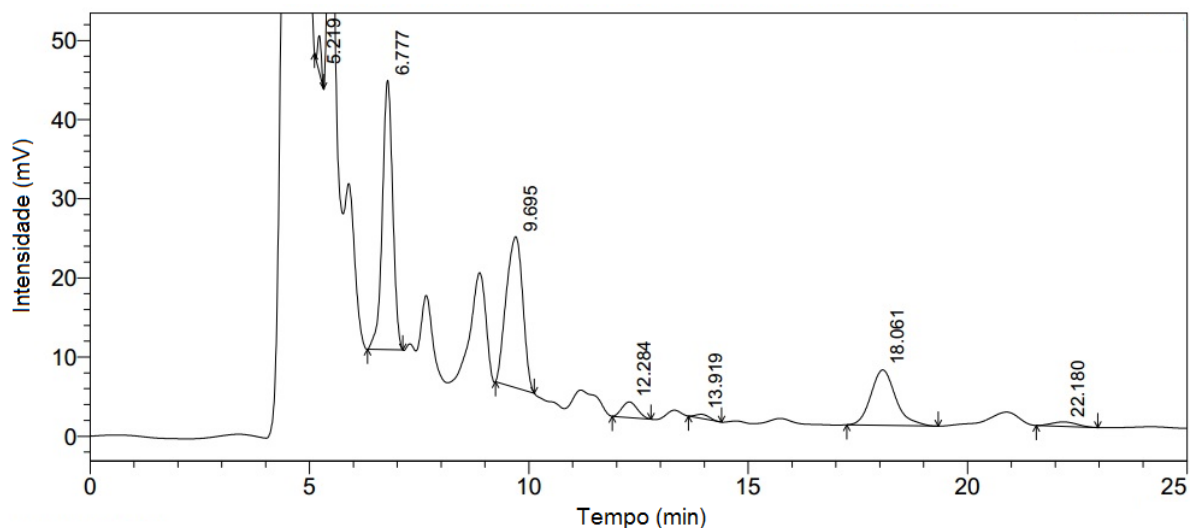
Ao determinar a composição proximal da farinha de arroz, Zavareze et al. (2009) obtiveram 8,4 % de proteínas, igual ao presente trabalho e 0,7 % de lipídios e 0,9 % de cinzas, valores superiores aos obtidos no presente trabalho. O rendimento de extração de amido da quirera foi de 28,1 %, inferior ao obtido pelos autores citados anteriormente, e o teor de amilose do amido extraído foi de 40,8 %. De acordo com Techawipharat, Suphantharika e Bemiller (2008), amidos com quantidades de amilose superior a 25 % são considerados de alta amilose. Li et al. (2011) relataram que amidos de alta amilose apresentaram melhores

propriedades mecânicas em relação a resistência à tração. A maior resistência dos filmes elaborados com amido de alta amilose se deve a habilidade das cadeias lineares da amilose em formar pontes de hidrogênio em maior extensão do que as cadeias de amilopectina. A fragilidade dos filmes com elevado teor de amilopectina ocorre devido ao maior grau de ramificações e o pequeno tamanho das cadeias ramificadas (KOCH et al., 2010).

## 5.2 Caracterização da pimenta rosa

Na Figura 6 está apresentado o cromatograma obtido na determinação dos compostos fenólicos da pimenta rosa. No Apêndice 1 estão apresentados os parâmetros de calibração do método cromatográfico utilizado para determinação dos ácidos fenólicos.

**Figura 6** – Cromatograma dos compostos fenólicos da pimenta rosa



Foi possível identificar os seguintes compostos fenólicos presentes no extrato fenólico de pimenta rosa: ácido gálico (5,0 min), ácido protocateico (6,7 min), ácido hidroxibenzóico (9,4 min), ácido siríngico (12,2 min), ácido cumárico (17,9 min), ácido ferúlico (22,0 min) e vanilínico (13,8 min). Não foram identificados os ácidos cafeico (10,9 min) e clorogênico (8,17 min). Dentre os compostos fenólicos identificados, somente o ácido gálico e o ácido cumárico estiveram dentro dos limites de quantificação, sendo obtidos concentrações de 0,72 µg de ácido gálico/g de pimenta rosa e 4,44 µg de ácido cumárico/g de pimenta rosa.

A capacidade de sequestrar espécies reativas, como o radical hidroxila e o oxigênio singleto que os ácidos fenólicos possuem se deve ao anel aromático e os

substituintes ligados à sua estrutura. Os ácidos gálico, hidroxibenzóico, protocateico, vanílico e siríngico possuem sete átomos de carbono, fazem parte do grupo dos ácidos hidroxibenzóicos e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. Os ácidos cafeico, ferúlico e cumárico, os quais constituem o grupo dos ácidos hidroxicinâmicos possuem nove átomos de carbono, sendo os mais comumente encontrados no reino vegetal (BRAVO, 1998; MARINOVA; YANISHLIEVA, 2003; SOARES, 2002).

A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos aumenta com o aumento do grau de hidroxilação, ao passo que a substituição dos grupos hidroxila por grupos metoxila reduz a atividade. Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam maior atividade antioxidante que os ácidos hidroxibenzóicos possivelmente devido ao grupo  $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ , que garante maior habilidade de doar íons  $\text{H}^+$  e estabilizar radicais que o grupo  $\text{COOH}$  (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

A oxidação nos sistemas biológicos ocorre devido à ação dos radicais livres. Antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais e possuem ação tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SHAHIDI et al., 1992). Na indústria de alimentos, a oxidação lipídica é inibida por sequestradores de radicais livres. Entre os compostos mais utilizados estão: butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), tércio-butil-hidroxiquinona (TBHQ), tri-hidroxi-butilfenona (THBP) e propil galato (PG), porém existe a possibilidade destes antioxidantes apresentarem algum efeito tóxico (WÜRTZEN, 1990).

De acordo com Dziedzic e Hudson (1984) os ácidos protocatequínico, cafeico, ferúlico, gálico e sinápico possuem uma boa atividade antioxidante em sistemas lipídicos. Além disso, segundo Von Gadow et al. (1997), alguns deles como o cafeico e o protocatequínico apresentaram atividade antioxidante maior que o  $\alpha$ -tocoferol e o BHT. A presença destes ácidos fenólicos no extrato de pimenta rosa obtido indica que este possui forte potencial de atividade antioxidante para aplicação pela indústria de alimentos.

### **5.2.1 Atividade antioxidante do óleo essencial de orégano (OEO) e extrato fenólico de pimenta rosa (EFP)**

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante do OEO e do EFP pelos métodos de DPPH e inibição da oxidação catalisada enzimaticamente estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** – Atividade antioxidante do óleo essencial de orégano e do extrato fenólico de pimenta rosa pelos diferentes métodos utilizados

Método	% Inibição	
	OEO	EFP
DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	33,1 %	52,6 %
Inibição da oxidação catalisada enzimaticamente	63,7 %	66,9 %

O OEO e o EFP apresentaram maior % de inibição pelo método da inibição da oxidação catalisada enzimaticamente. A atividade antioxidante dos óleos essenciais e compostos fenólicos está relacionada com os componentes químicos presentes e com sua estabilidade. Não existe um método único que avalie satisfatoriamente a atividade antioxidante de uma amostra, pois depende da técnica de extração, tipo de amostra, dos componentes químicos presentes, além de parâmetros metodológicos, como tempo, temperatura, fatores interferentes, entre outros (BERTOLDI, 2006).

Devido aos diferentes fatores que podem influenciar na atividade antioxidante de um composto, é comum utilizarmos mais de uma técnica de avaliação da atividade antioxidante. A técnica do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) se baseia na redução do radical DPPH, sendo avaliada a capacidade do radical livre reagir com substâncias doadoras de hidrogênio (ALVES et al., 2010). Neste trabalho, o método da inibição da oxidação catalisada enzimaticamente se mostrou mais adequado para avaliação da atividade antioxidante dos compostos utilizados. Este método se baseia no efeito inibidor dos compostos fenólicos em sistemas enzimáticos, particularmente da peroxidase. A inibição da peroxidase se deve aos ácidos carboxílicos aromáticos, compostos inibidores que tem ação sobre os substratos, apresentarem estrutura química similar aos substratos fenólicos, e portanto, competem na ligação com a enzima (SANTOS, 2009).

Através dos dois métodos utilizados para determinar a atividade antioxidante, o EFP apresentou maior % de inibição em relação ao OEO. Vários estudos já comprovaram as propriedades antioxidantes do OEO (ARANGO et al., 2012; ASENSIO; GROSSO; JULIANI, 2015; CHUN et al., 2005; MORAIS et al., 2009). No entanto, os resultados obtidos indicam que o EFP também é um composto muito promissor para utilização no desenvolvimento de embalagens ativas para alimentos.

A concentração de compostos fenólicos no extrato foi de 12,03 mg de ácido gálico/g de pimenta rosa. Degáspari, Waszczynskij e Prado (2004) encontraram 685 µg de catequina/g de amostra para o extrato alcoólico de *Schinus terebenthifolius* Raddi. Quando

comparado a outros materiais da literatura considerados funcionais pelo conteúdo de fenóis, como bagaço de laranja (5,30 mg.g<sup>-1</sup>), berinjela (10,82 mg.g<sup>-1</sup>) e erva-mate (10,50 mg.g<sup>-1</sup>) (FURLONG et al., 2003), farelo de arroz (0,52 mg.g<sup>-1</sup>) e cebola (2,27 mg.g<sup>-1</sup>) (SOUZA et al., 2010) a pimenta rosa se mostrou promissora como fonte de compostos fenólicos.

### 5.3 Testes preliminares

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados dos testes preliminares das blendas empregando o amido com as proteínas do músculo (FAM) e com as proteínas da carne mecanicamente separada (FAR) de corvina na proporção 50/50.

**Tabela 5** – Propriedades dos filmes obtidos nos testes preliminares utilizando diferentes matérias-primas proteicas

Propriedades	FAM <sup>1</sup>	FAR <sup>2</sup>
Espessura (mm)	0,081 <sup>b</sup> ± 0,002	0,131 <sup>a</sup> ± 0,012
Resistência à tração (MPa)	8,08 <sup>a</sup> ± 0,11	2,31 <sup>b</sup> ± 0,34
Elongação (%)	53,1 <sup>a</sup> ± 1,20	14,4 <sup>b</sup> ± 1,01
Solubilidade (%)	26,2 <sup>b</sup> ± 1,67	36,0 <sup>a</sup> ± 0,29
Diferença total de cor (ΔE*)	5,44 <sup>b</sup> ± 0,12	27,29 <sup>a</sup> ± 1,32
Opacidade (%)	9,7 <sup>b</sup> ± 0,01	12,5 <sup>a</sup> ± 0,15

<sup>1</sup>FAM: Filme de amido e proteína de músculo; <sup>2</sup>FAR: Filme de amido e proteína da carne mecanicamente separada

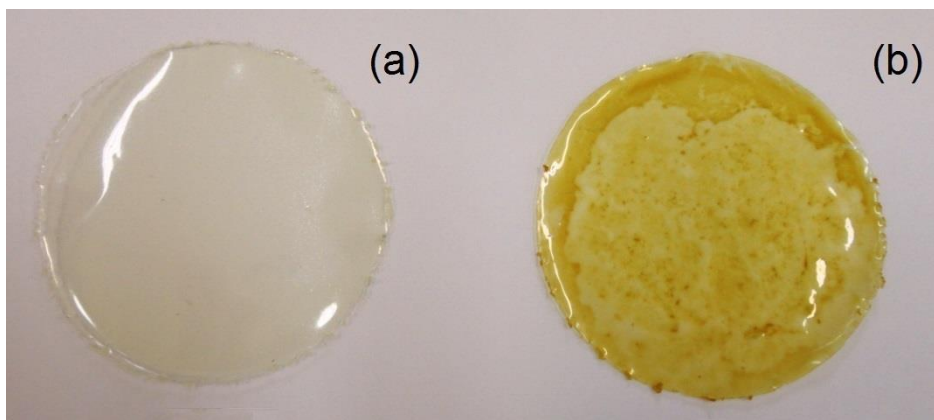
Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ )

Nos testes preliminares o filme FAM apresentou melhores características. Em relação as propriedades mecânicas, este apresentou maior resistência à tração (8,08 MPa) e maior elongação (53,1 %). De acordo com Gontard et al. (1994) os filmes devem suportar o estresse mecânico durante a aplicação, transporte e manuseio do produto para manter sua integridade e suas propriedades de barreira. Desta forma, os filmes em geral devem apresentar alta resistência à tração, enquanto a elongação vai depender da aplicação dos mesmos.

O filme FAM apresentou menor solubilidade em água (26,2 %). Visto que uma das funções das embalagens é proteger os alimentos, a solubilidade é uma propriedade importante. Esta indica o comportamento que a embalagem vai apresentar quando estiver em contato com a água e em diversas aplicações se faz necessário que a embalagem seja insolúvel para manter a integridade do produto.

As características de cor são de extrema importância visto que quando aplicados em alimentos são desejáveis filmes mais claros. O filme FAR apresentou valor de diferença total de cor (27,29) e opacidade (12,5 %) muito superiores ao outro filme. Através da Figura 7 pode-se perceber que os filmes elaborados foram visualmente diferentes. O filme FAM apresentou estrutura mais homogênea, enquanto que o filme FAR foi mais amarelado e também apresentou forte odor provavelmente devido a presença de sangue e lipídios no resíduo de pescado.

**Figura 7** – Filmes elaborados utilizando (a) proteínas do músculo com amido (FAM) e (b) proteínas da carne mecanicamente separada com o amido (FAR)



Zavareze et al. (2013) ao elaborarem filmes de proteínas do músculo e resíduo de corvina obtiveram características semelhantes. Estes autores observaram que ao utilizar as proteínas do músculo de pescado os filmes foram menos solúveis, menos opacos e com menor diferença total de cor. Com relação às propriedades mecânicas, estes autores também obtiveram filmes mais resistentes ao utilizar as proteínas do músculo. A maior alongação foi ao empregar as proteínas de resíduo, comportamento diferente do presente trabalho possivelmente devido a utilização de amido juntamente com as proteínas.

De acordo com Zavareze et al. (2013) o resíduo de pescado possui cerca de 11,6 % de proteínas e 2,8 % de lipídios, enquanto que o músculo possui em torno de 16,5 % de proteínas e 0,5 % de lipídios. Da mesma forma que a matéria-prima, após o processo de extração das proteínas, maior concentração de lipídios e menor conteúdo proteico é obtido no isolado de resíduo, o que pode justificar a diferença obtida nas propriedades dos filmes elaborados. Devido as melhores características dos filmes desenvolvidos com as proteínas do músculo de pescado, estas foram utilizadas para o desenvolvimento do trabalho.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos nos testes utilizando diferentes concentrações totais de sólidos (3 e 4 %).

**Tabela 6** – Propriedades dos filmes obtidos nos testes preliminares utilizando diferentes concentrações totais de sólidos

Propriedades	Concentração Total de Sólidos	
	3 %	4 %
Espessura (mm)	0,081 <sup>b</sup> ± 0,002	0,095 <sup>a</sup> ± 0,047
Resistência à tração (MPa)	8,08 <sup>a</sup> ± 0,11	7,66 <sup>a</sup> ± 0,44
Elongação (%)	53,1 <sup>a</sup> ± 3,81	23,2 <sup>b</sup> ± 1,20
Solubilidade (%)	26,2 <sup>a</sup> ± 1,47	22,6 <sup>a</sup> ± 1,50
Diferença total de cor ( $\Delta E^*$ )	5,44 <sup>b</sup> ± 0,12	6,70 <sup>a</sup> ± 0,04
Opacidade (%)	9,7 <sup>a</sup> ± 0,01	9,8 <sup>a</sup> ± 0,15

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ )

Ao se utilizar maior concentração de sólidos se obteve maior espessura (Tabela 6), mesmo controlando a quantidade de solução filmogênica colocada nas placas de Petri. De acordo com García et al. (2009) a espessura depende da composição e dos parâmetros de processo utilizados. Uma maior concentração de amido/proteína aumenta a quantidade de sólidos na matriz polimérica formada após a secagem da solução filmogênica, o que aumenta a espessura dos filmes.

Em geral, ao aumentar a quantidade de sólidos também se aumenta a resistência à tração, o que não foi observado, pois os valores obtidos foram semelhantes para as duas concentrações utilizadas. Já a elongação está inversamente relacionada com a espessura e foi superior ao utilizar 3 % de sólidos. Com relação a solubilidade, esta foi superior ao empregar 3 % de amido/proteína. Segundo Turhan e Sahbaz (2004) a solubilidade de um material hidrofílico está relacionada com a difusão e penetração da água e consequentemente o inchamento e relaxamento do polímero, então menores taxas de dissolução do material de estudo indicam uma maior coesão da matriz. A opacidade dos filmes foi semelhante, porém houve um aumento no  $\Delta E^*$  ao utilizar 4 % de amido/proteína.

A concentração total de sólidos de 3 % foi escolhida para elaboração do trabalho, pois apresentou elongação superior e  $\Delta E^*$  inferior, além de resistência à tração, solubilidade e opacidade estatisticamente iguais ( $p \geq 0,05$ ) a formulação com 4 % de sólidos.

## 5.4 Caracterização das blendas

Na Figura 8 está apresentada a imagem da blenda utilizando 50/50 de amido/proteína e 3,18 % de OEO (Ensaio 7). As blendas apresentaram estrutura visualmente uniforme. Além disso, as blendas obtidas foram de fácil remoção das placas e de fácil manuseio durante a realização das análises. Entretanto, observou-se que estas foram muito influenciadas pelas condições ambientais, principalmente pela umidade relativa devido ao comportamento hidrofílico dos biopolímeros utilizados. De acordo com Kim e Ustunol (2001) e Cho e Rhee (2002) o amido e proteínas contêm grupos polares que formam pontes de hidrogênio absorvendo com facilidade a água do ambiente, o que afeta significativamente as propriedades físicas e de barreira dos filmes.

**Figura 8** – Blenda de amido e proteína na proporção 50/50 adicionada de 3,18 % de óleo essencial de orégano (Ensaio 7)



### 5.4.1 Planejamento experimental utilizando óleo essencial de orégano (OEO)

Na Tabela 7 está apresentada a planilha do planejamento experimental utilizado e os resultados obtidos para as diferentes respostas. As variáveis independentes estudadas não foram significativas ( $p \geq 0,05$ ) para as respostas espessura e opacidade. Para resistência à tração, alongação e diferença total de cor os modelos obtidos não foram preditivos e significativos, sendo obtidos valores de coeficiente de correlação (R) de 0,74, 0,75 e 0,78, respectivamente. A solubilidade e a permeabilidade ao vapor d'água geraram modelos



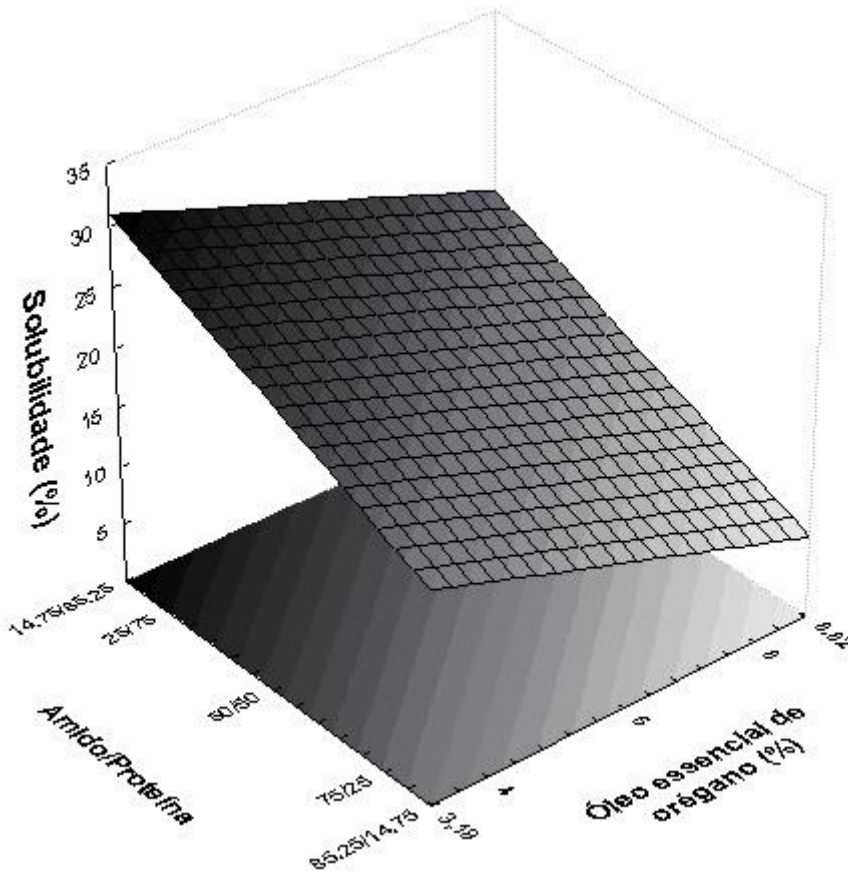
significativos e preditivos e as superfícies de resposta obtidas estão apresentadas nas Figuras 9 e 10. No Apêndice 2 estão apresentados os coeficientes de regressão, as equações dos modelos e a análise de variância (ANOVA) para as respostas estudadas.

A Equação 8 descreve a solubilidade dos filmes prevista pelo modelo em função das variáveis estudadas e contém apenas os termos significativos.

$$\text{Solubilidade} = 62,36 + 13,37 \text{ AM/PROT} + 9,51 \text{ OEO} \quad (8)$$

Menor solubilidade foi obtida ao utilizar maiores concentrações de OEO e maior concentração de amido (Figura 9). Segundo Aguirre, Borneo e León (2013) a solubilidade dos filmes está diretamente relacionada com a estrutura dos biopolímeros utilizados e a presença de outros componentes presentes na matriz, como o óleo essencial.

**Figura 9** – Superfície de resposta da solubilidade dos filmes em função da concentração de óleo essencial de orégano e da proporção amido/proteína



**Tabela 7** – Planejamento experimental e resultados obtidos na caracterização das blendas adicionadas de óleo essencial de orégano

Ensaio	Variáveis independentes			Propriedades das blendas					
	Amido/Proteína	OEO (%)	ESP (mm)	RT (MPa)	E (%)	SOL (%)	PVA (g.mm/m <sup>2</sup> .h.kPa)	ΔE*	OP (%)
1	-1 (25/75)	-1 (4)	0,072 ± 0,001	6,70 ± 0,31	83,5 ± 9,65	29,4 ± 0,31	0,26 ± 0,00	6,46 ± 0,02	9,3 ± 0,20
2	1 (75/25)	-1 (4)	0,073 ± 0,001	3,46 ± 0,22	65,0 ± 0,95	14,9 ± 1,20	0,25 ± 0,01	5,55 ± 0,25	9,3 ± 0,03
3	-1 (25/75)	1 (8)	0,074 ± 0,001	6,79 ± 0,22	108,8 ± 1,24	22,6 ± 0,39	0,21 ± 0,00	3,99 ± 0,03	9,8 ± 0,12
4	1 (75/25)	1 (8)	0,070 ± 0,001	3,92 ± 0,06	138,0 ± 9,94	16,7 ± 0,50	0,18 ± 0,00	3,91 ± 0,02	9,7 ± 0,32
5	-1,41 (14,75/85,25)	0 (6)	0,075 ± 0,002	11,65 ± 0,17	49,3 ± 7,62	25,7 ± 0,47	0,34 ± 0,02	6,6 ± 0,04	9,8 ± 0,09
6	1,41 (85,25/14,75)	0 (6)	0,074 ± 0,000	6,32 ± 0,20	55,2 ± 3,89	14,0 ± 0,90	0,29 ± 0,02	3,30 ± 0,04	9,4 ± 0,01
7	0 (50/50)	-1,41 (3,18)	0,073 ± 0,004	9,38 ± 0,29	65,6 ± 2,33	26,6 ± 0,28	0,23 ± 0,02	4,95 ± 0,16	9,7 ± 0,05
8	0 (50/50)	1,41(8,82)	0,074 ± 0,004	5,69 ± 0,07	85,5 ± 2,07	8,0 ± 1,11	0,18 ± 0,00	5,05 ± 0,07	9,6 ± 0,24
9	0 (50/50)	0 (6)	0,070 ± 0,001	6,99 ± 0,46	62,2 ± 1,17	17,5 ± 0,68	0,21 ± 0,00	4,69 ± 0,01	9,5 ± 0,10
10	0 (50/50)	0 (6)	0,072 ± 0,001	7,45 ± 0,34	61,2 ± 3,66	17,8 ± 1,13	0,19 ± 0,01	4,74 ± 0,08	10,5 ± 0,35
11	0 (50/50)	0 (6)	0,074 ± 0,001	8,27 ± 0,73	64,1 ± 3,02	15,4 ± 0,22	0,21 ± 0,00	4,71 ± 0,12	9,5 ± 0,21

ESP: Espessura; RT: Resistência à tração; E: Elongação; SOL: Solubilidade em água; PVA: Permeabilidade ao vapor d'água; ΔE\*: Diferença total de cor; OP: Opacidade

A diminuição da solubilidade se deve ao comportamento hidrofóbico que o óleo essencial possui. Este comportamento sugere que o OEO ficou uniformemente distribuído pela matriz da blenda, o que é benéfico quando a integridade do produto e resistência a água são desejadas. Maior solubilidade em água é vantajosa em situações onde o filme irá ser consumido juntamente com o produto, por exemplo, no caso de produtos que serão aquecidos previamente ao consumo. Além disso, é um fator importante em relação a biodegradabilidade quando utilizado como embalagem (BOURTOOM; CHINNAN, 2008). Comportamento semelhante foi observado por Ghasemlou et al. (2013) e Ojagh et al. (2010) ao utilizar óleos essenciais de *Zataria multiflora* Boiss e *Mentha pulegium* em filmes de amido de milho e óleo essencial de canela em filmes de quitosana, respectivamente.

De acordo com a superfície de resposta, ao elaborar as blends com maior concentração de proteínas se obteve maior solubilidade. Este comportamento não está de acordo com a literatura (CHINMA; ARIAHU; ABU, 2012; GUERRERO et al., 2013; SUN; SUN; XIONG, 2013), porém, as matérias-primas utilizadas pelos autores são diferentes do presente trabalho. Ao utilizar maior concentração de proteínas se espera menor solubilidade, devido a maior densidade de interações e a presença de ligações dissulfeto como resultado do tratamento térmico das proteínas (MCHUGH et al., 1993; MCHUGH; KROCHTA, 1994).

A Equação 9 descreve a permeabilidade ao vapor d'água dos filmes prevista pelo modelo em função das variáveis estudadas e contem apenas os termos significativos.

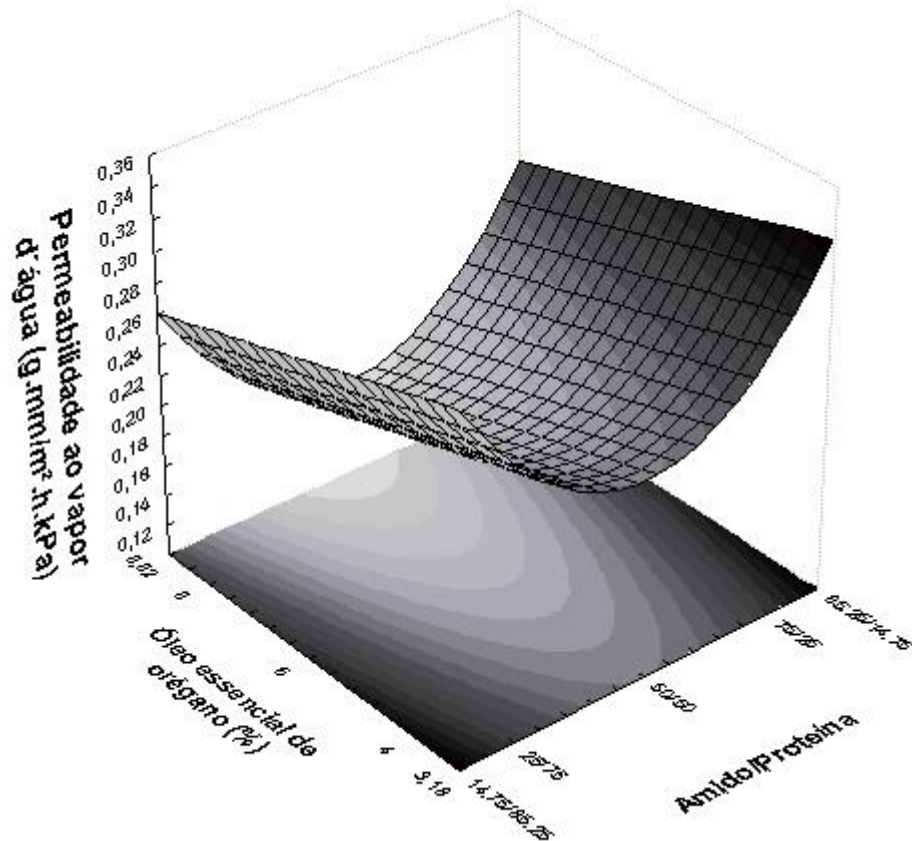
$$\text{Permeabilidade} = 0,19 + 0,04 \text{ AM/PROT}^2 - 0,02 \text{ OEO} \quad (9)$$

Conforme apresentado na Figura 10, ao se utilizar maiores concentrações de óleo essencial houve diminuição na permeabilidade ao vapor d'água. Este comportamento também se deve a utilização do OEO diminuir a hidrofobicidade das blends. De acordo com Garcia, Martino e Zaritzky (2000) vários fatores, como a mobilidade das cadeias poliméricas e as interações específicas entre os grupos funcionais dos polímeros utilizados influenciam na permeabilidade dos filmes. Shojaee-Aliabadi et al. (2013) obtiveram este comportamento ao utilizar óleo essencial de *Satureja hortensis* em diferentes concentrações em filmes de carragena. Peng e Li (2014) também relataram que há diminuição na permeabilidade ao vapor d'água ao combinar os óleos essenciais de limão, tomilho e canela em filmes de quitosana.

Com relação a proporção amido/proteína, observa-se que menores permeabilidades foram obtidas na proporção 50/50. Chinma, Ariahu e Abu (2012) elaboraram blends de amido de mandioca e proteína de soja variando as proporções de 100/0 até 50/50 e

observaram que blendas com maiores concentrações de proteínas possuem menores permeabilidades. Estes autores atribuem este comportamento ao aumento da interação do amido e proteína resultando em uma matriz densa e com pequeno volume livre, inibindo a penetração da água na blenda.

**Figura 10** – Superfície de resposta da permeabilidade ao vapor d'água dos filmes em função da concentração de óleo essencial de orégano e da proporção amido/proteína



As propriedades de permeabilidade dos materiais poliméricos são importantes, pois estes podem ser utilizados na embalagem ou recobrimento para proteger alimentos contra o vapor de água e gases. A água pode aumentar a velocidade de várias reações (escurecimento, oxidação lipídica, degradação de vitaminas e atividade enzimática), aumentar a taxa de crescimento microbiano e causar mudança na textura, todos relacionados com a vida útil e qualidade dos alimentos. Em geral, menores taxas de permeabilidade ao vapor d'água são desejáveis ao se tratar de embalagens para alimentos (BOURTOOM, 2008).

Embora as proporções de amido/proteína e a concentração de óleo essencial tenham sido variadas houve pequena variação em relação a espessura das blendas, pois esta

característica foi controlada através da quantidade de solução filmogênica colocada nas placas de Petri, visto que influencia as demais propriedades dos filmes.

As propriedades mecânicas das blendas foram influenciadas pelas variáveis estudadas. A resistência à tração expressa a tensão máxima suportada pelo filme durante o ensaio de tração e fornece uma medida da sua integridade. Geralmente são necessárias maiores resistências para que o filme seja aplicado como embalagem de alimentos, mas também depende da aplicação a que se destina (BOURTOOM; CHINNAN, 2008). Quando utilizada maior quantidade de proteína e a mesma concentração de OEO foi obtida maior resistência à tração, conforme se pode observar ao comparar os Ensaio 1 e 2 e os Ensaio 3 e 4. Gounga, Xu e Zang (2007) explicaram que quando há maior concentração de proteínas na solução filmogênica ocorre maior agregação destas macromoléculas, o que aumenta a resistência. Chinma, Ariahu e Abu (2012) obtiveram o mesmo comportamento ao elaborar blendas de amido de mandioca e concentrado proteico de soja.

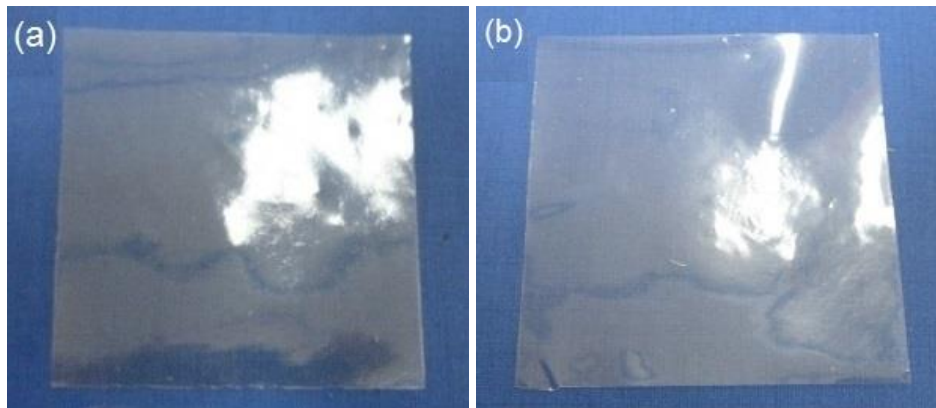
A adição de óleo essencial teve maior influência na alongação dos filmes. Quando comparada a adição de 4 e 8 % de óleo essencial para uma mesma proporção de amido/proteína verifica-se que maior concentração de OEO provoca considerável aumento na alongação. Aguirre, Borneo e León (2013) empregaram óleo essencial de orégano em filmes de proteínas de triticale e também observaram que o aumento na concentração de óleo essencial aumenta a alongação. Estes autores explicaram que a presença de OEO na matriz pode interferir nas interações entre os biopolímeros utilizados, reduzindo as forças intermoleculares ao longo das cadeias do polímero aumentando sua mobilidade e melhorando a flexibilidade, o que indica que o OEO atua como plastificante aumentando a alongação. Tongnuanchan, Benjakul e Prodpran (2013) também obtiveram comportamento semelhante ao elaborar filmes de gelatina de peixe incorporados com óleos essenciais de gengibre e açafrão em diferentes concentrações.

A cor e opacidade dos filmes são indicadores importantes em termos de aparência geral e aceitação do consumidor. As diferentes concentrações de OEO e as proporções de amido/proteína utilizadas não influenciaram na opacidade (Tabela 7). Com o aumento da concentração de OEO era esperado um aumento na opacidade. Ao contrário, ao incorporar óleos essenciais de *Zataria multiflora* Boiss e *Mentha pulegium* em filmes de amido de soja Salarbashi et al. (2014) observaram aumento na opacidade, pois ao adicionar óleos essenciais há aumento na reflectância difusa provocada pela dispersão da luz nas gotículas lipídicas.

O  $\Delta E^*$  foi influenciado pelas quantidades de amido e proteínas utilizadas conforme pode ser identificado nos Ensaio 5 e 6. Este comportamento é principalmente

devido a diminuição da luminosidade (L), quando maior quantidade de proteína foi utilizada, o que indica que os filmes possuem cor mais escura, e também devido ao aumento na coordenada de cromaticidade  $b^*$  (amarelo) e coordenada de cromaticidade  $a^*$  (vermelho), indicando que os filmes são mais amarelados. Na Figura 11 são apresentadas as blendas dos Ensaio 5 e 6.

**Figura 11** – Filmes elaborados com: (a) 14,75/85,25 de amido/proteína e 6 % de óleo essencial de orégano (Ensaio 5) e (b) 85,25 /14,75 de amido/proteína e 6 % de óleo essencial de orégano (Ensaio 6)



A diferença total de cor também foi influenciada pelas concentrações de OEO utilizadas. De acordo com Du et al. (2009) a cor dos filmes é influenciada pelo tipo e pela concentração dos óleos essenciais adicionados. Vários estudos (PENG; LI, 2014; SALARBASHI et al., 2014; SHOJAEE-ALIABADI et al., 2013; TONGNUANCHAN; BENJAKUL; PRODPRAN, 2013) reportaram aumento no  $\Delta E^*$  ao empregar maiores concentrações de óleos essenciais. Isso se deve aos filmes apresentarem menor luminosidade e conseqüentemente maior  $\Delta E^*$  devido ao amarelo natural destes (ATARÉS; BONILLA; CHIRALT, 2010), o que não foi observado no presente trabalho.

Com base nos resultados obtidos na caracterização das blendas, o Ensaio 8 (proporção de 50/50 de amido/proteína e 8,82 % de OEO) deste planejamento foi selecionado para a determinação da atividade antioxidante e das características morfológicas, químicas e térmicas, pois apresentou a menor solubilidade (8,0 %), permeabilidade ao vapor d'água (0,18 g.mm/m<sup>2</sup>.h.kPa) e boas propriedades mecânicas, com resistência à tração de 5,96 MPa e alongação de 85,5 %.

#### **5.4.1.2 Potencial antioxidante da blenda com OEO**

A blenda adicionada de óleo essencial na concentração de 8,82 % apresentou inibição de 4,2 % quando determinado pelo método de DPPH e 63,1 % quando determinado pelo método da inibição da oxidação catalisada enzimaticamente. Da mesma forma como observado ao avaliar o óleo essencial de orégano, a maior atividade antioxidante foi obtida pelo método enzimático, o que sugere que as blends elaboradas empregando OEO possuem potencial promissor na preservação de alimentos em que o escurecimento enzimático é indesejável, como frutas e vegetais.

O escurecimento enzimático é uma reação importante em vegetais, sendo que mais de 50 % das perdas em frutas e hortaliças ocorrem como resultado deste processo. O escurecimento enzimático de vegetais inicia-se em resposta a injúrias físicas e fisiológicas, como impactos e abrasões. As lesões provocadas durante o processamento mínimo também levam ao colapso celular e à consequente descompartimentação dessas células, promovendo o contato dos compostos fenólicos com enzimas associadas ao escurecimento (PORTE; MAIA, 2001; SILVA; ROSA; VILAS BOAS, 2009). Além disso, no tecido vegetal intacto de frutas e hortaliças também pode ocorrer escurecimento. Duas enzimas são relevantes na produção de compostos de coloração marrom, a polifenoloxidase e a peroxidase (TOMÁS-BARBERÁN; SPÍN, 2001) e a blenda elaborada demonstrou ser potencialmente promissora na inibição da formação destes compostos.

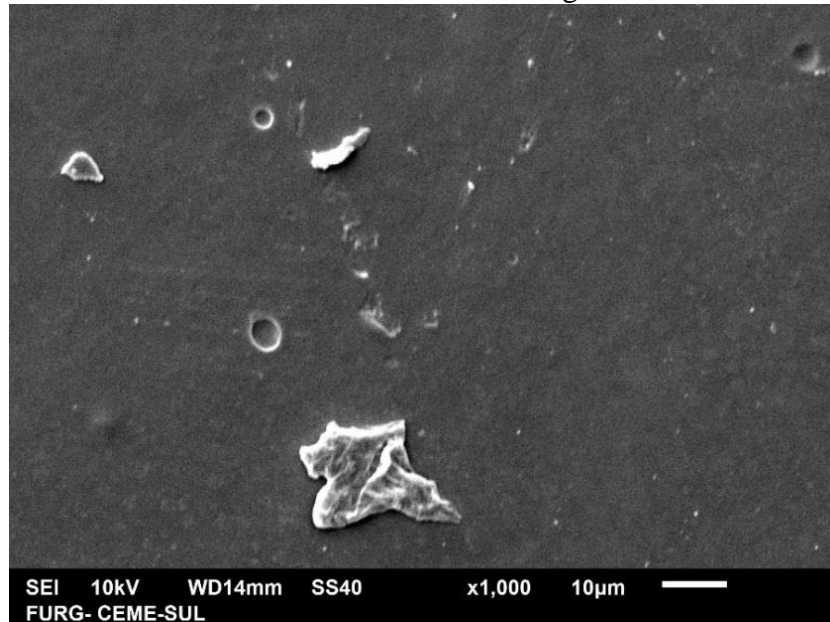
Jouki et al. (2014) obtiveram aproximadamente 60 % de sequestro do radical DPPH ao incorporar 2 % de óleo essencial de orégano em matrizes de mucilagem das sementes de marmelo. No presente estudo foi utilizada concentração superior de OEO e se obteve 4,2 % de inibição através do método de DPPH. Segundo Tongnuanchan, Benjakul e Prodpran (2013) isso pode ser explicado pelas interações que ocorrem entre os componentes dos óleos essenciais e as diferentes matrizes de polímeros, o que pode diminuir a liberação dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante. Além disso, também pode justificar a diminuição do potencial antioxidante do óleo essencial quando incorporado nos filmes.

#### **5.4.1.3 Propriedades estruturais da blenda com OEO**

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada para analisar a microestrutura das blends. Esta análise pode fornecer um melhor entendimento acerca das relações da

permeabilidade ao vapor d'água, propriedades óticas e mecânicas com a estrutura dos filmes. A imagem do Ensaio 8 (OEO) está apresentada na Figura 12.

**Figura 12** – Morfologia da superfície da blenda composta por 50/50 de amido/proteína e 8,82 % de óleo essencial de orégano



A imagem da MEV mostra que a estrutura da superfície da blenda é homogênea e sem rugosidades, o que indica que os biopolímeros e demais constituintes utilizados são compatíveis, sendo responsáveis por melhores propriedades mecânicas e de barreira, pois de acordo com Sobral et al. (2001) a homogeneidade pode estar relacionada a melhor compatibilidade entre as substâncias que compõem o filme.

Embora tenha se formado uma matriz coesa e sem a presença de fissuras, observa-se a presença de materiais não solubilizados e bolhas estouradas durante a produção dos filmes. Através da imagem obtida também se observa que o OEO foi homogeneizado de forma adequada. Shojaee-Aliabadi (2013) verificaram que adicionar óleo essencial de *Satureja hortensis* levou a formação de uma estrutura heterogênea nos filmes de carragena. Tongnuanchan, Benjakul e Prodpan (2013) adicionaram óleos essenciais de raízes em filmes de gelatina de peixe e observaram aumento na rugosidade e formação de uma matriz heterogênea em relação aos filmes sem adição de óleos essenciais. Ao contrário de Salarbashi et al. (2013) que não visualizaram diferenças ao incorporar óleos essenciais de *Zataria multiflora* Boiss e *Mentha pulegium* em filmes de amido de soja.

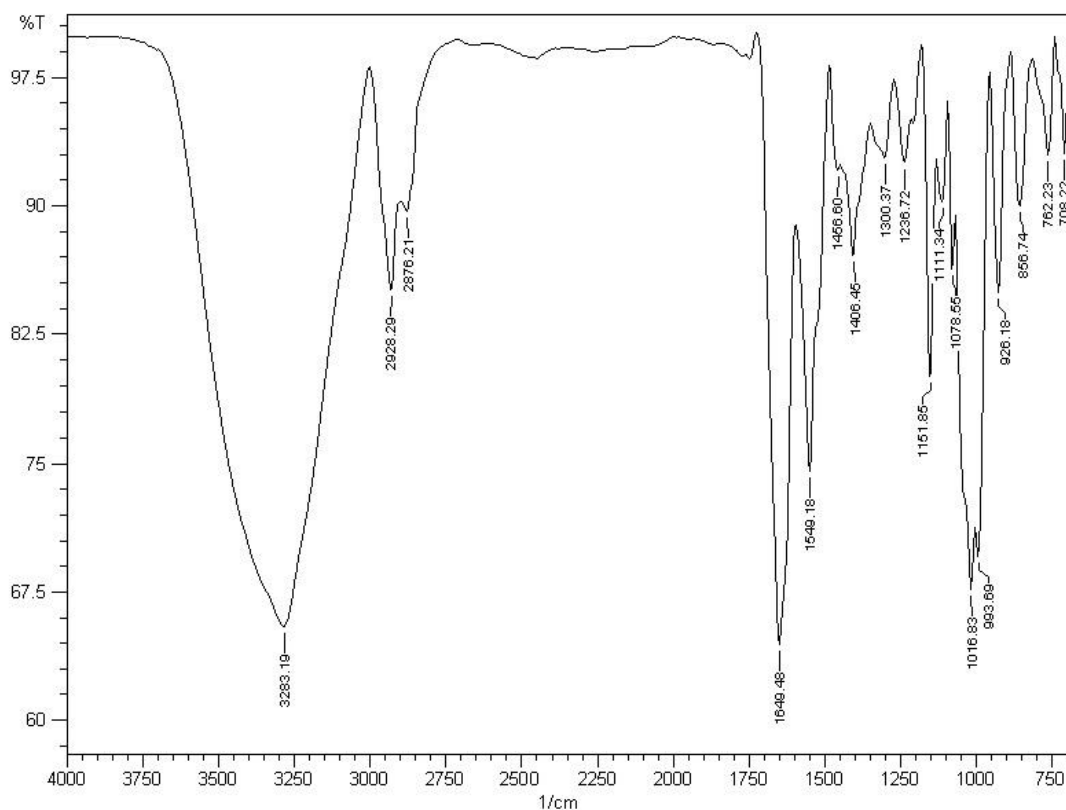
Ferreira (2008) ao elaborar filmes de proteínas de soro de leite e quitosana verificou que ocorre a separação de fases, provocando perdas nas propriedades das blends.



Vicentino, Floriano e Dragunski (2011) observaram que o amido e a gelatina utilizados na elaboração dos filmes não tiveram boa interação e apresentaram rugosidades, o que não é desejável devido estar relacionado com as propriedades dos filmes.

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para verificar as interações entre os constituintes das blends elaboradas. A Figura 13 apresenta o resultado obtido para o Ensaio 8 (OEO).

**Figura 13** – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier para a blend constituída de 50/50 de amido/proteína e 8,82 % de óleo essencial de orégano



A banda mais forte e mais larga foi entre 3500 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  que representa as hidroxilas das moléculas. Esta banda pode ser atribuída a formação de pontes de hidrogênio inter e intramoleculares (PINOTTI et al., 2007) e indica que há um forte potencial de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas do amido e o grupamento amina das proteínas. A amida A também é observada nesta banda e corresponde a vibração do estiramento N-H. O espectro de infravermelho obtido mostra várias bandas de amida, que representam a vibração das unidades peptídicas. De acordo com Karnnet, Potiyaraj e Pimpan (2005) a banda situada na região de 2900  $\text{cm}^{-1}$  é característica da amida B e representa o estiramento C-H e  $\text{NH}_3^+$ . Neste espectro também nota-se a banda relacionada com o estiramento C=O em torno de 1600  $\text{cm}^{-1}$ ,

que corresponde a amida I. A banda em  $1549,19\text{ cm}^{-1}$  é correspondente a amida II (N-H) e a banda  $1236,72\text{ cm}^{-1}$  corresponde a amida III e representa as vibrações do estiramento C-N acoplado ao dobramento N-H. No espectro obtido são visualizadas bandas semelhantes as de Guerrero et al. (2013), que elaboraram blendas de isolado proteico de soja e ágar utilizando glicerol como plastificante.

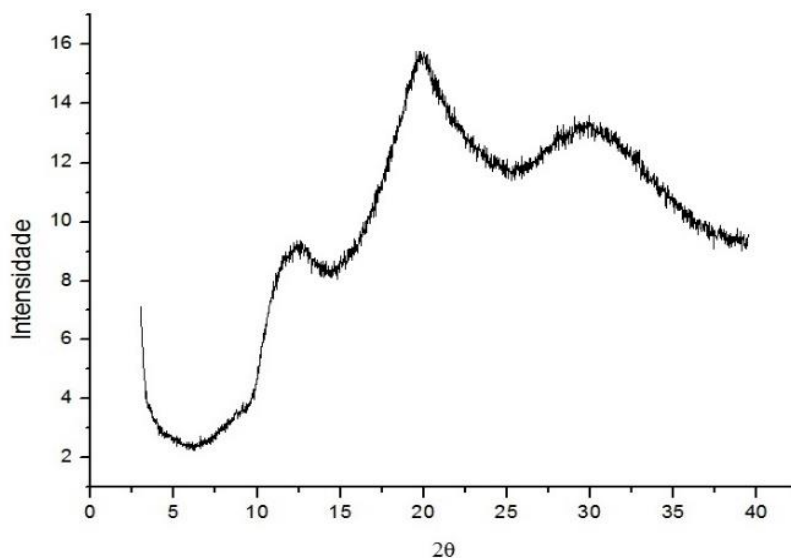
A banda próxima de  $1000\text{ cm}^{-1}$  pode estar relacionado com as interações entre a estrutura do filme e grupamento OH principalmente do glicerol que foi adicionado como plastificante (BERGO; SOBRAL, 2007). As bandas localizadas na região entre  $1500$  e  $1350\text{ cm}^{-1}$  representam as ligações C=C, presentes principalmente em compostos aromáticos, podendo indicar grupos funcionais presentes no óleo essencial ou também caracterizando ligações covalentes na matriz polimérica.

Tongnuanchan, Benjakul e Prodpran (2013) estudaram o efeito da adição de óleos essenciais em filmes de gelatina de pescado e relataram que há um deslocamento na amplitude dos picos obtidos. Estes autores explicam que o aumento nos picos na região de  $2800$  e  $2900\text{ cm}^{-1}$  se deve a vibração C-H dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  presentes nos lipídios e está de acordo com a diminuição da amplitude do pico relacionado a amida A, o que reflete na diminuição da resistência à tração e aumento da alongação dos filmes.

Os principais grupamentos químicos presentes nos óleos essenciais são aldeído, cetona e éster, o que pode justificar o aumento na amplitude do pico em torno de  $1700\text{ cm}^{-1}$ , referente a C=O e correspondente a vibração dos grupamentos aldeído e ésteres. De acordo com Aewsiri et al. (2011) a existência de picos nos comprimentos de onda em torno  $2900$ ,  $2800$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$  evidenciam o comportamento hidrofóbico observado ao adicionar óleo essencial nos filmes e está de acordo com a diminuição da permeabilidade ao vapor d'água e solubilidade.

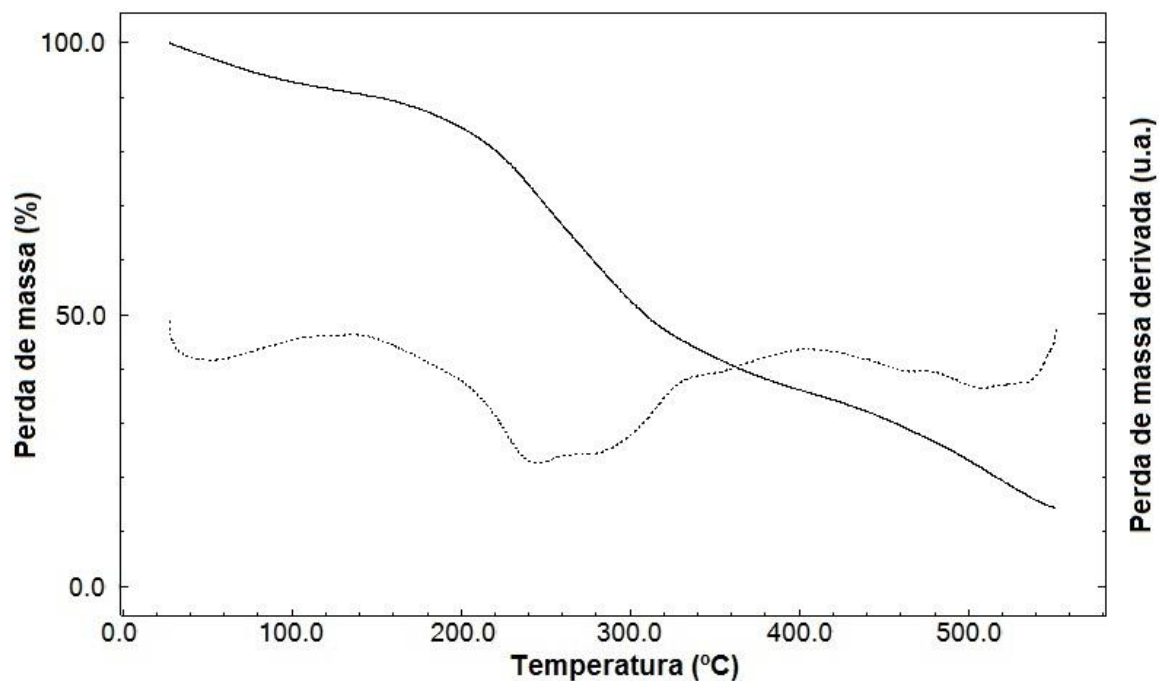
A análise de difração de raios X foi utilizada para identificar as fases cristalinas e conteúdo amorfo dos filmes elaborados. A Figura 14 apresenta o difratograma para o Ensaio 8 (OEO). Foram obtidos picos em  $12,5^\circ$ , próximo a  $20^\circ$  e a  $30^\circ$ , que se referem ao tipo de estrutura cristalina denominada tipo V e é decorrente da cristalização da amilose. Após o aquecimento, na etapa de resfriamento, a amilose forma hélices envolvendo outros constituintes da matriz polimérica, como as proteínas, lipídios ou plastificante. Estes complexos V são responsáveis pela formação de materiais insolúveis quando blendas de amido com outros polímeros são elaboradas (CORRADINI et al., 2007), o que pode justificar a menor solubilidade obtida ao utilizar maior concentração de amido no desenvolvimento das blendas.

**Figura 14** – Difratoograma de raios X da blenda constituída de 50/50 de amido/proteína e 8,82 % de óleo essencial de orégano



A análise de termogravimetria foi realizada para avaliar as características de degradação térmica das blendas elaboradas. O resultado obtido para o Ensaio 8 (OEO) está apresentado na Figura 15.

**Figura 15** – Termograma da blenda constituída de 50/50 de amido/proteína e 8,82 % de óleo essencial de orégano



— Curva Termogravimétrica (TG) ..... Curva Termogravimétrica Derivada (DTG)

De acordo com Wilhelm et al. (2003) a decomposição térmica ocorre em três estágios: o primeiro estágio é devido a perda de água, enquanto que o segundo estágio é a fase de decomposição de amido, glicerol e proteínas e o terceiro estágio corresponde a oxidação do amido parcialmente decomposto.

A degradação inicial começou a ocorrer entre 50 a 150 °C e se deve a presença da água que está ligada por pontes de hidrogênio a compostos hidrofílicos como o amido e algumas das cadeias de proteínas. O segundo estágio de degradação da blenda foi entre 172,8 e 364,06 °C, ocorrendo uma perda de massa de 47,9 % nesta faixa de temperatura, e a máxima degradação ocorreu em 245,52 °C. Kadam et al. (2013) explicaram que este segundo estágio é provavelmente devido a degradação das proteínas e a perda do glicerol do filme. Nesta faixa, em torno de 200 °C possivelmente também ocorre a despolimerização da amilose, o que caracteriza o início de degradação térmica do amido (BHAT et al., 2013).

Com relação a adição de óleo essencial de orégano, este pode ter sido responsável pela diminuição da temperatura de degradação térmica da blenda. Tongnuanchan, Benjakul e Prodpran (2013) verificaram este efeito ao adicionar óleos essenciais de raízes em filmes de gelatina e explicaram que possivelmente ocorre devido ao óleo reduzir as interações entre as cadeias poliméricas e gerar uma matriz descontínua.

A perda de massa total foi de 84,1 %, sendo que o restante se deve a presença de substâncias residuais após a degradação térmica da amostra. Mariani et al. (2009) também observaram compostos residuais ao avaliar a degradação térmica de blendas de amido de milho e poli( $\epsilon$ -caprolactona) e atribuem isso a presença de compostos inorgânicos.

#### **5.4.2 Planejamento experimental utilizando extrato fenólico de pimenta rosa (EFP)**

Na Tabela 8 está apresentada a planilha do planejamento experimental utilizado e os resultados obtidos para as diferentes respostas. As variáveis independentes estudadas para as respostas espessura, resistência à tração, opacidade e permeabilidade não foram significativas ( $p \geq 0,05$ ), provavelmente devido ao comportamento hidrofílico dos biopolímeros utilizados, o que influencia as propriedades dos filmes. Para a solubilidade o modelo obtido não foi preditivo e significativo, sendo obtido valor de coeficiente de correlação (R) de 0,73. A elongação e a diferença total de cor geraram modelos significativos e preditivos e as superfícies de resposta obtidas estão apresentadas nas Figuras 16 e 17. No Apêndice 3 estão apresentados os coeficientes de regressão, as equações dos modelos e a análise de variância (ANOVA) para as respostas estudadas.

**Tabela 8** – Planejamento experimental e resultados obtidos na caracterização das blendas adicionadas de extrato fenólico de pimenta rosa

Ensaio	Variáveis independentes			Propriedades das blendas					
	Amido/Proteína	EFP (%)	ESP (mm)	RT (MPa)	E (%)	SOL (%)	PVA (g.mm/m <sup>2</sup> .h.kPa)	ΔE*	OP (%)
1	-1 (25/75)	-1 (4)	0,077 ± 0,001	6,38 ± 0,25	91,2 ± 1,02	21,3 ± 3,60	0,26 ± 0,00	6,48 ± 0,12	9,6 ± 0,09
2	1 (75/25)	-1 (4)	0,079 ± 0,003	8,49 ± 0,15	55,2 ± 7,67	16,3 ± 0,14	0,19 ± 0,00	3,32 ± 0,14	9,4 ± 0,08
3	-1 (25/75)	1 (8)	0,078 ± 0,001	7,70 ± 0,44	124,4 ± 12,44	26,4 ± 0,45	0,21 ± 0,00	6,38 ± 0,07	8,8 ± 0,15
4	1 (75/25)	1 (8)	0,077 ± 0,001	8,66 ± 0,46	68,2 ± 4,90	18,8 ± 0,63	0,21 ± 0,00	3,41 ± 0,05	9,6 ± 0,19
5	-1,41 (14,75/85,25)	0 (6)	0,080 ± 0,003	6,50 ± 0,27	173,3 ± 5,05	19,5 ± 0,23	0,19 ± 0,01	6,42 ± 0,15	9,1 ± 0,01
6	1,41 (85,25/14,75)	0 (6)	0,078 ± 0,001	2,10 ± 0,10	101,7 ± 4,79	20,7 ± 0,96	0,22 ± 0,01	2,66 ± 0,20	9,5 ± 0,27
7	0 (50/50)	-1,41 (3,18)	0,081 ± 0,001	5,58 ± 0,26	96,6 ± 9,09	18,0 ± 1,21	0,17 ± 0,00	4,46 ± 0,09	9,5 ± 0,05
8	0 (50/50)	1,41 (8,82)	0,077 ± 0,002	5,62 ± 0,23	112,1 ± 1,81	21,6 ± 0,32	0,14 ± 0,01	4,59 ± 0,14	9,3 ± 0,02
9	0 (50/50)	0 (6)	0,078 ± 0,001	5,41 ± 0,13	74,1 ± 6,21	19,6 ± 0,55	0,19 ± 0,01	4,91 ± 0,03	10,5 ± 0,24
10	0 (50/50)	0 (6)	0,078 ± 0,001	6,24 ± 0,22	79,6 ± 2,33	21,0 ± 0,69	0,17 ± 0,00	4,92 ± 0,06	9,2 ± 0,06
11	0 (50/50)	0 (6)	0,078 ± 0,001	5,23 ± 0,34	83,7 ± 3,66	19,4 ± 1,02	0,19 ± 0,01	4,32 ± 0,09	10,0 ± 0,13

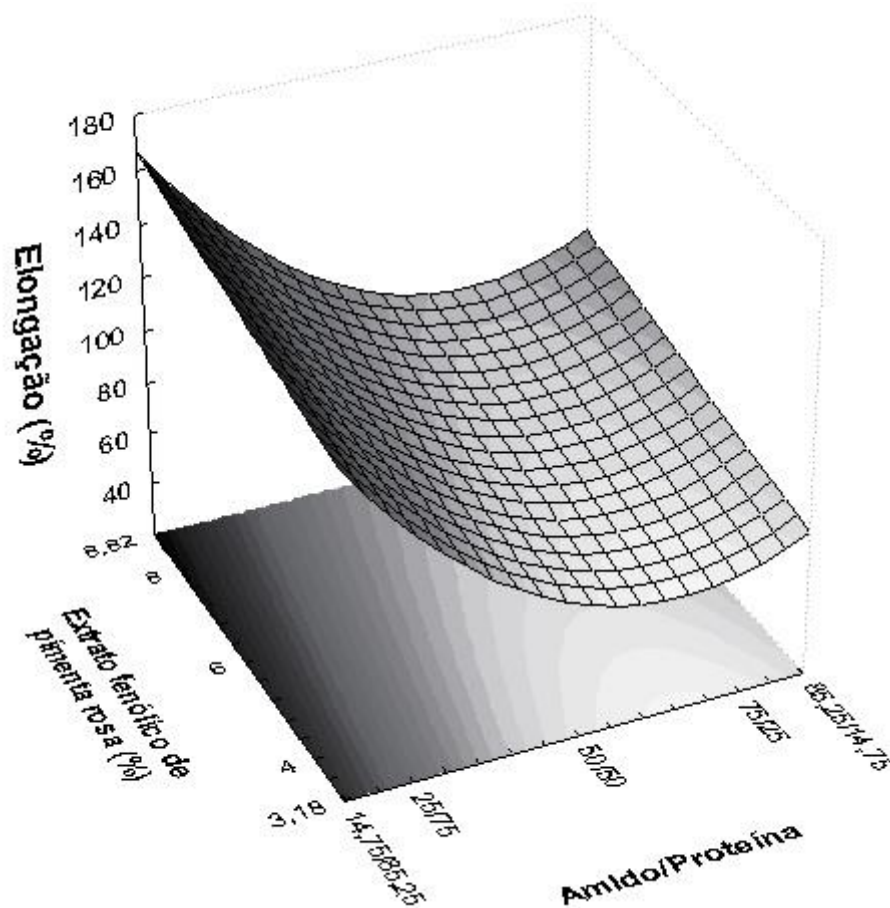
ESP: Espessura; RT: Resistência à tração; E: Elongação; SOL: Solubilidade em água; PVA: Permeabilidade ao vapor d'água; ΔE\*: Diferença total de cor; OP: Opacidade

A Equação 10 descreve a elongação dos filmes prevista pelo modelo em função das variáveis estudadas e contém apenas os termos significativos.

$$\text{Elongação} = 79,26 - 24,19 \text{ AM/PROT} + 20,15 \text{ AM/PROT}^2 + 8,52 \text{ EFP} \quad (10)$$

A elongação das blendas foi mais influenciada pela proporção amido/proteína, sendo que as maiores elongações foram obtidas com maiores quantidades de proteínas (Figura 16).

**Figura 16** – Superfície de resposta da elongação dos filmes em função da concentração de extrato fenólico de pimenta rosa e da proporção amido/proteína



Rindlav et al. (1997) explicaram que durante a formação dos filmes ocorre a cristalização dos componentes do amido, então devido a diminuição do conteúdo de amilose quando se utiliza menor concentração de amido na elaboração das blendas, conseqüentemente há uma diminuição na cristalinidade, o que resulta em aumento na flexibilidade/elasticidade do polímero.

Embora o efeito do aumento da concentração de EFP não tenha sido tão acentuado, percebe-se que a adição deste extrato tende a aumentar a elongação dos filmes. Estudos que utilizaram extratos contendo fenóis (BITENCOURT et al., 2014; HOQUE et al., 2011; WU et al., 2013) relataram que estes compostos influenciam nas propriedades mecânicas dos filmes, pois ocorre a formação de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio com os biopolímeros, sendo responsáveis pela formação de matrizes mais coesas e flexíveis.

As quantidades de amido e proteínas influenciaram na resistência à tração, no entanto não há um comportamento linear nos resultados obtidos pela determinação das propriedades mecânicas (Tabela 8). Al-Hassan e Norziah (2012) obtiveram comportamento semelhante para as propriedades mecânicas ao elaborar blendas de amido e proteína de pescado em diferentes proporções. Estes autores explicaram que existe um máximo de interações entre o amido e as proteínas que influencia nas propriedades das blendas. Chinma, Ariaahu e Abu (2012) ao elaborar blendas de amido de mandioca e proteína de soja e Sun, Sun e Xiong (2013) ao desenvolver blendas de amido de ervilha e proteína de amendoim, também observaram que filmes com maior concentração de amido são mais resistentes e menos flexíveis. Esse comportamento pode ser devido a amilose possuir estrutura linear e formar uma estrutura ordenada através de ligações de hidrogênio intermoleculares, conferindo resistência a matriz (KRAMER, 2009).

Em relação a espessura das blendas houve pouca variação nos resultados obtidos. Além da formulação das soluções filmogênicas, a cinética de secagem também influencia na espessura dos filmes (DEBEAUFORT; VOILLEY, 1995), o que justifica o comportamento observado.

A transmissão do vapor d'água nos filmes depende da difusividade e solubilidade das moléculas de água na matriz polimérica (GONTARD; GUILBERT, 1996). Em relação a permeabilidade, se observa que maiores concentrações de EFP levaram a formação de blendas menos permeáveis ao vapor d'água, semelhante ao observado por Bitencourt et al. (2014), Bodini et al. (2013) e Hoque et al. (2011). De acordo com estes autores, esse comportamento provavelmente se deve as interações hidrofóbicas e de hidrogênio dos compostos fenólicos com os grupamentos funcionais da rede do filme, diminuindo o volume livre da matriz polimérica.

Com a formação dessas interações que limitam a capacidade dos grupamentos de hidrogênio de formar ligações hidrofílicas com a água era esperado que também houvesse uma diminuição na solubilidade das blendas, o que não foi observado. A concentração de EFP

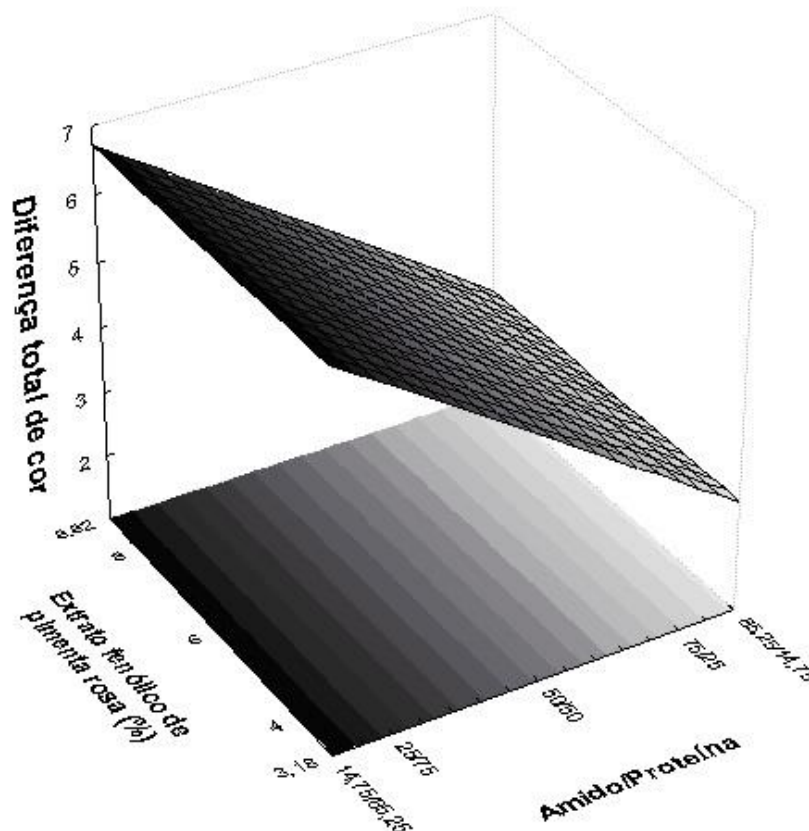
teve efeito nesta propriedade dos filmes, sugerindo que o extrato interfere no arranjo das cadeias de amido e proteínas, porém houve aumento na solubilidade ao empregar maior concentração de extrato.

A Equação 11 descreve a diferença total de cor dos filmes prevista pelo modelo em função das variáveis estudadas e contém apenas os termos significativos.

$$\text{Diferença total de cor} = 4,74 - 1,43 \text{ AM/PROT} \quad (11)$$

Os resultados obtidos ao avaliar as propriedades óticas deste planejamento apresentam comportamento semelhante ao planejamento anterior. De acordo com a superfície de resposta apresentada na Figura 17 a diferença total de cor foi influenciada apenas pela proporção de amido/proteína.

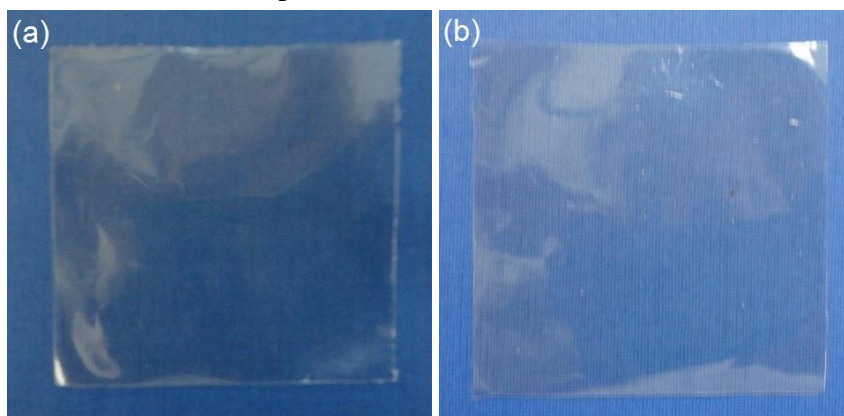
**Figura 17** – Superfície de resposta da diferença total de cor dos filmes em função da concentração de extrato fenólico de pimenta rosa e da proporção amido/proteína





A opacidade não variou ao utilizar diferentes concentrações de EFP e proporções amido/proteína (Tabela 8), conforme pode ser observado na Figura 18, onde estão apresentadas as imagens dos Ensaios 4 e 5.

**Figura 18** – Filmes elaborados com: (a) 25/75 de amido/proteína e 8 % de extrato fenólico de pimenta rosa (Ensaio 4) e (b) 14,75/85,25 de amido/proteína e 6 % extrato fenólico de pimenta rosa (Ensaio 5)



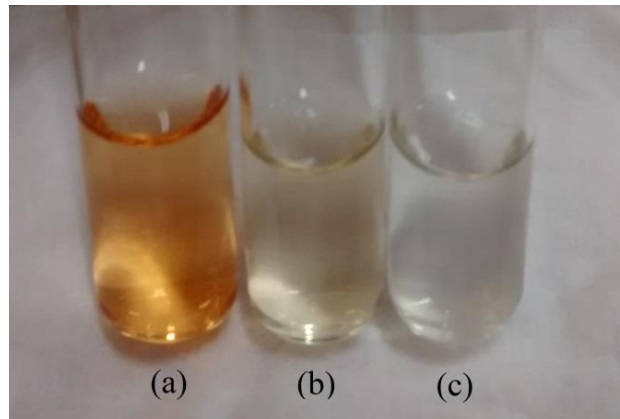
Através dos resultados obtidos na caracterização das blendas o Ensaio 5 (proporção de 14,75/85,25 de amido/proteína e 6 % de EFP) foi selecionado para avaliação da capacidade antioxidante e das análises estruturais, visto que apresentou uma das menores solubilidades (19,5 %) e permeabilidades (0,19 g.mm/m<sup>2</sup>.h.kPa) e a maior alongação (173,3 %) mantendo uma boa resistência à tração (6,50 MPa).

#### 5.4.2.1 Potencial antioxidante da blenda com EFP

Ao avaliar o potencial antioxidante da blenda adicionada de extrato fenólico de pimenta rosa na concentração de 6 % se obteve inibição de 12,7 % quando determinado pelo método de DPPH e 76,7 % quando determinado pelo método da inibição da oxidação catalisada enzimaticamente. De acordo com Oliveira et al. (2007) os tipos e as estruturas dos compostos fenólicos influenciam mais na atividade antioxidante que a concentração dos fenólicos totais. Os compostos predominantes no óleo essencial de orégano são o carvacrol e o timol (SILVA et al., 2010), enquanto que no extrato de pimenta rosa são encontrados diferentes ácidos fenólicos. Em ambos os métodos empregados para avaliar o potencial antioxidante a blenda elaborada com 6 % de EFP apresentou maiores percentuais de inibição comparada a blenda adicionada de 8,82 % de OEO. A atividade antioxidante da blenda adicionada de EFP possivelmente se deve ao ácido cumárico, presente em maior concentração

(4,44 µg de ácido cumárico/g de pimenta rosa). Este ácido fenólico faz parte do grupo dos hidroxicinâmicos, que são mais ativos que o grupo dos ácidos hidroxibenzóicos (WANASUNDARA; AMAROWICZ; SHAHIDI, 1994). Na Figura 19 pode ser visualizada a análise de inibição da oxidação catalisada enzimaticamente para as blendas avaliadas.

**Figura 19** – Inibição da oxidação catalisada enzimaticamente; (a) controle (b) blenda adicionada de 8,82 % de óleo essencial de orégano; (c) blenda adicionada de 6 % de extrato fenólico de pimenta rosa



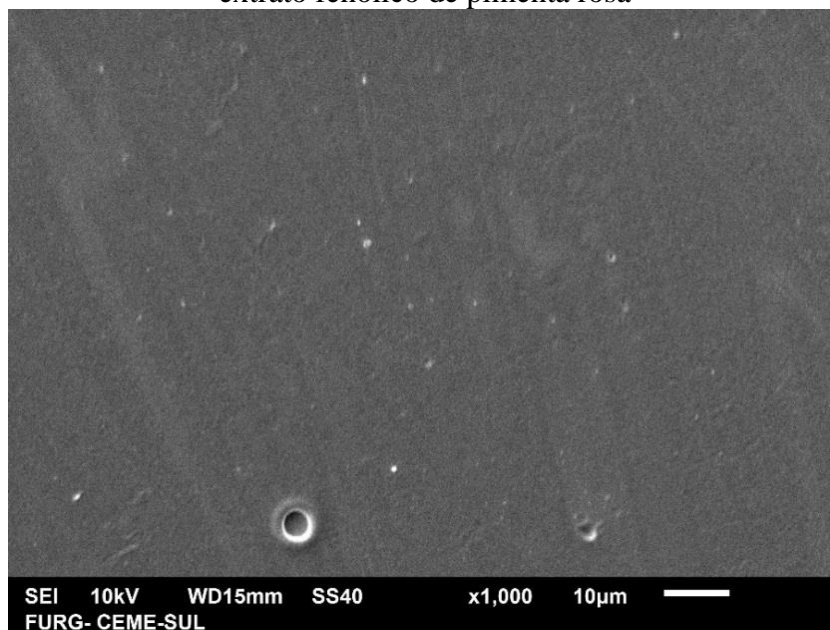
Além do potencial de inibição do escurecimento enzimático de vegetais, essa forte capacidade antioxidante da blenda adicionada de EFP pode ser associada a atividade antimicrobiana. De acordo com Oliveira et al. (2007) a atividade antioxidante dos extratos vegetais sobre a atividade da peroxidase pode indicar seu potencial de inibição do desenvolvimento microbiano, pois entre outros mecanismos, a atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos pode se dar pela inativação de sistemas enzimáticos envolvidos na produção de energia e na síntese de componentes estruturais dos micro-organismos (PORTE; GODOY, 2001).

A atividade antioxidante de filmes incorporados de extratos bioativos já foi relatado na literatura. Bitencourt et al. (2014) obtiveram aproximadamente 80 % de sequestro de DPPH ao incorporar de extrato etanólico de cúrcuma em filmes de gelatina. Haddar et al. (2012) ao elaborar filmes de gelatina de atum adicionados de extrato metanólico de algas marrons apresentaram uma capacidade de sequestro de DPPH próximo de 50 %. Ao adicionar extrato de chá verde em filmes de gelatina de carpa prateada Wu et al. (2013) obtiveram 31,4 % de sequestro de DPPH.

#### 5.4.2.2 Propriedades estruturais da blenda com EFP

Na Figura 20 está apresentada a morfologia do filme elaborado conforme as condições do Ensaio 5 utilizando EFP.

**Figura 20** – Morfologia da blenda composta por 14,75/85,25 de amido/proteína e 6 % de extrato fenólico de pimenta rosa



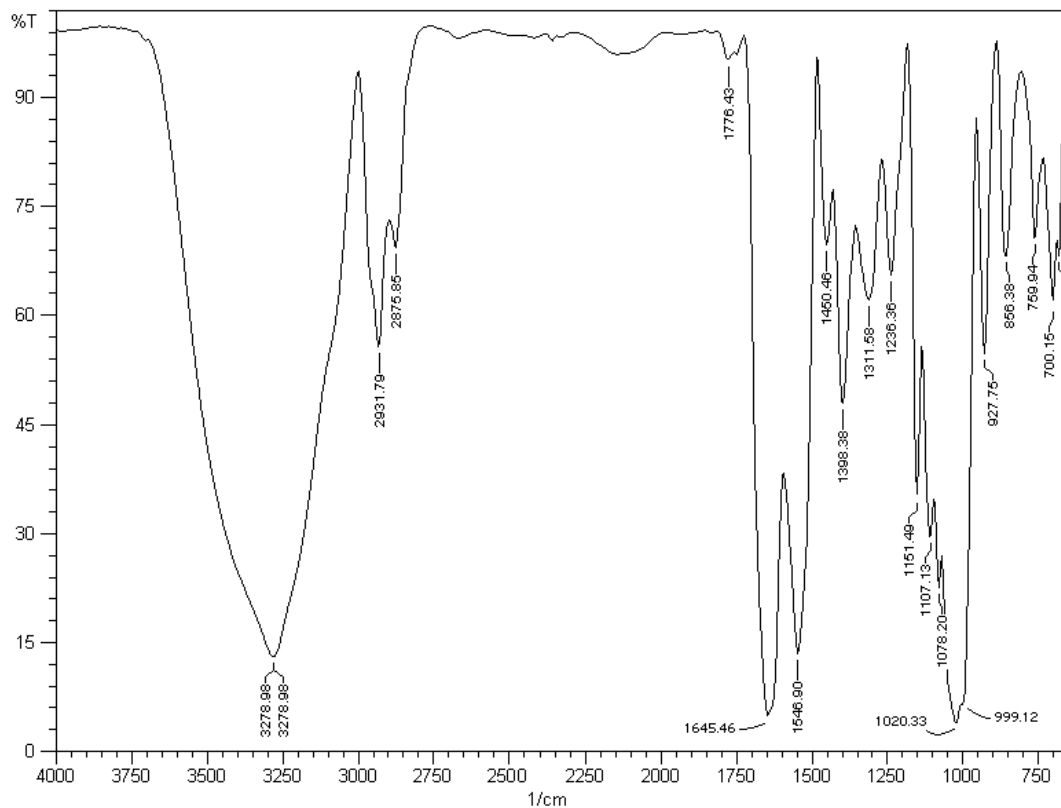
Semelhante ao visualizado na imagem da blenda adicionada de OEO pode-se perceber que a estrutura obtida é homogênea e sem rachaduras, o que é desejável para os filmes a serem utilizados como embalagens de alimentos. Diferente da outra imagem obtida esta não apresenta materiais não solubilizados durante a produção dos filmes.

A imagem do MEV mostra uma matriz compacta, e está de acordo com as características obtidas no planejamento experimental onde se obteve boas propriedades de alongação e permeabilidade ao vapor d'água. Rubilar et al. (2013) obtiveram uma estrutura mais densa ao adicionar carvacrol em filmes e atribuem o resultado obtido ao comportamento hidrofóbico dos compostos utilizados, o que também justifica as propriedades mecânicas e de barreira obtidas no presente estudo. Wu et al. (2013) explicaram que as interações entre os compostos fenólicos e os grupamentos funcionais dos biopolímeros podem contribuir para a formação de estruturas mais compactas.

A Figura 21 apresenta o espectro obtido na análise de FTIR para o Ensaio 5 (EFP). No espectro obtido para a blenda empregando extrato fenólico de pimenta nota-se bandas muito semelhantes as obtidas na blenda empregando óleo essencial de orégano.

Entretanto, houve diferença na amplitude dos picos possivelmente devido a maior quantidade de proteína utilizada neste ensaio e também devido a adição do EFP. Bitencourt et al. (2014) e Wu et al. (2013) observaram deslocamentos nas bandas referentes a amida A, amida I, amida II e amida B e atribuem estas mudanças as interações dos compostos fenólicos dos extratos com as matrizes dos filmes.

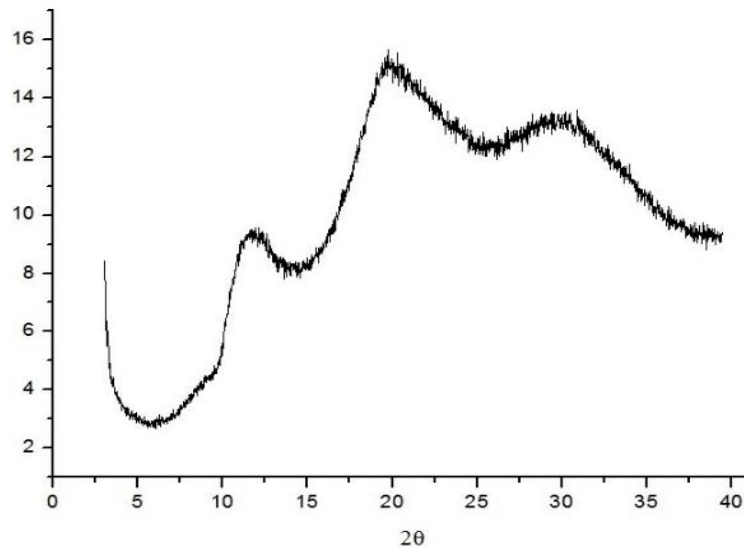
**Figura 21** – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier para a blenda constituída de 14,75/85,25 de amido/proteína e 6 % de extrato fenólico de pimenta rosa



No difratograma obtido para o Ensaio 5 (Figura 22) se observa comportamento muito semelhante ao Ensaio 8 (OEO), tendo picos que indicam a presença de regiões cristalinas, mas predominando a região amorfa. No entanto, se observa que a cristalinidade foi influenciada pela quantidade de proteínas utilizada, que foi superior no Ensaio 5 (EFP).

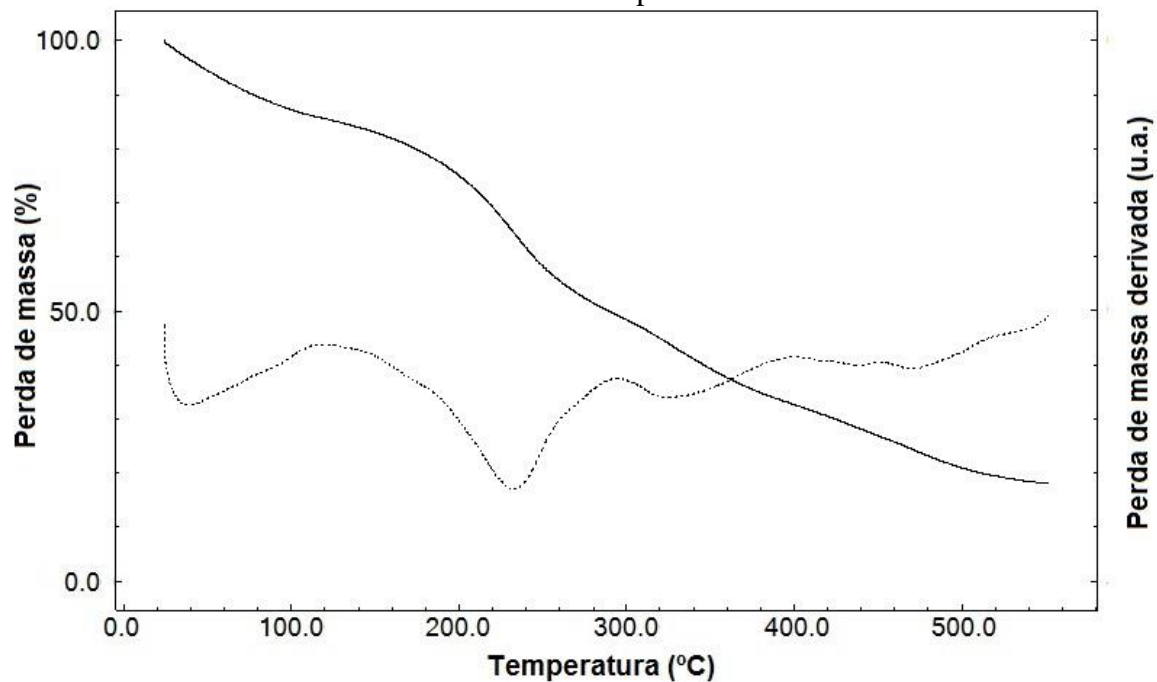
A diferença observada nos Ensaios 5 (EFP) e 8 (OEO) também pode ser atribuída aos outros componentes presentes na matriz, como o OEO, o EFP e o plastificante. Vasques (2007) observou este efeito e explicou que outros compostos incorporados na matriz interferem na organização das cadeias poliméricas. As pontes de hidrogênio diminuem a interação e a coesão do polímero, o que reflete na cristalinidade, bem como nas outras propriedades dos filmes.

**Figura 22** – Difratoograma de raios X da blenda constituída de 14,75/85,25 de amido/proteína e 6 % de extrato fenólico de pimenta rosa



A análise de TGA para o Ensaio 5 (EFP) está apresentada na Figura 23.

**Figura 23** – Termograma da blenda constituída de 14,75/85,25 de amido/proteína e 6 % de extrato fenólico de pimenta rosa



— Curva Termogravimétrica (TG) ..... Curva Termogravimétrica Derivada (DTG)

No termograma obtido nota-se comportamento semelhante a análise de TGA para o ensaio empregando óleo essencial de orégano, onde se observou que a degradação térmica

se deu em três estágios principais. Entretanto na blenda com EFP a temperatura máxima de degradação foi de 232,61 °C, inferior ao outro ensaio. Esta menor temperatura de máxima degradação se deve provavelmente aos compostos fenólicos presentes no extrato fenólico de pimenta, que quando incorporados na matriz polimérica afetam a interação entre as cadeias de amido e proteínas, reduzindo-as possivelmente. Este comportamento já foi relatado por outros autores pela presença de aditivos na formulação dos filmes (ARRIETA et al., 2013; VERBEEK; VAN DEN BERG, 2010).

### **5.5 Blendas elaboradas utilizando OEO x Blendas elaboradas utilizando EFP**

Os dois planejamentos mostraram que as variáveis estudadas apresentaram comportamento semelhante para a maioria das propriedades avaliadas, sendo sempre maior a alongação ao utilizar maiores concentrações de EFP e OEO. As maiores concentrações de amido originam filmes mais resistentes e em relação às propriedades de barreira, maiores concentrações de EFP e OEO são responsáveis pelas menores permeabilidades e solubilidades, porém comportamento contrário foi obtido para a solubilidade quando se adicionou maiores concentrações de EFP as blendas.

Apesar das diferenças observadas entre os resultados dos planejamentos experimentais, em geral ambos os filmes apresentaram boas propriedades mecânicas, óticas e de barreira, que são importantes para aplicação em alimentos. Quando comparados aos polímeros comerciais os resultados obtidos ainda são inferiores. De acordo com Martins et al. (2004) o PVC apresenta resistência à tração e alongação de aproximadamente 19 MPa e 240 %, respectivamente. Em relação às propriedades óticas e de barreira, o PVC possui em torno de 12 % de opacidade e 0,05 g.mm/m<sup>2</sup>.dia.mmHg de permeabilidade ao vapor d'água (BATISTA; TANADA-PALMU; GROSSO, 2005; HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008).

Quando comparados a outros trabalhos da literatura onde foram elaborados filmes de proteínas e polissacarídeos (CHINMA; ARIAHU; ABU, 2012; CORTEZ-VEGA et al., 2012; MORADI et al., 2012; ROCHA et al., 2014; SALARBASHI et al., 2013), as blendas do presente estudo apresentaram propriedades superiores. No Ensaio 8 (OEO), por exemplo, a blenda apresentou baixa solubilidade (8,0 %) e permeabilidade ao vapor d'água (0,18 g.mm/m<sup>2</sup>.h.kPa), enquanto que no Ensaio 5 (EFP) foram obtidas as melhores propriedades mecânicas, com resistência à tração de 6,50 MPa e alongação de 173,3 %.

As características morfológicas, químicas e térmicas foram semelhantes para as duas blendas avaliadas, demonstrando que o amido e proteína utilizados são compatíveis e que os aditivos incorporados ficaram bem homogeneizados na matriz polimérica. A capacidade antioxidante das blendas adicionadas de OEO e EFP sugere que estas podem ser aplicadas como embalagens ativas, porém a blenda incorporada com EFP apresentou maior potencial de inibir a oxidação catalisada enzimaticamente.

## 6. CONCLUSÃO

É possível elaborar blendas a partir de fontes renováveis, como o amido da quirera de arroz e as proteínas de corvina, agregando valor a estas matérias-primas.

As diferentes proporções de amido/proteínas e as concentrações de óleo essencial de orégano e extrato fenólico de pimenta rosa utilizadas influenciaram as propriedades dos filmes obtidos. Em geral, o amido foi responsável por originar filmes mais resistentes, enquanto que as proteínas conferiram maior flexibilidade as matrizes.

O óleo essencial de orégano atua como plastificante aumentando a elongação dos filmes e diminui a hidrofobicidade. Os compostos fenólicos presentes no extrato de pimenta rosa também melhoraram as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes.

A caracterização da estrutura mostrou que os compostos ativos adicionados ficaram incorporados na matriz e as matérias-primas utilizadas são compatíveis, o que conferiu melhores propriedades às blendas obtidas.

Quando o extrato fenólico de pimenta rosa foi utilizado, as blendas tiveram maior potencial antioxidante quando comparadas as blendas adicionadas de óleo essencial de orégano. Os filmes obtidos são muito promissores para serem utilizados como embalagens ativas em produtos vegetais que estão sujeitos ao escurecimento enzimático.



## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o efeito de outras concentrações de extrato fenólico de pimenta rosa;
- Avaliar as características morfológicas, químicas e térmicas das blendas sem adição do óleo essencial de orégano e do extrato fenólico de pimenta rosa;
- Determinar o potencial antioxidante dos compostos utilizados e dos filmes selecionados por mais um método, como o de inibição da peroxidação lipídica;
- Avaliar o potencial antioxidante das blendas em diferentes dias para verificar por quanto tempo permanece ativa;
- Avaliar a capacidade antimicrobiana dos filmes;
- Aplicar os filmes que apresentaram as melhores propriedades em alimentos;
- Estudar a biodegradação dos ensaios que apresentaram as melhores propriedades.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEWSIRI, T.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. Functional properties of gelatin from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin as affected by bleaching using hydrogen peroxide. **Food Chemistry**, v. 115, p. 243-249, 2009.

AGUIRRE, A.; BORNEO, R.; LEÓN, A. E. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. **Food Bioscience**, v. 1, p. 2-9, 2013.

AHMED, J.; TIWARI, B. K.; IMAM, S. H; RAO, M. A. **Starch-Based Polymeric Materials and Nanocomposites: Chemistry, Processing, and Applications**. USA: CRC Press, 2012.

AL-HASSAN, A. A.; NORZIAH, M. H. Starch-gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. **Food Hydrocolloids**, v. 26, p. 108-117, 2012.

ALVES, V. D.; MALI, S.; BELÉIA, A.; GROSSMANN, M. V. E. Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 941-946, 2007.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 16th ed., Washington, 1995.

ARANGO O. B.; PANTOJA D. D.; SANTACRUZ L. CH.; HURTADO B., ANDRÉS M. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides* H. B. K) del alto patía. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 10, p. 79-86, 2012.

ARCAN, I.; YEMENICIOGLU, A. Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials. **Food Research International**, v. 44, p. 550-556, 2011.

ARRIETA, M. P.; PELTZER, M. A.; GARRIGÓS, M. C.; JIMÉNEZ, A. Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. **Journal of Food Engineering**, v. 114, p. 486-494, 2013.

ASENSIO, C. M.; GROSSO, N. R.; JULIANI H. R. Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential oils. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 664-671, 2015a.

ASENSIO, C. M.; GROSSO, N. R.; JULIANI, H. R. Quality characters, chemical composition and biological activities of oregano (*Origanum* spp.) Essential oils from Central and Southern Argentina. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 203-213, 2015b.

ASENSIO, C.; NEPOTE, V.; GROSSO, N. R. Chemical stability of extra-virgin olive oil added with oregano essential oil. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 545-550, 2011.

ASENSIO, C.; NEPOTE, V.; GROSSO, N. R. Sensory attribute preservation in extra virgin olive oil with addition of oregano essential oil as natural antioxidant. **Journal of Food Science**, v. 77, p. S294-S301, 2012.

ASTM. American Society for Testing and Materials. **Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials (E96-00)**. West Conshohocken: ASTM International, 2000.

ASTM. American Society for Testing and Materials. **Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting (D882-02)**. West Conshohocken: ASTM International, 2002.

ATARÉS, L.; BONILLA, J.; CHIRALT, A. Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 678-687, 2010.

ATARÉS, L.; DE JESÚS, C.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. **Journal of Food Engineering**, v. 99, p. 384-391, 2010.

AVILA-ROSA, R.; PALOU, E.; JIMÉNEZ MUNGUÍA, M. T.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V.; NAVARRO CRUZ, A. R.; LÓPEZ-MALO, A. Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 66-72, 2012.

AYALA, M. E. G. **Estructura y Composición química del pescado**. In: Curso de capacitación. Surimi. Callao: Instituto Tecnológico Pesquero del Perú, 2001.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BALAGUER, M. P.; BORNE, M.; CHALIER, P.; GONTARD, N.; MOREL, M. H.; PEYRON, S.; GAVARA, R.; MUNOZ, P. H. Retention and Release of Cinnamaldehyde from Wheat Protein Matrices. **Biomacromolecules**, v. 14, p. 1493-1502, 2013.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

BATISTA, J.; TANADA-PALMU, P. S.; GROSSO, C. R. F. Efeito da adição de ácidos graxos em filmes à base de pectina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 781-788, 2005.

BENAVIDES, S.; VILLALOBOS-CARVAJAL, R.; REYES, J. E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 232-239, 2012.

BERGO, P.; SOBRAL, P. J. A. Effects of plasticizer on physical properties of pig skin gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1285-1289, 2007.

BERNAOUD, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, JP.; CAZAUX, S.; BOUAILLA, J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle L.* and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 466-472, 2010.

BERNARDES, N. A. *Schinus terebinthifolius* Raddi: Atividade Antioxidante e Potencial Biológico. **Tese** (Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2014.

BERTOLDI, M. C. Atividade antioxidante in vitro da fração fenólica, das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa. **Tese** (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2006.

BHAT, R.; ABDULLAH, N.; DIN, R. H.; TAY, G-S. Producing novel sago starch based food packaging films by incorporating lignin isolated from oil palm black liquor waste. **Journal of Food Engineering**, v. 119, p. 707–713, 2013.

BITENCOURT, C. M.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; SOBRAL, P. J. A.; CARVALHO, R. A. Gelatin-based films additivated with curcuma ethanol extract: Antioxidant activity and physical properties of films. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 145-152, 2014.

BODINI, R. B.; SOBRAL, P. J. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; CARVALHO, R. A. Properties of gelatin-based films with added ethanol-propolis extract. **LWT – Food Science and Technology**, v. 51, p. 104-110, 2013.

BONILLA, J.; TALÓN, E.; ATARÉS, L.; VARGAS, M.; CHIRALT, A. Effect of the incorporation of antioxidants on physicochemical and antioxidant properties of wheat starch-chitosan films. **Journal of Food Engineering**, v. 118, p. 271-278, 2013.

BOTSOGLOU, N. A.; GOVARIS, A.; BOTSOGLOU, E. N.; GRIGOROPOULOU, S. H.; PAPAGEORGIOU, G. Antioxidant activity of dietary oregano essential oil and alpha-tocopheryl acetate supplementation in long-term frozen stored turkey meat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2930–2936, 2003.

BOUHDID, S.; SKALI, S. N.; IDAOMAR, M.; ZHIRI, A.; BAUDOUX, D.; AMENSOUR, M.; ABRINI, J. Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 1563-1570, 2008.

BOURTOOM, T. Edible films and coatings: characteristics and properties. **International Food Research Journal**, v. 15, p. 237–248, 2008.

BOURTOOM, T.; CHINNAN, M. S. Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 1633–1641, 2008.

BRAGA, R. L.; PERES, L. Novas tendências em embalagens para alimentos: revisão. **Boletim do CEPPA**, v. 28, p. 69-84, 2010.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRIZIO, A. P. **Embalagens ativas e inteligentes: Tecnologias emergentes para o controle dinâmico da qualidade de alimentos**. Editora da FURG: Rio Grande, 2014.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CENTENARO, G. S.; MELLADO, M. S. Influência das concentrações de enzima e de substrato no grau de hidrólise e no conteúdo proteico de hidrolisados enzimáticos de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Boletim do CEPPA**, v. 26, p. 61-70, 2008.

CENTENARO, G. S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; MELLADO, M. S. Efeito da concentração de enzima e de substrato no grau de hidrólise e nas propriedades funcionais de hidrolisados proteicos de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, v. 32, p. 1792-1798, 2009.

CEREDA, M. P. **Propriedades gerais do amido**. (Série: Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas), São Paulo: Fundação Cargill, 2001.

CHINMA, C. E.; ARIAHU, C. C.; ABU, J. O. Development and characterization of cassava starch and soy protein concentrate based edible films. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 383-389, 2012.

CHO, S. Y.; RHEE, C. Sorption characteristics of soy protein films and their relation to mechanical properties. **LWT – Food Science and Technology**, v. 35, p. 151-157, 2002.

CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 809–816, 2005.

CIACCO, C. F.; CRUZ, R. **Fabricação de amido e sua utilização**. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1982.

COMA, V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. **Baking**, v. 78, p. 90-103, 2008.

CORRADINI, E.; CARVALHO, A. J. F.; CURVELO, A. A. S.; AGNELIA, J. A. M.; MATTOSO, L. H. C. Preparation and Characterization of Thermoplastic Starch/Zein Blends. **Materials Research**, v. 10, p. 227-231, 2007.

CORTEZ-VEGA, W. R.; BAGATINI, D. C.; SOUZA, J. T. A.; PRENTICE, C. Biofilmes nanocompósitos obtidos de isolado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*) e Montmorilonita: avaliação das propriedades físicas, mecânicas e de barreira. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, p. 90-98, 2013.

DAINELLI, D.; GONTARD, N.; SPYROPOULOS, D.; BEUKEND, E. Z.; TOBBACK, P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, p. 103-112, 2008.

DAMODARAN, S. Aminoacids, peptides, and proteins. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). Food chemistry. New York, USA: Marcel Dekker, 1996.

DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Effect of surfactants and drying rate on barrier properties of emulsified edible films. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 30, p. 183-190, 1995.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M. R. M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 617-622, 2005.

DIAS, A. B.; MÜLLER, C. M. O.; LAROTONDA, F. D. S.; LAURINDO, J. B. Biodegradable films based on rice starch and rice flour. **Journal of Cereal Science**, v. 51, p. 213-219, 2010.

DOURADO, M. T. Óleos essenciais e oleoresina da pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi): propriedade químicas e biológicas. **Tese** (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

DU, W. X.; OLSEN, C. W.; AVENA- BUSTILIOS, R. J.; MCHUGH, T. H.; LEVIN, C. E.; FRIEDMAN, M. Effects of allspice, cinnamon, and clove bud essential oils in edible apple films on physical properties and antimicrobial activities. **Journal of Food Science**, 2009.

DZIEDZIC, S. Z.; HUDSON, B. J. F. Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. **Food Chemistry**, v. 14, p. 45-51, 1984.

FALCO, E.; MANCINI, E.; ROSCIGNO, G.; MIGNOLA, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; SENATORE, F. Chemical Composition and Biological Activity of Essential Oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* L. under Different Growth Conditions. **Molecules**, v. 18, p. 14948-14960, 2013.

FARIA, F. O.; VERCELHEZE, A. E. S.; MALI, S. Propriedades físicas de filmes biodegradáveis à base de amido de mandioca, álcool polivinílico e montmorilonita. **Química Nova**, v. 35, p. 487-492, 2012.

FERREIRA, C. O. Desenvolvimento e caracterização de filmes à base de proteínas do soro do leite – potencial funcionalização com quitosanos. **Dissertação** (Mestrado em Bioquímica e Química de Alimentos) – Universidade de Aveiro, Aveiro, 2008.

FERREIRA, W. H.; KHALILI, R. R.; FIGUEIRA JUNIOR, M. J. M.; ANDRADE, C. T. Effect of organoclay on blends of individually plasticized thermoplastic starch and polypropylene. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 38-54, 2014.

FONTANA, A.; CENTENARO, G. S.; PALEZI, S. C.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Obtenção e avaliação de concentrados proteicos de corvina (*Micropogonias furnieri*) processados por extração química. **Química Nova**, v. 32, p. 2299-2303, 2009.

FREITAS, I. R. Recuperação das proteínas provenientes de pescado utilizando o processo de variação de pH. **Dissertação** (Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

FREITAS, I., GAUTÉRIO, G. V.; RIOS, D. G.; PRENTICE, C. Functionality of protein isolates from Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) residue obtained using pH shift processing. **Journal of Food Science and Engineering**, v. 1, p. 374-378, 2011.

FRENCH, D. Organization of starch granules. In: WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N.; PASCHAL, E. F. **Starch: chemistry and technology**. London: Academic Press, 1984.

FURLONG, E. B.; COLLA, E.; BORTOLATO, D. S.; BAISCH, A. L. M.; SOUZA-SOARES, L. A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Vetor**, v. 13, p. 105-114, 2003.

GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 941-947, 2000.

GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Characterization of starch and composite edible films and coatings. In: EMBUSCADO, M. E.; HUBER, K.C. **Edible Films and Coatings for Food Applications**, New York: Springer, 2009.

GHASEMLOU, M.; ALIHEIDARI, N.; FAHMI, R.; SHOJAEE-ALIABADI, S.; KESHAVARZ, B.; CRAN, M. J.; KHAKSAR, R. Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 1117-1126, 2013.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat and lipids: water vapor permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 29, p. 39-50, 1994.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-Packaging: Technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. **Boletim SBCTA**, v. 30, p. 3-15, 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**, v. 83, p. 521-530, 2007.

GU, L.; WANG, M.; ZHOU, J. Effects of protein interactions on properties and microstructure of zein–gliadin composite films. **Journal of Food Engineering**, v. 119, p. 288-298, 2013.

GUERRA, M. J. M.; BARREIRO, M. L.; RODRIGUEZ, Z. M.; RUBAICABA, Y. Actividad antimicrobiana de um extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**, v. 5, p. 23-25, 2000.

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

HADDAR, A.; SELLIMI, S.; GHANNOUCHI, R.; ALVAREZ, O. M.; NASRI, M.; BOUGATEF, A. Functional, antioxidant and film-forming properties of tuna-skin gelatin with a brown algae extract. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 477-483, 2012.

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**, v. 28, p. 231-240, 2008.

HERRERO, M.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.; SEÑORÁNS, F. J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**, v. 93, p. 417-423, 2005.

HOQUE, Md. S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1085-1097, 2011.

HOSENEY, R. C. Principles of Cereal Science and Technology. **Cereal Chemistry**, v. 63, p. 285-286, 1986.

ISHIAKU, U. S.; PANG, K. W.; LEE, W. S.; ISHAK, Z. A. M. Mechanical properties and enzymic degradation of thermoplastic and granular sago starch filled poly ( $\epsilon$ -caprolactone). **European Polymer Journal**, v. 38, p. 393-401, 2002.

ITURRIAGA, L.; OLABARRIETA, I.; MARAÑÓN, I. M. Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, p. 58-64, 2012.

JACOB, R. F. Estudo das propriedades das blendas de amido termoplástico e látex natural. **Tese** (Doutorado em Ciências - Físico-Química) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

JOUKI, M.; YAZDI, F. T.; MORTAZAVI, S. A.; KOOCHEKI, A. Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 9-19, 2014.

KADAM, D. M.; THUNGA, M.; WANG, S.; KESSLER, M. R.; GREWELL, D.; LAMSAL, D.; YU, C. Preparation and characterization of whey protein isolate films reinforced with porous silica coated titania nanoparticles. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 133-140, 2013.

KAPLAN, D. L. **Biopolymers from Renewable Resources**. New York: Editora Springer, 1998.

KARNNET S.; POTIYARAJ, P.; PIMPAN, V. Preparation and properties of biodegradable stearic acid-modified gelatin films. **Polymer Degradation and Stability**, v. 90, p. 106-110, 2005.

KIM, S. J.; USTUNOL, Z. Solubility and moisture sorption isotherms of whey protein-based edible films as influenced by lipid and plasticizer incorporation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, p. 4388-4391, 2001.

KITAHARA, K.; COPELAND, L. A simple method for fractionating debranched starch using a solid reversed-phase cartridge. **Journal of Cereal Science**, v. 39, p. 91-98, 2004.

KOCH, K.; GILLGREN, T.; STADING, M.; ANDERSSON, R. Mechanical and structural properties of solution-cast high-amylose maize starch films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 13-19, 2010.

KRAMER, M. E. Structure and function of starch-based edible films and coatings. In: EMBUSCADO, M. E.; HUBBER, K. C. **Edible films and coatings for food applications**. New York: Springer Science + Business Media LLC, 2009.

KROCHTA, J. M. **Edible protein films and coatings in food proteins and their applications in foods**. New York: Marcel Dekker, 1997.

LAWRENCE, B. A discussion of *Schinus molle* and *Schinus terebinthifolius*. **Perfumer e Flavorist**, v. 9, p. 65-69, 1984.

LEE, R.; PRANATA, M.; USTUNOL, Z.; ALMENAR, E. Influence of glycerol and water activity on the properties of compressed egg white-based bioplastics. **Journal of Food Engineering**, v. 118, p. 132–140, 2013.

LI, J. H.; MIAO, J.; WU, J. L.; CHEN, S. F.; ZHANG, Q. Q. Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 166-173, 2014.

LI, M.; LIU, P.; ZOU, W.; YU, L.; XIE, F.; PU, H.; LIU, H. CHEN, L. Extrusion processing and characterization of edible starch films with different amylose contents. **Journal of Food Engineering**, v. 106, p. 95-101, 2011.

LIU, Q. Starch Modifications and Applications. In: CUI, S. W (Ed.). **Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications**, New York: CRC Press, 2005.

MANIGLIA, B. C. Elaboração de filmes biodegradáveis a partir do resíduo da extração do pigmento de Cúrcuma. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

MARIANI, P. D. S. C.; ALLGANER, K.; OLIVEIRA, F. B.; CARDOSO, E. J. B. N.; INNOCENTINI-MEI, L. H. Effect of soy protein isolate on the thermal, mechanical and morphological properties of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) and corn starch blends. **Polymer Testing**, v. 28, p. 824-829, 2009.

MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. **Food Chemistry**, v. 81, p.189-197, 2003.

MARTINEZ, C.; CUEVAS, F. **Evaluación de localidad culinária y molineradel arroz. Guía de estudio**. Calli: CIAT, 1989.

MARTINS, G. S.; IOZZI, M. A.; MARTINS, M. A. MATTOSO, L. H. C.; FERREIRA, F. C. Caracterização mecânica e térmica de compósitos de Poli(Cloreto de Vinila) reforçados com fibras de sisal. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, p. 326-333, 2005.

MCHUGH, T. H.; AVENA-BUSTILLOS, R.; KROCHTA, J. M. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 899–903, 1993.

MCHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Permeability properties of edible films. In: **Edible Coatings and Films to Improve Food Quality**. Lancaster, PA: Technomic Publishing Company, 1994.

MORADI, M.; TAAJIK, H.; ROHANI, S. M. R.; OROMIEHIE, A. R.; MALEKINEJAD, H.; ALIAKBARLU, J.; HADIAN, M. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. **LWT – Food Science and Technology**, v. 46, p. 477-484, 2012.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. O. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 315-320, 2009.

MOTHE, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise Térmica de Materiais**. São Paulo: Edico Comercial Ltda, 2002.

NOLSOE, H.; UNDELAND, I. The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: State of the art. **Food Bioprocess and Technology**, v. 2, p. 1-27, 2009.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual da pesca – Ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: Varela, 1999.

OJAGH, S. M.; REZAEI, M.; RAZAVI, S. H.; HOSSEINI, S. M. H. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. **Food Chemistry**, v. 122, p. 161-166, 2010.

OLIVEIRA, M. S.; DORS, G. C.; SOUZA-SOARES, L. A.; BADIALE-FURLONG, E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alimentação e Nutrição**, v. 18, p. 267-275, 2007.

OLMEDO R. H.; ASENSIO, C.; NEPOTE, V.; MESTRALLET, M.G.; GROSSO, N. R. Chemical and sensory stability of fried-salted peanuts flavoured with oregano essential oil and olive oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 2128-2136, 2009.

OLMEDO, R. H.; NEPOTE, V.; MESTRALLET, M. G.; GROSSO, N. R. Effect of the essential oil addition on the oxidative stability of fried-salted peanuts. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 1935-1944, 2008.

ORDOÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: ARTMED, 2005.

OTONI, C. G.; MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; CAMILLOTO, G. P.; CRUZ, R. S.; LOREVICE, M. V.; SOARES, N. F.F.; MATTOSO, L. H. C. Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papayapuree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 188-194, 2014.

PENG, Y.; LI, Y. Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 287-293, 2014.

PINOTTI, A.; GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Study on microstructure and physical properties of composite films based on chitosan and methylcellulose. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 66-72, 2007.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus offi cinallis L.*): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim do CEPPA**, v. 19, p.193-210, 2001.

PORTE, A.; MAIA, L. H. Alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas de alimentos minimamente processados. **Boletim do CEPPA**, v. 19, p. 105-118, 2001.

QUEIRES, L. C. S.; RODRIGUES, L. E. A. Quantificação das substâncias fenólicas totais em órgãos da aroeira *Schinus terebinthifolius* (Raddi). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 41, p. 247-253, 1998.

REALINI, C. E.; MARCOS, B. Active and intelligent packaging systems for a modern society. **Meat Science**, v. 98, p. 404-419, 2014.

REIS, L. C. B.; SOUZA, C. O.; SILVA, J. B. A.; MARTINSA, A. C.; NUNESC, I. L.; DRUZIAN, J. I. Active biocomposites of cassava starch: The effect of yerba mate extract and mango pulp as antioxidant additives on the properties and the stability of a packaged product. **Food and Bioproducts Processing**, In Press, 2014.

REZVANI, E., SCHLEINING, G. SÜMEN, G.; TAHERIAN, A. R. Assessment of physical and mechanical properties of sodium caseinate and stearic acid based film-forming emulsions and edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 598-605, 2013.

RHIM, J. W.; NG, P. K. W. Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, p. 411-433, 2007.

RHIM, J. W.; PARK, H. M.; HA, C. S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1629-1652, 2013.

RINDLAV, A.; HULLEMAN, S. H. D.; GATENHOLM, P. Formation of starch films with varying crystallinity. **Carbohydrate Polymers**, v. 34, p. 25-30, 1997.

ROBERTSON, G. L. **Food Packaging: Principles and Practice**. Boca Raton: CRC Press, 2013.

ROCHA, M.; LOIKO, M. R.; GAUTÉRIO, G. V.; TONDO, E. C.; PRENTICE, C. Influence of heating, protein and glycerol concentrations of film-forming solution on the film properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein isolate. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 666-673, 2013.

ROCHA, M.; LOIKO, M. R.; GAUTÉRIO, G. V.; TONDO, E. C.; PRENTICE, C. Physical, mechanical and antimicrobial properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein films incorporated with organic acids. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 213-220, 2014.

RUBILAR, J. F.; CRUZ, R. M. S.; SILVA, H. D.; VICENTE, A. A.; KHMELINSKII, I.; VIEIRA, M. C. Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. **Journal of Food Engineering**, v. 115, p. 466-474, 2013.

SALARBASHI, D.; GHASEMLOU, S. T. M.; SHOJAEE-ALIABADI, S.; NOGHABIE, M. S.; KHAKSAR, R. Characterization of soluble soybean polysaccharide film incorporated essential oil intended for food packaging. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 1127-1136, 2013.

SALARBASHI, D.; TAJIK, S.; SHOJAEE-ALIABADI, S.; GHASEMLOU, M.; MOAYYED, H.; KHAKSAR, R.; NOGHABI, M. S. Development of new active packaging film made from a soluble soybean polysaccharide incorporated *Zataria multiflora* Boiss and *Mentha pulegium* essential oils. **Food Chemistry**, v. 146, p. 614-622, 2014.

SANTOS, I. R. C. ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO EM FRUTOS: POLIFENOLOXIDASE DE ATEMÓIA (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.). **Dissertação** (Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Araraquara, 2009.

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

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, p. 67-103, 1992.

SHIMAZU, A. A.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, p. 79-88, 2007.

SHOJAEI-ALIABADI, S.; HOSSEINI, H.; MOHAMMADIFAR, M. A.; MOHAMMADI, A.; GHASEMLOU, M.; OJAGH, S. M.; HOSSEINI, S. M.; KHAKSAR, R. Characterization of antioxidant-antimicrobial k-carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, p. 116-124, 2013.

SIKORSKI, Z. E.; KOLAKOWSKA, A.; PAN, B. S. Composición nutritive de los principales grupos de animales marinos utilizados como alimentos. In: SIKORSKI, Z. E. **Tecnología de los productos del mar: recursos, composición nutritiva y conservación**. Zaragoza: Acribia, 1994.

SILVA, J. P. L.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PEREZ, D. V.; FRANCO, B. D. G. M. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella* Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 136-141, 2010.

SILVA, M. V.; ROSA, C. I. L. F.; VILAS BOAS, E. V. B. Conceitos e métodos de controle do escurecimento enzimático no processamento mínimo de frutas e hortaliças. **Boletim do CEPPA**, v. 27, p. 83-96, 2009.

SOARES, N. F. F.; SILVA, W. A.; PIRES, A. C. S.; CAMILLOTO, G. P.; SILVA, P. S. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, v. 56, p. 370-378, 2009.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C.; HUBINGER, M. D.; ROQUES, M. A. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 423-432, 2001.

- SORRENTINO, A.; GORRASI, G.; VITTORIA, V. Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, p. 84-95, 2007.
- SOUZA, A. C.; GOTO, G. E. O.; MAINARDI, J. A.; COELHO, A. C. V.; TADINI, C. C. Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: Antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, p. 346-352, 2013.
- SOUZA, M. M.; OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, M.; FURLONG, E. B. Avaliação da atividade antifúngica de extratos fenólicos de cebola, farelo de arroz e microalga *Chlorella phyrenoidosa*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 680-685, 2010.
- SOUZA, M. M.; RECARTE, V. M.; ROCHA, M.; CIPOLATTI, E. P.; BADIÁLE-FURLONG, E. Estudo das condições de extração de compostos fenólicos de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, p. 192-200, 2009.
- SUN, Q.; SUN, C.; XIONG, L. Mechanical, barrier and morphological properties of pea starch and peanut protein isolate blend films. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 630-637, 2013.
- TECHAWIPHARAT, J.; SUPHANTHARIKA, M.; BEMILLER, J. N. Effects of cellulose derivatives and carrageenans on the pasting, paste, and gel properties of rice starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 417-426, 2008.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 853-879, 2001.
- TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 350-360, 2013.
- TURHAN, K. N.; SAHBAZ, F. Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methycellulose-based edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 459-466, 2004.
- UTRACKI, L. A. Polymer and blends: thermodynamics and rheology. New York: Hanser Publishers, 1989.



VAN SOEST, J. J. G.; Vliegenthart, J. F. G. Crystallinity in starch plastics: consequences for material properties. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 208-213, 1997.

VASQUES, C. T. Preparação e caracterização de filmes poliméricos a base de amido de milho e polipirrol para aplicação como biomaterial. **Tese** (Programa de Pós-Graduação em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

VERBEEK, C. J. R.; VAN DEN BERG, L. E. Extrusion processing and properties of protein-based thermoplastics. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 295, p. 10-21, 2010.

VICENTINO, S. L.; FLORIANO, P. A.; DRAGUNSKI, D. C. Filmes de amidos de mandioca modificados para recobrimento e conservação de uvas. **Química Nova**, v. 34, p. 1309-1314, 2011.

VON GADOW, A.; JOUBERT, E.; HANSMANN, C. F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*),  $\alpha$ -tocopherol, BHT and BHA. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 632-638, 1997.

VROMAN, I.; TIGHZERT, L. Biodegradable Polymers. **Materials**, v. 2, p. 307-344, 2009.

WANASUNDARA, U.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 42, p. 1285-1290, 1994.

WANG, Y.; WANG, L. Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound. **Journal of Cereal Science**, v. 39, p. 291-296, 2004.

WILHELM, H.-M.; SIERAKOWSKI, M. R.; SOUZA, G. P.; WYPYCH, F. Starch films reinforced with mineral clay. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 101-110, 2003.

WITTAYA, T. Rice Starch-Based Biodegradable Films: Properties Enhancement. In: EISSA, A. A. **Structure and function of Food Engineering**. Rijeka: Intech, 2012.

WU, J.; CHEN, S.; GE, S.; MIAO, J. LI, J.; ZHANG, Q. Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 32, p. 42-51, 2013.

WÜRTZEN, G. Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemicals: antioxidants. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 28, p.743-745, 1990.

WURZBURG, O. B. Cross-linked starches. In: WURZBURG, O. B. (ed.). **Modified starches: properties and uses**. Boca Raton: CRC Press, 1986.

YAM, K. L.; TAKHISTOV, P. T.; MILTZ, J. Intelligent packaging: concepts and applications. **Journal of Food Science**, v.70, p. R1-R10, 2005.

YEANNES, M. I.; ALMANDOS, M. E. Estimation of fish proximate composition starting from water content. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, p. 81-92, 2003.

YOUNG, H. Fractionation of starch. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F. (Ed). **Starch chemistry and technology**. Orlando: Academic Press, 1984.

ZAVAREZE, E. R.; EL HALAL, S. L. M.; SILVA, R. M.; DIAS, A. R. G.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Mechanical, barrier and morphological properties of biodegradable films based on muscle and waste proteins from the Whitemouth Croaker (*Micropogonias Furnieri*). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, p. 1-9, 2013.

ZAVAREZE, E. R., EL HALAL, S. L. M.; PEREIRA, J. M.; RADÜNZ, A. L.; ELIAS, M. C.; DIAS, A. R. G. Caracterização química e rendimento de extração de amido de arroz com diferentes teores de amilose. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, p. 24-30, 2009.

ZUO, M.; SONG, Y.; ZHENG, Q. Preparation and properties of wheat gluten/methylcellulose binary blend film casting from aqueous ammonia: A comparison with compression molded composites. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p. 415-422, 2009.

**APÊNDICES**

**Apêndice 1 – Parâmetros de calibração do método cromatográfico**

**Tabela 9 – Parâmetros de calibração do método cromatográfico utilizado para determinação dos ácidos fenólicos**

<b>Ácido fenólico</b>	<b>Curva analítica</b>	<b>Linearidade (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
Gálico	$y = (0,741x + 0,754) \times 10^5$	0,36 – 3,6	0,998
Protocateico	$y = (0,475x + 0,867) \times 10^5$	0,81 – 8,1	0,999
Clorogênico	$y = (0,455x + 1,798) \times 10^5$	1,23 – 12,3	0,999
Hidroxibenzóico	$y = (0,486x + 0,989) \times 10^5$	0,96 – 9,6	0,999
Cafeico	$y = (0,824x + 0,203) \times 10^5$	0,72 – 7,2	0,999
Siríngico	$y = (0,903x + 4,186) \times 10^5$	0,75 – 7,5	0,999
Vanilínico	$y = (1,265x + 2,199) \times 10^5$	0,54 – 5,4	0,999
Cumárico	$y = (1,512x + 1,119) \times 10^5$	0,57 – 5,7	0,999
Ferúlico	$y = (1,405x + 2,354) \times 10^5$	0,75 – 7,5	0,999

**Apêndice 2** – Tabelas da análise de regressão, equações dos modelos e tabelas da análise de variância do planejamento utilizando óleo essencial de orégano

**Tabela 10** – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta espessura

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p*
Constante	0,0720	0,0011	62,36	0,00
AM/PROT (L)	-0,0005	0,0007	-0,78	0,51
AM/PROT (Q)	0,0008	0,0008	0,95	0,43
OEO (L)	0,0000	0,0007	0,07	0,94
OEO (Q)	0,0003	0,0008	0,36	0,75
AM/PROT x OEO	-0,0012	0,0010	-1,25	0,33

\* $p \leq 0,05$  indica variável significativa a 95% de confiança

**Tabela 11** – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta opacidade

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p*
Constante	9,83	0,35	27,81	0,00
AM/PROT (L)	-0,07	0,21	-0,35	0,75
AM/PROT (Q)	-0,13	0,25	-0,51	0,65
OEO (L)	0,07	0,21	0,34	0,76
OEO (Q)	-0,13	0,25	-0,50	0,66
AM/PROT x OEO	-0,04	0,30	-0,13	0,90

\* $p \leq 0,05$  indica variável significativa a 95% de confiança

**Tabela 12** – Coeficiente de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta resistência à tração

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p*
Constante	7,58	0,37	20,25	0,00
AM/PROT (L)	-1,70	0,23	-7,44	0,01
AM/PROT (Q)	-0,06	0,27	-0,22	0,84
OEO (L)	-0,58	0,23	-2,54	0,12
OEO (Q)	-0,78	0,27	-2,88	0,10
AM/PROT x OEO	0,09	0,22	0,28	0,80

\* $p \leq 0,05$  indica variável significativa a 95% de confiança

$$\text{Resistência à tração} = 7,58 - 1,70 \text{ AM/PROT} - 0,06 \text{ AM/PROT}^2 - 0,58 \text{ OEO} - 0,78 \text{ OEO}^2 + 0,09 \text{ AM/PROT} \times \text{OEO}$$

**Tabela 13** – Análise de variância (ANOVA) para a resposta resistência à tração

Fonte de variação	Soma quadrática	GL	Média quadrática	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>
Regressão	29,69	5	5,94	1,25	5,05
Resíduos	23,72	5	4,75		
Falta de ajuste	22,88	3	7,63		
Erro puro	0,84	2	0,42		
TOTAL	53,42	10			

**Tabela 14** – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta alongação

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p*
Constante	62,36	0,85	73,06	0,00
AM/PROT (L)	2,38	0,52	4,55	0,04
AM/PROT (Q)	3,69	0,62	5,91	0,02
OEO (L)	15,85	0,52	30,28	0,00
OEO (Q)	15,40	0,62	24,66	0,00
AM/PROT x OEO	11,95	0,74	16,16	0,00

\*p ≤ 0,05 indica variável significativa a 95% de confiança

$$\text{Alongação} = 62,36 + 2,38 \text{ AM/PROT} + 3,69 \text{ AM/PROT}^2 + 15,85 \text{ OEO} + 15,40 \text{ OEO}^2 + 11,95 \text{ AM/PROT} \times \text{OEO}$$

**Tabela 15** – Análise de variância (ANOVA) para a resposta alongação

Fonte de variação	Soma quadrática	GL	Média quadrática	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>
Regressão	3954,83	5	790,97	1,29	5,05
Resíduos	3044,95	5	608,99		
Falta de ajuste	3040,58	3	1013,53		
Erro puro	4,37	2	2,19		
TOTAL	6999,79	10			

**Tabela 16** – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta solubilidade

<b>Fatores</b>	<b>Coeficiente de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>p*</b>
Constante	18,95	0,76	22,10	0,00
AM/PROT (L)	-4,59	0,47	-9,81	0,01
AM/PROT (Q)	2,07	0,56	3,70	0,06
OEO (L)	-3,92	0,47	-8,37	0,01
OEO (Q)	0,78	0,56	1,41	0,29
AM/PROT x OEO	2,16	0,66	3,27	0,08

\* $p \leq 0,05$  indica variável significativa a 95% de confiança

**Tabela 17** – Análise de variância (ANOVA) para a resposta solubilidade

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma quadrática</b>	<b>GL</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>F<sub>calc</sub></b>	<b>F<sub>tab</sub></b>
Regressão	291,26	2	145,63	9,99	4,46
Resíduos	116,51	8	14,56		
Falta de ajuste	113,01	6	18,84		
Erro puro	3,49	2	1,75		
TOTAL	407,77	10			

**Tabela 18** – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta permeabilidade

<b>Fatores</b>	<b>Coeficiente de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>p*</b>
Constante	0,20	0,006	30,52	0,00
AM/PROT (L)	-0,01	0,004	-3,38	0,07
AM/PROT (Q)	0,04	0,004	9,67	0,00
OEO (L)	-0,02	0,004	-5,84	0,02
OEO (Q)	-0,00	0,004	-1,66	0,23
AM/PROT x OEO	-0,00	0,005	0,86	0,47

\* $p \leq 0,05$  indica variável significativa a 95% de confiança

**Tabela 19** – Análise de variância (ANOVA) para a resposta permeabilidade

Fonte de variação	Soma quadrática	GL	Média quadrática	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>
Regressão	0,02	2	0,01	15,16	4,46
Resíduos	0,00	8	0,00		
Falta de ajuste	0,00	6	0,00		
Erro puro	0,00	2	0,00		
TOTAL	0,02	10			

**Tabela 20** – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta diferença total de cor

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p*
Constante	4,69	0,02	225,78	0,00
AM/PROT (L)	-0,70	0,01	-55,41	0,00
AM/PROT (Q)	0,12	0,01	8,26	0,01
OEO (L)	-0,49	0,01	-38,97	0,00
OEO (Q)	0,15	0,01	9,91	0,01
AM/PROT x OEO	0,20	0,02	11,51	0,00

\* $p \leq 0,05$  indica variável significativa a 95% de confiança

Diferença total de cor =  $4,96 - 0,70 \text{ AM/PROT} + 0,12 \text{ AM/PROT}^2 - 0,49 \text{ OEO} + 0,15 \text{ OEO}^2 + 0,20 \text{ AM/PROT} \times \text{OEO}$

**Tabela 21** – Análise de variância (ANOVA) para a resposta diferença total de cor

Fonte de variação	Soma quadrática	GL	Média quadrática	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>
Regressão	6,31	5	1,26	1,59	5,05
Resíduos	3,95	5	0,79		
Falta de ajuste	3,95	3	1,32		
Erro puro	0,00	2	0,00		
TOTAL	10,26	10			



**Apêndice 3** – Tabelas da análise de regressão, equações dos modelos e tabelas da análise de variância do planejamento utilizando extrato fenólico de pimenta rosa

**Tabela 22** – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta espessura

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(5)	p*
Constante	0,0780	0,0007	108,92	0,00
AM/PROT (L)	-0,0002	0,0004	-0,51	0,62
AM/PROT (Q)	0,0001	0,0005	0,35	0,73
EFP (L)	-0,0008	0,0004	-1,89	0,11
EFP (L)	0,0001	0,0005	0,35	0,73
AM/PROT x EFP	-0,0007	0,0006	-1,20	0,28

\*  $p \leq 0,05$  indica variável significativa a 95% de confiança

**Tabela 23** – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta resistência à tração

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p*
Constante	5,61	0,31	18,05	0,00
AM/PROT (L)	-0,39	0,19	-2,05	0,17
AM/PROT (Q)	0,05	0,22	0,25	0,82
EFP (L)	0,19	0,19	1,01	0,41
EFP (L)	0,71	0,22	3,12	0,08
AM/PROT x EFP	-0,28	0,26	-1,06	0,39

\*  $p \leq 0,05$  indica variável significativa a 95% de confiança

**Tabela 24** – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta opacidade

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p*
Constante	9,89	0,39	24,89	0,00
AM/PROT (L)	0,14	0,24	0,58	0,61
AM/PROT (Q)	-0,30	0,29	-1,06	0,39
EFP (L)	-0,12	0,24	-0,50	0,66
EFP (L)	-0,23	0,29	-0,81	0,50
AM/PROT x EFP	0,24	0,34	0,69	0,55

\*  $p \leq 0,05$  indica variável significativa a 95% de confiança

**Tabela 25** – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta permeabilidade

<b>Fatores</b>	<b>Coeficiente de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>p*</b>
Constante	5,61	0,31	18,05	0,00
AM/PROT (L)	-0,39	0,19	-2,05	0,17
AM/PROT (Q)	0,05	0,22	0,25	0,82
EFP (L)	0,19	0,19	1,01	0,41
EFP (L)	0,71	0,22	3,12	0,08
AM/PROT x EFP	-0,28	0,26	-1,06	0,39

\* $p \leq 0,05$  indica variável significativa a 95% de confiança

**Tabela 26** – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta alongação

<b>Fatores</b>	<b>Coeficiente de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>p*</b>
Constante	79,26	2,77	28,55	0,00
AM/PROT (L)	-24,19	1,70	-14,21	0,00
AM/PROT (Q)	20,15	2,03	9,92	0,01
EFP (L)	8,52	1,70	5,00	0,03
EFP (Q)	3,44	2,03	1,69	0,23
AM/PROT x EFP	-5,05	2,40	-2,10	0,17

\* $p \leq 0,05$  indica variável significativa a 95% de confiança

**Tabela 27** – Análise de variância (ANOVA) para a resposta alongação

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma quadrática</b>	<b>GL</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>F<sub>calc</sub></b>	<b>F<sub>tab</sub></b>
Regressão	7493,30	3	2497,77	5,95	4,35
Resíduos	2937,26	7	419,61		
Falta de ajuste	2891,04	5	578,21		
Erro puro	46,22	2	23,11		
TOTAL	10430,57	10			

**Tabela 28** – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta solubilidade

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p*
Constante	20,00	0,48	41,44	0,00
AM/PROT (L)	-1,38	0,29	-4,66	0,04
AM/PROT (Q)	0,21	0,35	0,61	0,60
EFP (L)	1,57	0,29	5,33	0,03
EFP (Q)	0,08	0,35	0,25	0,82
AM/PROT x EFP	-0,64	0,42	-1,54	0,26

\* $p \leq 0,05$  indica variável significativa a 95% de confiança

$$\text{Solubilidade} = 20,00 - 1,38 \text{ AM/PROT} + 1,57 \text{ EFP}$$

**Tabela 29** – Análise de variância (ANOVA) para a resposta solubilidade

Fonte de variação	Soma quadrática	GL	Média quadrática	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>
Regressão	35,05	2	17,53	4,49	4,46
Resíduos	31,23	8	3,90		
Falta de ajuste	29,83	6	4,97		
Erro puro	1,39	2	0,70		
TOTAL	66,29	10			

**Tabela 30** – Coeficientes de regressão, erro padrão e nível de significância para a resposta diferença total de cor

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p*
Constante	4,71	0,19	23,77	0,00
AM/PROT (L)	-1,43	0,12	-11,78	0,00
AM/PROT (Q)	0,00	0,14	0,02	0,98
EFP (L)	0,02	0,12	0,17	0,87
EFP (Q)	-0,003	0,14	-0,02	0,98
AM/PROT x EFP	0,04	0,17	0,27	0,80

\* $p \leq 0,05$  indica variável significativa a 95% de confiança

**Tabela 31** – Análise de variância (ANOVA) para a resposta diferença total de cor

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma quadrática</b>	<b>GL</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>F<sub>calc</sub></b>	<b>F<sub>tab</sub></b>
Regressão	16,38	1	16,38	330,3	5,12
Resíduos	0,45	9	0,05		
Falta de ajuste	0,38	7	0,05		
Erro puro	0,06	2	0,03		
TOTAL	16,83	10			