

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE FILMES INCORPORADOS
DE EXTRATOS NATURAIS E DETERMINAÇÃO DA OXIDAÇÃO EM
FILÉS DE TILÁPIA**

Camila Cheker Brandão Turella
Orientador: Prof. Dr. Moacir Evandro Lage

GOIÂNIA
2019



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Camila Cheker Brandão Turella

Título do trabalho: Desenvolvimento e avaliação de filmes incorporados de extratos naturais e determinação da oxidação em filés de tilápia

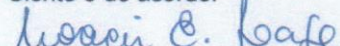
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 02 / 01/ 2020

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

CAMILA CHEKER BRANDÃO TURELLA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE FILMES INCORPORADOS
DE EXTRATOS NATURAIS E DETERMINAÇÃO DA OXIDAÇÃO EM
FILÉS DE TILÁPIA**

Tese para a obtenção do título de Doutor em
Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e
Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Área de Concentração:

Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de
Alimentos

Linha de Pesquisa:

Controle de Qualidade de Alimentos

Orientador:

Prof. Dr. Moacir Evandro Lage - EVZ/UFG

Comitê de Orientação:

Prof^a. Dr^a. Miriam Fontes Araújo Silveira -
EA/UFG

Prof^a. Dr^a. Cíntia Silva Minafra e Rezende -
EVZ/UFG

GOIÂNIA

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da
UFG.

Turella, Camila Cheker Brandão

Desenvolvimento e avaliação de filmes incorporados de
extratos naturais e determinação da oxidação em filés de tilápia
[manuscrito] / Camila Cheker Brandão Turella. - 2019. xvi, 85 f.:
il.

Orientador: Profa. Dra. Moacir Evandro Lage; co-orientadora
Miriam Fontes Araújo Silveira; co-orientador Dr. Cintia Silva
Minafra e Rezende.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Goiânia, 2019.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. acetato de celulose . 2. antioxidantes. 3. extratos naturais. 4.
pequi. I. Lage, Moacir Evandro, orient. II. Título.

CDU 664

1 ATA NÚMERO 279 DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-
2 GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA
3 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, REALIZADA POR **Camila Cheker Brandão Turella**.
4 Às 14h00min do dia 13/12/2019, reuniu-se na Sala de Defesas do Programa de Pós-Graduação em
5 Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Campus
6 Samambaia, nesta Capital, Goiânia, Goiás, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao
7 julgamento da Defesa de Tese de Doutorado apresentada pelo(a) Pós-Graduando(a) **Camila**
8 **Cheker Brandão Turella**, intitulada "Efeito de biofilmes ativos na oxidação lipídica e proteica
9 em filés de peixe", apresentada para a obtenção do Título de Doutor em Ciência Animal, junto à
10 Área de Concentração: **Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de Alimentos**, desta
11 Universidade. O(A) Presidente da Comissão Julgadora, **Prof. Dr. Moacir Evandro Lage**, iniciando
12 os trabalhos, concedeu a palavra ao(a) candidato(a) **Camila Cheker Brandão Turella**, para
13 exposição em **quarenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o(a) senhor(a) Presidente concedeu a
14 palavra, pela ordem sucessiva aos Examinadores, os quais passaram a arguir o(a) candidato(a),
15 durante o prazo máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder
16 aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a
17 Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o(a) candidato(a)

18 **Aprovado(a) ou Reprovado(a):**

19 Prof. Dr. Moacir Evandro Lage
20 Prof.ª Dr.ª Adriana Régia Marques de Souza
21 Prof.ª Dr.ª Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro Tenório
22 Prof. Dr. Raphael Rocha de Oliveira
23 Prof.ª Dr.ª Claudia Peixoto Bueno

APROVADA

APROVADA

aprovada

APROVADA

APROVADA

24 Em face ao resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o (a) candidato (a) **Camila Cheker**
25 **Brandão Turella**, HABILITADA [(Habilitado (a) ou não Habilitado (a))] pelo(s)
26 motivo(s) abaixo exposto(s):

27 _____
28 _____
29 _____
30 _____
31 _____
32 _____

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



33

34

35

36

37

38 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da tese:

39

40

41

42

43

44

45 Nada mais havendo a tratar, eu, **Prof. Dr. Moacir Evandro Lage**, lavrei a presente ata que, após
46 lida e achada conforme, foi por todos assinada.

47 Prof. Dr. Moacir Evandro Lage

48 Prof.^a Dr.^a Adriana Régia Marques de Souza49 Prof.^a Dr.^a Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro Tenório

50 Prof. Dr. Raphael Rocha de Oliveira

51 Prof.^a Dr.^a Claudia Peixoto Bueno

Moacir E. Lage

Adriana Régia Marques de Souza
Raphael Rocha de Oliveira
Claudia Peixoto Bueno

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, por ser meu grande suporte e me encher de bênçãos todos os dias, permitindo que verdadeiros anjos cruzassem meu caminho.

Aos meus pais e irmão, por terem sempre me apoiado, pela força, amor incondicional, compreensão e carinho de sempre.

Ao meu esposo, Fernando da Cruz Turella, por estar sempre ao meu lado, me incentivando cada dia a buscar o melhor de mim, me motivando. Não há palavras que expressem a minha gratidão por seu amor e companheirismo durante todos esses anos.

Às minhas amigas e parceiras de laboratório Pabline, Laíse, Maria Isabel e Francine, que me ajudaram e me fizeram dar muitas risadas.

À Luciana, que se tornou uma parceira fundamental durante meu experimento, obrigada pela dedicação.

Aos colaboradores do Laboratório de Físico-química do Centro de Pesquisa em Alimentos, ao Marcos, Wenderson, Alana, Letícia, Bianca e Hudson, por me auxiliarem, pela disposição e por compartilharem seus conhecimentos.

Aos técnicos de laboratório Deivis Carvalho e Tiago Dias, que se dedicaram ao meu experimento e me auxiliaram inúmeras vezes.

À técnica de laboratório e minha, amiga, Aline Medeiros Alves, que sempre me auxiliou doando o seu tempo e conhecimento.

Ao professor Moacir Evandro Lage, que sem me conhecer aceitou o convite para me orientar. Pelo tempo, apoio, paciência, carinho, conhecimento e compreensão durante esses quatro anos.

À professora Miriam Fontes Araújo Silveira, por ter se prontificado imediatamente em me ajudar a trabalhar com filmes de acetato de celulose.

À professora Cíntia Silva Minafra e Rezende, pela alegria, pela paciência, pela ajuda e pelo carinho que sempre teve comigo, desde a graduação. Minha admiração é imensa e eterna. Espero que eu possa me tornar um dia um pouco da professora que foi para mim.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás - Câmpus Inhumas pelo apoio e concessão da licença para o doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Ministério da Educação (MEC) pela bolsa concedida durante a maior parte da pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Escola de Veterinária e Zootecnia, pela possibilidade de participar do programa e de desenvolver a pesquisa de doutorado.

À Universidade Federal de Goiás, por ter me oportunizado cursar as diferentes fases do ensino superior, desde a graduação até o doutorado.

A todos os muitos outros que contribuíram acadêmica ou emocionalmente para que esse momento chegasse, meu muito obrigada!!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Embalagens biodegradáveis ativas	2
2.2. Oxidação lipídica em alimentos	6
2.3. Oxidação proteica em alimentos	8
2.4. Ação dos antioxidantes no processo oxidativo	12
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
CAPÍTULO 2 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS DE EXTRATOS NATURAIS DE ARATICUM, CAJAZINHO, AÇAFRÃO, CHÁ VERDE /ALECRIM E CASCA DE PEQUI	21
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1. Produção dos Extratos Naturais.....	25
2.2. Compostos Fenólicos.....	25
2.3. Potencial Antioxidante	25
2.4. Perfil Fenólico	26
2.5. Análise Estatística	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.CONCLUSÕES	33
5. REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DE FILMES ATIVOS BIODEGRADÁVEIS INCORPORADOS COM ANTIOXIDANTES NATURAIS E SINTÉTICO	38
1. INTRODUÇÃO	40
2. MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1. Elaboração dos biofilmes	43
2.2. Análise de Microscopia	43
2.3. Espessura dos filmes ativos	44
2.4. Permeabilidade ao CO ₂	44
2.5. Propriedades mecânicas.....	44
2.6. Preparação do extrato natural de casca de pequi	45
2.7. Produção dos filmes ativos	45

2.8. Análise de Migração	45
2.9. Análise Estatística	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1. Avaliação dos filmes de acetato de celulose	47
3.2. Análise de microscopia eletrônica de varredura.....	50
3.3. Avaliação dos filmes ativos.....	52
3.4. Análise de migração	55
4. CONCLUSÃO	57
5. REFERÊNCIAS	58
CAPÍTULO 4 – EFEITO DE FILMES DE ACETATO DE CELULOSE ATIVOS NA	
OXIDAÇÃO LIPÍDICA E PROTEICA DE FILÉS DE TILÁPIA (<i>OREOCHROMIS</i>	
<i>NILOTICUS</i>).....	
1. INTRODUÇÃO	62
2. MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1. Preparação do extrato natural de casca de pequi	66
2.2. Produção dos filmes ativos.....	66
2.3. Armazenamento dos filés de tilápia com os filmes ativos.....	67
2.4. Ensaios físico-químicos.....	67
2.5. Ensaios de oxidação.....	67
2.5.1 Oxidação proteica – carbonilas.....	67
2.5.2 Oxidação proteica - sulfidrilas	68
2.5.3. Oxidação lipídica – TBARS	69
2.6. Ensaios microbiológicos.....	69
2.6.1 <i>Salmonella</i> spp.....	69
2.6.2. <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	70
2.7. Análise Estatística	70
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
3.1 Análises físico-químicas.....	71
3.2 Análises de oxidação	72
3.3 Análises Microbiológicas	76
4. CONCLUSÃO	78
5. REFERÊNCIAS	79
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	
82	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1-	Ciclo do carbono em polímeros biodegradáveis.....	3
FIGURA 1.2-	Perfil de um filme ativo (a) contendo um revestimento com aditivo (b) contendo a incorporação de um aditivo.....	4
FIGURA 1.3-	Principais alterações ocorridas durante a oxidação proteica e produtos mais comuns formado.....	9
FIGURA 1.4-	Fórmula Estrutural das carbonilas AAS e GGS, provenientes da oxidação proteica.....	11
FIGURA 1.5-	Estrutura básica dos flavonoides.....	14
FIGURA 2.1-	Teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante dos extratos naturais.....	28
FIGURA 3.1-	Modelo de possíveis caminhos existentes na difusão de gases por um filme.....	41
FIGURA 3.2-	Migração dos antioxidantes naturais (chá verde/alecrim e casca de pequi) para os simulantes de água e de gordura.....	55
FIGURA 3.3-	Migração do BHA para os simulantes de água e gordura.....	56
FIGURA 4.1-	Valores para carbonila proteica (nmol/mg proteína) para os filés de peixe armazenados com filmes controle, com extrato de casca de pequi, com extrato de chá verde/alecrim e BHA.....	72
FIGURA 4.2-	Valores para sulfidril (nmol/mg proteína) nos filés de peixe armazenados com filmes controle, com extrato de casca de pequi, com extrato de chá verde/alecrim e BHA.....	74
FIGURA 4.3	Valores para TBARS (mg MDA/Kg amostra) nos filés de peixe armazenados com filmes controle, com extrato de casca de pequi, com extrato de chá verde/alecrim e BHA.....	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1-	Composição de tempo e fluxo de gradiente.....	26
TABELA 2.2-	Padrões de compostos fenólicos utilizados na análise.....	27
TABELA 3.1-	Composição dos filmes de acetato de celulose produzidos.....	43
TABELA 3.2-	Antioxidantes incorporados aos filmes de acetato de celulose.....	45
TABELA 3.3-	Valores de espessura e permeabilidade dos filmes de acetato de celulose ao CO ₂	47
TABELA 3.4-	Valores das análises de tração dos filmes com diferentes concentrações de acetato de celulose e tween 80.....	49
TABELA 3.5-	Espessura e permeabilidade ao CO ₂ dos filmes com incorporação de extrato de casca de pequi (P), extrato de chá verde/alecrim (CA), BHA (B) e filme controle (C).....	52
TABELA 3.6-	Valores das análises de tração dos filmes com incorporação de extrato de casca de pequi (P), extrato de chá verde/alecrim (CA), BHA (B) e filme controle (C).....	53
TABELA 4.1-	Antioxidantes incorporados aos filmes ativos.....	66
TABELA 4.2-	Valores de composição físico-química para os filés de peixe armazenados com filmes controle, com extrato de casca de pequi, com extrato de chá verde/alecrim e BHA, nos tempo 0 e com 15 dias de estocagem.....	71
TABELA 4.3-	Valores para <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g) e <i>Salmonella spp</i> para os filés de peixe armazenados com filmes controle, com extrato de casca de pequi, com extrato de chá verde/alecrim e BHA.....	77

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1.1-	Esquema demonstrando as três etapas da oxidação lipídica.....	6
QUADRO 1.2-	Energia de dissociação de ligação carbono-hidrogênio em ácidos graxos.....	7
QUADRO 1.3-	Esquema demonstrando as várias etapas da oxidação proteica.....	10
QUADRO 1.4-	Consequências da oxidação proteica em alimentos	12
QUADRO 3.1-	Microscopia eletrônica de varredura da superfície dos filmes.....	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

POOH	hidroperóxidos proteico
LOOH	hidroperóxidos
PO•	radicais alcoxil
POH	derivados hidroxil
LOO•	radical peroxil
L•	radical alquil
-CH ₂	metileno
AAS	α -aminoadípico
GGS	γ - glutâmico
ERO's	espécies reativas de oxigênio
ERN's	espécies reativas de nitrogênio
RSOOH	ácido sulfínico
RSSR	dissulfetos
AH	antioxidante
A•	radical antioxidante
OH	hidroxilas
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
TBHQ	butil hidroquinona terciária
BHT	hidroxitolueno butilato
BHA	butil-hidroxianisol
P	Pequi
C	Controle
CA	Chá verde/alecrim
GAE	Ácido gálico
TE	Trolox
EVOH	Álcool etileno vinílico
ASTM	American Society for Testing and Materials
ISO	International Organization for Standardization
MDA	Malonaldeído
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

RESUMO

Este estudo teve como objetivo produzir biofilmes ativos com ação antioxidante na conservação de filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Para isso, através de um delineamento inteiramente casualizado, foram produzidos extratos naturais de casca de pequi, araticum, cajazinho e açafrão. Todos os extratos foram avaliados em relação ao teor de compostos fenólicos e sua capacidade antioxidante. O extrato de casca de pequi obteve a maior capacidade antioxidante ($1.874 \mu\text{mol.g}^{-1}$), e seu perfil fenólico demonstrou que os principais compostos responsáveis por sua alta potência antioxidante foram os ácidos elágico, gálico e protocatéquico. Extratos de casca de pequi, chá verde/alecrim e BHA foram incorporados a filmes de acetato de celulose. Esses filmes foram analisados quanto à tensão máxima suportada, tensão na ruptura, força de perfuração, elongação, elasticidade, permeabilidade ao CO_2 , migração de compostos fenólicos em meios simulantes de gordura e água e microscopia eletrônica. Filmes com extrato de casca de pequi apresentaram boa resistência mecânica, com tensão à ruptura de 32,28MPa, uma migração gradativa e máxima de compostos fenólicos para o meio simulante em dois dias e, ainda, mostraram ser porosos e permeáveis a gases. Os filmes dos quatro tratamentos (controle, casca de pequi, chá verde/alecrim e BHA) foram utilizados para embalar filés de tilápia, que foram armazenados durante quinze dias a 4°C . O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, composto por quatro tratamentos e quatro repetições. Durante o período de estudo, análises de oxidação lipídica (TBARS) e proteica (carbonila e sulfidrilas) foram realizadas nos tempos 0, 4, 7, 10, 12 e 15 dias. Ao final deste período, os filmes com BHA e com extrato de casca de pequi foram os que conseguiram manter os filés com melhores índices oxidativos, demonstrando serem eficientes na prevenção da oxidação. Portanto, o extrato produzido de casca de pequi mostrou potente ação antioxidante e alta eficácia no combate à oxidação, podendo ser utilizado não apenas em peixes como em diversos alimentos.

Palavras-chave: acetato de celulose; antioxidantes; extratos naturais; pequi

ABSTRACT

This study aimed to produce active biofilms with antioxidant action in the conservation of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets. For this, by completely randomized design, natural extracts of pequi bark, araticum, cajazinho and saffron were extracted. All extracts were evaluated for phenolic compounds content and antioxidant capacity. The extract of pequi bark obtained the highest antioxidant capacity ($1,874 \mu\text{mol.g}^{-1}$), and its phenolic profile showed that the main compounds responsible for its high antioxidant power were ellagic, gallic and protocatechic acids. Pequi bark, green tea / rosemary extracts and BHA were incorporated into cellulose acetate films. These films were analyzed for maximum supported stress, tensile strength, perforation strength, elongation, elasticity, CO_2 permeability, migration of phenolic compounds in fat and water simulators and electron microscopy. Pequi bark extract films have good mechanical strength, with a rupture stress of 32.28MPa, a gradual and maximum migration of phenolic compounds to the simulating of two days, and also show to be porous and gas permeable. Films of four treatments (control, pequi bark, green tea / rosemary and BHA) were used to pack tilapia fillets, which were stored for 15 days at 4°C. The experiment was conducted in a randomized block design, consisting of four treatments and four replication. During the study period, the analysis of lipid (TBARS) and protein (carbonyl and sulfhydryl) oxidation were performed at times 0, 4, 7, 10, 12 and 15 days. At the end of this period, films with BHA and pequi bark extract were able to maintain the fillets with better oxidative rates, proving to be effective in preventing oxidation. Therefore, the extract produced from pequi bark showed potential antioxidant action and high effectiveness in combating oxidation, and can be used not only in fish but in various foods.

Keywords: cellulose acetate; rosemary; green tea; BHA; pequi bark

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

A utilização de embalagens começou com o armazenamento de alimentos em folhas, pele de animais e conchas. Há registros que em 5.000 anos antes de Cristo (a.C) surgiram os primeiros sacos de fibra, cestas e potes de cerâmica. No ano 1.500 a.C registrou-se o surgimento de utensílios feitos com vidro e no ano 900 a.C que se tem relatos do uso de papel para envolver e armazenar alimentos. O primeiro plástico, um polímero a base de celulose, surgiu em 1856 e só em 1907 que o plástico de baquelite (uma junção de fenol com formaldeído) foi desenvolvido¹.

O material escolhido para uma embalagem de alimento deve proteger seu conteúdo durante sua distribuição e armazenamento, além de ser não tóxico e versátil ao uso. A embalagem deve proteger o alimento do ambiente externo, além de fornecer informações úteis ao consumidor por meio de textos, logomarca e gráficos. Deve se adaptar ao estilo de vida do consumidor, sendo de fácil manipulação e, por fim, aperfeiçoar a eficiência logística através de sua forma e tamanho².

Foi pensando em estender a função de proteção, evitando doenças de origem alimentar e perdas econômicas por desperdício, que a ciência começou a pesquisar meios em que a embalagem pudesse ajudar na conservação dos alimentos³. Essa ação direta da embalagem na qualidade dos alimentos deu origem às embalagens ativas, que de acordo com seu objetivo (conservação química, microbiológica ou sensorial) irá interagir com o alimento em que estiver envolta².

Embalagens ativas são aquelas que têm incorporadas ao seu sistema componentes que irão manter ou estender a qualidade do alimento, ou seja, a embalagem é desenvolvida para interferir diretamente no produto ou no meio em que o produto se encontra^{4, 5}.

Diversos produtos podem ser utilizados na formação dos filmes ativos, dentre eles: polietileno de baixa densidade, cloreto de polivinila, quitosana, amido, celulose, ágar e outros⁶.

Nos filmes ativos os aditivos não são adicionados diretamente ao alimento, nessas embalagens há a liberação gradativa e continua dessas substâncias através do contato do filme com o alimento. O aditivo pode estar revestindo a camada interna da embalagem ou estar incorporado ao material da embalagem, a taxa de liberação dependerá da interação do aditivo com o material do revestimento ou da embalagem⁷.

Uma das maiores utilizações dos filmes ativos são na prevenção de processos oxidativos de alimentos. As reações oxidativas vêm ganhando atenção das pesquisas, demonstrando que produtos gerados através dessas reações podem influenciar a perda de vitaminas, perda dos ácidos graxos essenciais, no envelhecimento, diabetes, Alzheimer, câncer de cólon, dentre outros^{8,9}.

Por isso, com o objetivo de paralisar ou retardar essas reações utilizam-se os antioxidantes. Esses têm o papel de interromper a continuidade das reações ou impedir com que elas aconteçam¹⁰. Eles podem ser sintéticos (butil-hidroxianisol - BHA, hidroxitolueno butilato - BHT) ou naturais (ácido cítrico, ácido ascórbico, tocoferol) e, geralmente, são utilizados em pequenas quantidades¹¹.

Diante deste cenário, as embalagens ativas com incorporação de antioxidantes para a prevenção de processos oxidativos em alimentos vem cada vez sendo mais estudadas e aplicadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Embalagens biodegradáveis ativas

Com o desenvolvimento da indústria de alimentos, os materiais mais comuns utilizados para a fabricação de embalagens são o papel, o plástico, o vidro e o alumínio, sendo que os mais utilizados são os polímeros plásticos derivados do petróleo (ex. poliolefinas, poliésteres, poliamidas). Esse fato se deu em razão de suas inúmeras vantagens em relação aos outros materiais, como: flexibilidade, custo, proteção, resistência, boa propriedade de barreira e selabilidade^{12,13}.

A primeira preocupação em relação às funções das embalagens é sua segurança. Uma vez escolhido um material seguro, as primeiras pesquisas que surgiram foram para melhorar a funcionalidade, ou seja, as embalagens fisicamente deveriam ser mais eficientes tanto para o consumidor quanto para a logística. Diferentes formatos e materiais foram sendo desenvolvidos para um transporte mais eficiente, um melhor armazenamento, para uma abertura mais fácil e até para aumentar a conveniência do consumidor⁵.

Com o crescimento do mercado mundial e, conseqüentemente, o uso massivo dos polímeros sintéticos, um problema ambiental surgiu. A produção e o consumo indiscriminado desses materiais geraram uma alta quantidade de resíduos poluentes incompatíveis com a quantidade existente de aterros, de centrais de incineração e projetos de reciclagem.

A grande maioria dos materiais sintéticos é levada para aterros sanitários. Nesses locais, muitos anos são necessários para que o ambiente consiga degradar uma fração de seu

volume, além do fato de que a presença de alguns aditivos como corantes e plasticizantes nas embalagens, acaba sendo tóxica para o meio ambiente. Ao buscar a diminuição do uso dos aterros sanitários, centrais de incineração foram criadas, porém neste processo uma grande quantidade de energia é gasta, além de haver a liberação de dioxinas no ambiente, compostos altamente tóxicos¹⁴.

Diante desse cenário, diversas pesquisas começaram a ser realizadas a fim de se criar embalagens para alimentos que fossem atóxicas e biodegradáveis e, dessa forma, foram sendo desenvolvidos diversos biopolímeros utilizando-se amido, ágar, carragena, gelatina, quitosana, celulose, dentre outros^{15, 16}. Essas embalagens são compostas por polímeros biodegradáveis, ou seja, aqueles que sofrem decomposição por ação das enzimas de microrganismos, se transformando em gás carbônico (CO_2), metano (CH_4), água (H_2O) e compostos orgânicos. Possuem um ciclo de vida mais curto, ao se comparar com os polímeros derivados do petróleo (Figura 1.1)¹⁷.

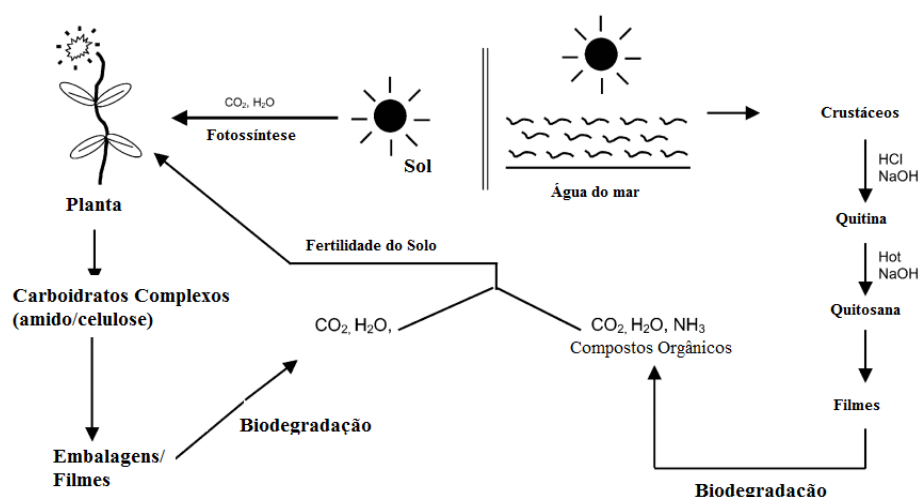


FIGURA 1.1 – Ciclo do carbono em polímeros biodegradáveis.
Fonte: Tharanathan¹⁸.

As primeiras embalagens biodegradáveis surgiram em 1950, porém na última década houve um aumento expressivo em pesquisa e desenvolvimento de materiais biodegradáveis provenientes de matéria-prima agrícola e, principalmente, de resíduos da agroindústria e da indústria de pescados, diminuindo o impacto ambiental^{18, 19}.

Existem dois tipos de polímeros biodegradáveis para embalagens: os comestíveis e os não comestíveis. Os polímeros não comestíveis são filmes produzidos por materiais biodegradáveis que envolvem os alimentos em forma de camadas. Já os comestíveis podem ser filmes, mas na sua maioria são revestimentos biodegradáveis que irão “banhar” toda a

superfície do alimento. A vantagem desse tipo de embalagem é que, além de proteção física e biodegradabilidade, ainda podem carregar aditivos, estabelecendo uma interação com os alimentos, como é o caso das embalagens ativas²⁰.

As embalagens ativas podem funcionar através de dois mecanismos: liberando substâncias que reagirão com os alimentos (ex. antioxidantes e antimicrobianos) ou absorvendo os compostos que irão reagir ou prejudicar os alimentos (ex. absorvedores de etileno, de oxigênio)²¹. Além de classificado pelo mecanismo de ação, as embalagens ativas ainda podem ser divididas em função do agente de ação, sendo químico ou biológico. Os agentes químicos agem na composição química dos alimentos ou na atmosfera da embalagem, enquanto os agentes biológicos agem em microrganismos ou reações biológicas⁵.

Ao se adicionar aditivos diretamente aos alimentos, seus efeitos podem ser brevemente cessados, em razão de perdas por lixiviação ou reações cruzadas com outros compostos presentes nos alimentos ou, ainda, uma vez misturados aos ingredientes podem apresentar pouca seletividade, diminuindo o efeito e não atingindo o objetivo de seu uso^{22, 23}.

Os filmes e revestimentos ativos vieram como uma alternativa, para que esses aditivos não fossem adicionados diretamente ao alimento. Nas embalagens ativas, a liberação deles ocorre continuamente através do contato do filme ou do revestimento com o alimento²⁴. O aditivo pode revestir o material da embalagem ou ser incorporado a ele (Figura 1.2). Quando há a incorporação do aditivo à embalagem, uma proteção externa deve ser acrescentada para evitar que o aditivo se perca para o meio externo⁷.

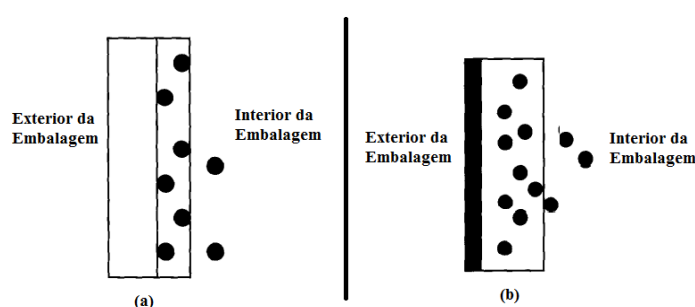


FIGURA 1.2 – Perfil de um filme ativo (a) contendo um revestimento com aditivo (b) contendo a incorporação de um aditivo.
Fonte: Cooksey⁷.

Na fabricação dos revestimentos ativos, os aditivos são misturados à matriz escolhida e ambos são dissolvidos em um solvente formando uma espécie de gel que irá ser usada como revestimento. Já para os filmes com incorporação de aditivos, o gel formado

(matriz+solvente+aditivo) é aplicado em placas de vidro e encaminhado para um sistema de secagem. Diversos aditivos podem ser utilizados na elaboração dos filmes ativos, a escolha ocorre de acordo com a reação que se quer prevenir. Os mais utilizados são os antioxidantes e os antimicrobianos²¹.

Para embalagens biodegradáveis comestíveis, utiliza-se como matriz ésteres de celulose, amido, amido hidroxipropilado, glúten, proteína de soja, proteínas do leite e zeína de milho²⁵. Essas embalagens realizarão o papel de prolongar a vida útil dos alimentos, por meio da diminuição da perda de umidade, das trocas de gases, da taxa de respiração e das reações oxidativas, além de terem a praticidade de serem comestíveis²⁶. Já as embalagens com materiais biodegradáveis não comestíveis são geralmente constituídas de alguns ésteres de celulose, poliésteres de origem microbiana, ácido polilático e combinações de polímeros biodegradáveis com amido¹⁸.

A celulose é o biopolímero mais abundante, podendo ser extraída de resíduos de madeira, do algodão, de folhas, de papel reciclado, cana de açúcar e outros materiais naturais. É um composto de estrutura linear, contendo glicoses unidas por ligações β 1-4 glicosídicas²⁷. Inúmeros polímeros biodegradáveis derivam da celulose. Quando dissolvido em hidróxido de sódio e dissulfeto de carbono em meio ácido produzem o celofane. Já pelo processo de esterificação são produzidos acetato de celulose, metilcelulose e hidroxipropil celulose. A maioria de seus derivados possui boa propriedade para formação de filmes transparentes, com boa flexibilidade, ao passo que suas desvantagens estão no fato de possuírem baixa resistência ao impacto, pouca barreira ao vapor d'água e seu custo de produção ainda é maior que os polímeros sintéticos^{17, 19}.

Essas embalagens ativas, biodegradáveis e com a incorporação de antioxidantes vêm sendo estudadas e têm se mostrado bastante eficientes na prevenção de processos oxidativos em alimentos¹⁶.

Independente de biodegradáveis ou não, as embalagens passam por uma série de caracterizações físicas. Todas as características como resistência à tração, porcentagem alongação, força de perfuração e elasticidade dependem da composição do filme, do equipamento de medição e das condições de medição (umidade relativa e temperatura)²⁹.

As embalagens tradicionais podem impedir que líquidos e gases entrem ou saiam da embalagem. Em embalagens biodegradáveis, esse grau de proteção e impedimento dependerá da função que se pretende. Os filmes, normalmente, envolvem o produto e recebem ainda outra embalagem externa como proteção, dessa forma, não precisam de alta resistência mecânica e baixa permeabilidade²⁸.

A adição de algumas substâncias podem influenciar algumas características mecânicas do filme, o uso de metil celulose demonstra aumentar a resistência mecânica de filmes. Já a adição de glicerol diminui as resistências mecânicas, mas aumenta a taxa de alongação e reduz a permeabilidade. Por isso, muitas vezes a constituição dos filmes dependerá da finalidade em que eles serão aplicados²⁸.

2.2. Oxidação lipídica em alimentos

Os lipídeos possuem grande importância na composição dos alimentos, em termos nutricionais (ácidos graxos essenciais), sensoriais (ajudam na palatabilidade), além de promoverem a saciedade e saúde (ácidos graxos poli-insaturados). Porém, sua presença torna o alimento mais susceptível a reações de oxidação, apresentando sinais como: odor e sabor desagradáveis, alteração de textura e cor, perda nutricional e, ainda, a formação de compostos tóxicos, reduzindo a vida útil do produto^{30, 31}.

A facilidade e a velocidade das reações de oxidação dependem de inúmeros fatores, tais como: quantidade e tipo de ácido graxo constituinte, concentração de oxigênio presente, umidade do produto, presença de pró-oxidantes, podendo ocorrer no alimento refrigerado e congelado³².

O processo de oxidação lipídica é iniciado quando um átomo de hidrogênio é retirado do grupo metileno da cadeia do ácido graxo, gerando produtos primários (os hidroperóxidos, que não possuem cor, odor ou sabor) e produtos secundários (vários compostos de baixo peso molecular, que possuem cor, odor e sabor desagradável)^{30, 33}.

De forma detalhada o processo de oxidação lipídica ocorre em três etapas: iniciação, propagação e terminação, como ilustra a Quadro 1.1³⁴.

QUADRO 1.1 – Esquema demonstrando as três etapas da oxidação lipídica.

Fonte: Johnson et al.³⁴

Iniciação $\text{LH} \rightarrow \text{L}^{\bullet} + \text{H}^{\bullet}$	Propagação $\text{L}^{\bullet} + {}^3\text{O}_2 \rightarrow \text{LOO}^{\bullet}$ $\text{LOO}^{\bullet} + \text{LH} \rightarrow \text{LOOH} + \text{L}^{\bullet}$	Terminação $\text{LOO}^{\bullet} + \text{L}^{\bullet} \rightarrow \text{LOOL}$ $\text{L}^{\bullet} + \text{L}^{\bullet} \rightarrow \text{LL}$
---	---	--

A etapa de iniciação começa quando um radical livre, extremamente reativo (espécies reativas de oxigênio - ERO's ou espécies reativas de nitrogênio - ERN's), buscando

a estabilidade energética, retira um hidrogênio do grupo metileno ($-\text{CH}_2$) de um ácido graxo poli-insaturado, gerando um radical alquil ($\text{L}\cdot$)³⁵.

A fase da propagação tem início como uma reação em cadeia. O radical alquil é instável e se liga ao oxigênio, formando um radical peroxil ($\text{LOO}\cdot$), que, por sua vez, buscando a estabilidade energética, retirará um hidrogênio de outro ácido graxo, gerando mais radicais livres. Os radicais peroxil ao retirarem um hidrogênio de outro ácido graxo formarão os hidroperóxidos (LOOH). Esses são os produtos primários da oxidação lipídica, são instáveis e se decompõem espontaneamente na presença de íons metálicos (ex. ferro, cobre), calor ou luz, gerando os produtos secundários da oxidação: aldeídos, cetonas, carbonetos, furanos, ésteres, álcoois, e são esses compostos que estão associados ao sabor, cor e odor desagradável³⁴.

A fase de terminação ocorre quando dois radicais se encontram e se ligam, formando um composto estável e não mais reativo. Cientistas afirmam que para que uma reação de terminação ocorra, as reações de propagação devem ter ocorrido mais de cem vezes até que dois radicais se encontrem⁹.

O hidrogênio que será abstraído por um radical livre dependerá da força de dissociação da ligação covalente (carbono – hidrogênio) a que ele pertence. Ácidos graxos poli-insaturados são mais susceptíveis a terem o seu hidrogênio abstraído, pois a ligação de dissociação do hidrogênio do grupo metileno (entre duplas ligações) é mais baixa, sendo mais fácil sua retirada (Quadro 1.2)³⁴.

QUADRO 1.2 – Energia de dissociação de ligação carbono-hidrogênio em ácidos graxos.
Fonte: Johnson e Decker³⁴.

Ligação Carbono-Hidrogênio	Energia de Dissociação da Ligação (kcal/mol)
Saturada	98
Mono-insaturada	89
Poli-insaturada (metileno entre duplas)	80

Os hidroperóxidos não causam a rancidez, eles sofrem cisão e formam os compostos secundários, como aldeídos, dienos conjugados, ésteres, dentre outros, promotores dos efeitos da oxidação. Os principais aldeídos formados nessas reações são os malondialdeídos (MDA), associados a doenças como arterosclerose, formação de alguns

cânceres, resistência à insulina e elevação da pressão arterial^{31, 36}. A acroleína, que apresenta toxicidade, destrói proteínas do DNA e o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), conhecido também por possuir propriedades tóxicas ao organismo e por se ligar a proteínas, inibindo-as de suas funções^{37, 38}.

Dessa forma, os estudos, além de demonstrar a suscetibilidade dos lipídeos, ainda demonstram a rapidez com que essas reações em cadeia ocorrem. A oxidação dos lipídeos ocorre em alimentos à temperatura ambiente, de refrigeração e também em alimentos congelados. O congelamento, muitas vezes, utilizado como meio de conservação dos alimentos, acaba não sendo eficaz para a oxidação, uma vez que, mesmo a temperaturas de -20°C é comprovada a presença de diversos produtos oriundos da oxidação lipídica^{36, 39}.

Quando se analisa alimentos altamente susceptíveis à oxidação de lipídeos, os pescados se destacam, isso porque, sua qualidade lipídica é uma grande vantagem em relação a outras carnes. Os peixes, são ricos em gorduras insaturadas e poli-insaturadas e contém baixos teores de colesterol. Já se demonstra que o consumo regular de pescados pode redução de risco de depressão pós-parto e mudanças de humor, diminuir níveis de triglicerídeos, pressão sanguínea, dentre outros⁴⁰.

Para que o benefício desses alimentos seja minimamente afetado, é necessário cada vez mais, o estudo de meios que interrompam ou impeçam o início dessas reações em lipídeos, conservando e distribuindo alimentos de qualidade sensorial e nutricional³¹.

2.3. Oxidação proteica em alimentos

Por muito tempo a oxidação lipídica foi considerada a principal reação de deterioração química em produtos cárneos. Só em meados de 1990 que, seguindo os estudos médicos, cientistas de alimentos focaram no estudo da oxidação de proteínas, seus processos, produtos e consequências nos alimentos e para o ser humano^{41, 42}.

Mesmo com os estudos crescentes, ainda há pouco sobre oxidação proteica em alimentos. Diversas podem ser as razões para esse fato, como: a complexidade química das reações, a falta de metodologias mais específicas e precisas e a falsa percepção que a oxidação lipídica e a contaminação microbiológica seriam as principais explicações para a deterioração de alimentos^{43, 44}.

Os produtos cárneos apresentam uma complexidade em sua composição proteica, e de acordo com o aminoácido alvo da oxidação, o agente oxidativo e a intensidade dos compostos pro-oxidativos, haverá a formação de diferentes produtos. Poderá ocorrer mudança na cadeia lateral das proteínas (com formação de carbonilas e hidroperóxidos de proteína),

fragmentação da cadeia proteica e a formação de ligações cruzadas (dissulfetos e ditirosina) (Figura 1.3)⁹. Além disso, os produtos cárneos também possuem uma composição susceptível às reações de oxidação, com altos teores de proteína, lipídeos insaturados e íons metálicos⁴⁵.

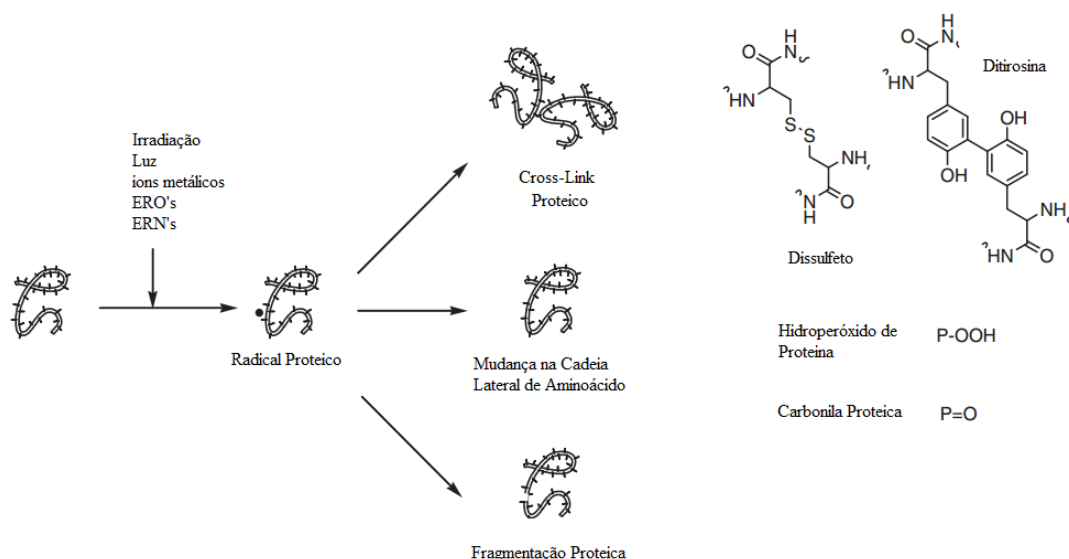


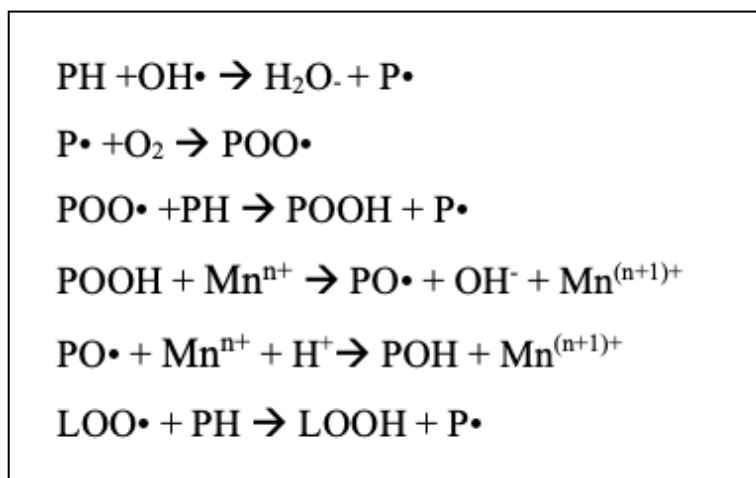
FIGURA 1.3 – Principais alterações ocorridas durante a oxidação proteica e produtos mais comuns formados.

Fonte: Lund et al.⁸

A oxidação proteica (Quadro 1.3) tem início quando as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO's e ERN's), buscando a estabilidade, retiram um hidrogênio da cadeia peptídica principal ou de aminoácidos de cadeias laterais, formando um radical proteico ($P\bullet$). Esse radical em presença de oxigênio formará rapidamente um radical peróxil ($POO\bullet$), que por sua vez, buscando a estabilidade, passará a “atacar” outro alvo proteico, formando um peróxido de alquil ou hidróperóxidos proteico ($POOH$)⁴³.

Metais de transição (Mn^{n+}) como cobre (Cu^+) e ferro (Fe^{2+}) também levam a formação de radicais alcóxil ($PO\bullet$) e derivados hidroxil (POH). Além disso, um radical peróxil ($LOO\bullet$), proveniente da oxidação lipídica, também pode atingir proteínas, formando um radical proteico ($P\bullet$)³¹.

QUADRO 1.3 – Esquema demonstrando as várias etapas da oxidação proteica.
Fonte: Falowo et al.²⁹.



Dentre os aminoácidos, a cisteína, a tirosina, a prolina, a arginina, a lisina, a metionina e a fenilalanina são os mais suscetíveis às espécies reativas⁴³. E dependendo do aminoácido atingido as reações e produtos poderão ser diferentes. Cadeias laterais dos aminoácidos contendo arginina, lisina e prolina são mais facilmente oxidadas com a ajuda de íons metálicos, formando carbonilas. Já quando são oxidados a cisteína ou metionina, há maior ocorrência de ligações cruzadas⁸.

Estudos ainda demonstram que alguns aminoácidos, como a metionina, são chamados de “protetores de sacrifício”, pois funcionam como antioxidantes, ou seja, reagem com as espécies reativas, tentando proteger os aminoácidos e ácidos graxos essenciais da oxidação em cadeia⁴³.

Os principais produtos formados, de forma irreversível, a partir da oxidação direta de proteínas, são as carbonilas (aldeídos e cetonas). Estudos mostram que sua formação ocorre através da presença de espécies reativas e metais de transição, sendo que de todas as carbonilas formadas, cerca de 70% são os semi-aldeídos α -aminoalípico (AAS) e o γ -glutâmico (GGS)⁸ (Figura 1.4)⁴³. Já se conseguiu determinar que a oxidação do aminoácido treonina e lisina geram os AAS e que a partir dos aminoácidos arginina e prolina os GGS. A partir dessas descobertas, alguns estudos já utilizam apenas esses dois compostos para a determinação da oxidação proteica em alimentos^{46, 47}.

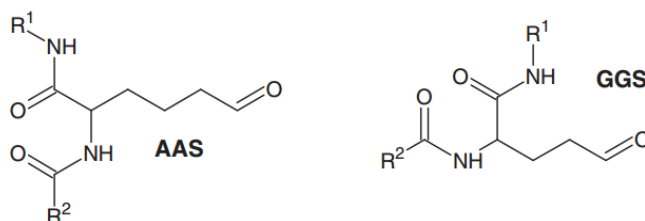


FIGURA 1.4 - Fórmula Estrutural das carbonilas AAS e GGS, provenientes da oxidação proteica.
Fonte: Lund et al.⁸.

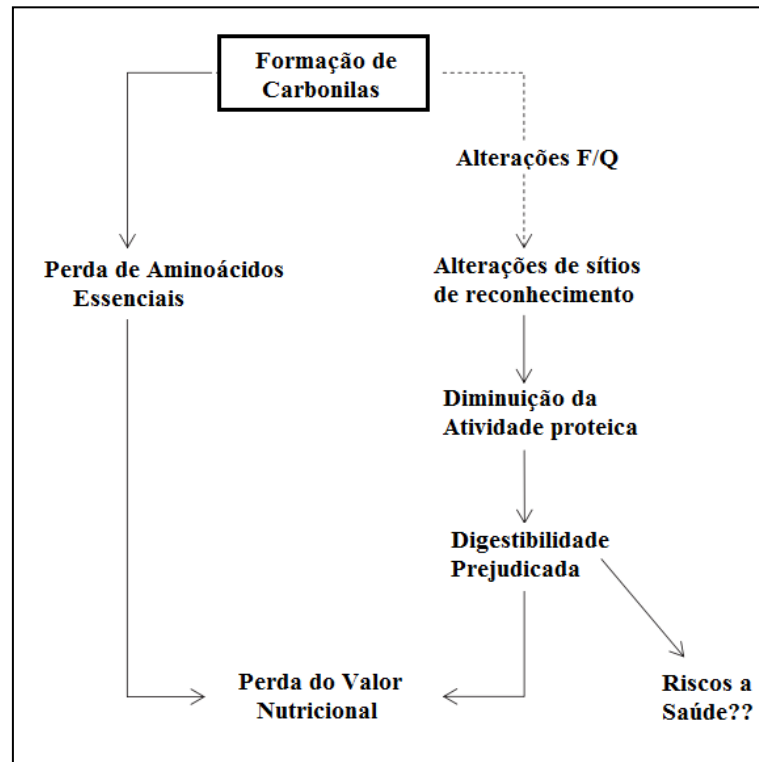
Além da formação de carbonilas, os radicais proteicos podem se ligar, formando inúmeras ligações cruzadas, ou seja, polimerizando proteínas e gerando diferentes compostos¹³.

Outra consequência da oxidação proteica é a perda de grupos sulfidríla. A oxidação desses grupos gera uma série de reações complexas resultando na formação de vários produtos como ácido sulfínico (RSOOH) e dissulfetos (RSSR) (formados em ligações cruzadas)⁸.

Estudos ainda demonstram que hidroperóxidos e radicais formados na oxidação lipídica podem iniciar a oxidação proteica ou até formar ligações cruzadas, assim como, ao ser iniciada a oxidação de proteína, radicais proteicos também poderão atingir lipídeos, intensificando a propagação das reações de oxidação^{9, 13}.

De forma geral, independentemente do produto gerado na oxidação proteica, os impactos nos alimentos são muitos e os riscos ainda são questionados e estudados. Diversas alterações já foram descobertas como perda da capacidade de retenção de água, perda da suculência, da funcionalidade proteica, alteração de coloração, diminuição do valor nutricional e da digestibilidade (Quadro 1.4)^{43, 48}.

QUADRO 1.4 – Consequências da oxidação proteica em alimentos.
Fonte: Estevez⁴³.



Quando se há produtos com alto valor proteico, essas alterações geradas pelos processos oxidativos são maiores. Dentre eles, os pescados possuem um teor de proteína alto (de 15 % a 25 %) e apresentam todos os aminoácidos essenciais. O consumo de 200g de filé de peixe, pode vir a suprir 100 % das necessidades diárias de cinco desses aminoácidos, dentre estes, os que se apresentam em maiores quantidades são a isoleucina e lisina. Além disso, se estimula o consumo de peixes em razão de sua boa digestibilidade (média de 96 %). Todos esses benefícios podem ser altamente reduzidos dependendo do nível de oxidação que o produto sofreu⁴⁰.

Ainda há a necessidade de maiores estudos que possam tornar mais claro as reações químicas ocorridas durante a oxidação proteica, seus produtos e consequências para a tecnologia de alimentos e para o ser humano⁴⁸.

2.4. Ação dos antioxidantes no processo oxidativo

Diante dos processos oxidativos e de seus efeitos deletérios aos alimentos, o uso dos antioxidantes se tornou um grande aliado na prevenção e na extensão da vida útil dos

alimentos. Os antioxidantes são definidos como substâncias que, presentes em baixa concentração, atrasam ou previnem os processos oxidativos nos alimentos^{49, 50}.

De uma forma geral, existem dois tipos de antioxidantes, os primários e os secundários. Os primários (principalmente os compostos fenólicos) agem doando hidrogênio ou se ligando aos primeiros radicais livres formados. Eles acabam prolongando a fase de iniciação e retardando a de propagação. Ao doarem um hidrogênio, os antioxidantes acabam se transformando em radicais livres, porém, em razão da ressonância de elétrons são suficientemente estáveis a ponto de não provocarem reações de iniciação ou propagação. Alguns exemplos de antioxidantes primários são: hidroxitolueno butilato - BHT, hidroxianisol butilato - BHA, tocoferol e flavanoides^{49, 51}.

Os antioxidantes secundários, na verdade, reforçam os efeitos dos antioxidantes primários, agindo como agentes sequestrantes (ex. EDTA, ácido cítrico) ou como agentes redutores (ex. ascorbatos). O exato mecanismo de ação desses antioxidantes ainda não está totalmente esclarecido, mas existem algumas teorias de que eles se ligam à pró-oxidantes, doam hidrogênio para os antioxidantes primários, se ligam às espécies reativas de oxigênio e absorvem a radiação UV^{49, 51}.

Existem ainda os antioxidantes primários que acumulam mais de uma função, ou seja, funcionam doando um hidrogênio, mas também absorvendo energia da radiação UV, se ligando a metais ou sequestrando oxigênio. Exemplos desses antioxidantes primários multifuncionais são propil galato e ácido ascórbico⁴⁹.

Existe uma variedade de antioxidantes, podendo ser sintéticos ou naturais. Os sintéticos, usados já há muitos anos pela indústria de alimentos, possuem um baixo valor comercial e apresentam uma alta eficiência. Porém, com o passar dos anos, pesquisas apontaram que seu uso em alimentos poderia ter um efeito tóxico e carcinogênico para o ser humano. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais utilizados são: BHA, BHT, propil galato e butil hidroquinona terciária (TBHQ)⁵²⁻⁵⁴.

Os antioxidantes naturais começaram a ser cada vez mais pesquisados para que pudessem ser uma alternativa e substituíssem os sintéticos com a mesma eficiência. Eles são extraídos de plantas, ervas, temperos, frutas e sementes^{24, 31, 52}. A ação antioxidante desses compostos naturais ocorre graças à presença de vitaminas e compostos fitoquímicos. Esses possuem uma complexa e vasta divisão, dentre eles estão os flavonoides, carotenoides, taninos, cumarinas e vários outros^{50, 51, 55}.

Um dos principais fitoquímicos, metabólitos secundários em plantas, são os compostos fenólicos. A propriedade em comum de todos esses compostos é a habilidade de

quebrar a cadeia de reações oxidativas ao doar um átomo de hidrogênio ou ao se ligarem a íons metálicos. O poder antioxidante de cada grupo dependerá de sua estrutura química, da quantidade e da posição em que se encontram as hidroxilas (OH) presentes. Um exemplo de estrutura química desses compostos é a de um flavonoide, que consiste em dois anéis benzeno (A e B) ligados a um anel heterocíclico (C) (Figura 1.5)^{50, 56}.

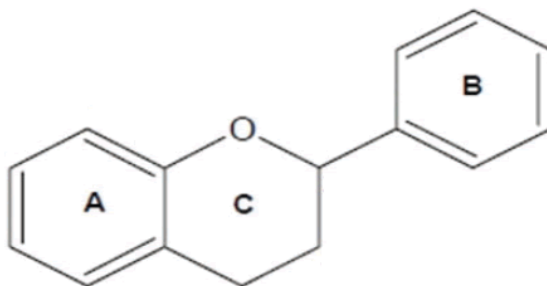


FIGURA 1.5 – Estrutura básica dos Flavonoides.
Fonte: Silva et al.⁵⁶

Dessa forma, dependendo da matéria-prima em que o antioxidante for extraído (ervas, frutas, sementes, temperos), serão diferentes as combinações de compostos fitoquímicos, as estruturas químicas e, conseqüentemente, cada um possuirá um potencial antioxidante.

Os compostos antioxidantes de frutas, ervas, especiarias podem ser removidos das plantas como extratos, óleos essenciais ou resinas. Os extratos terão frações removidas por serem solúveis em fase aquosa, álcool, solvente ou CO₂ supercrítico. Já os óleos essenciais são isolados por destilação a vapor, extração com solvente ou CO₂. E as resinas são solúveis em solventes orgânicos⁵⁶.

Extratos de frutas, cereais e ervas demonstram ser ricos em antioxidantes, em ácido ascórbico, tocoferóis, carotenoides e em fenólicos, gerando alta atividade antioxidante em sistemas modelos *in vitro* e *in vivo*. Quando olhamos os frutos da savana brasileira, conhecida como Cerrado, estes estão sendo cada dia mais investigados e estão demonstrando grandes fontes potenciais de substâncias antioxidantes, como por exemplo a cagaita, caju do cerrado, gabirola e pequi^{56, 57}.

Independentemente do poder antioxidante (AH) de cada composto, sua ação ocorre quando há a doação de um átomo de hidrogênio ao radical, sendo que o radical antioxidante (A•) formado se ligará a outro radical ou se estabilizará por rearranjo de elétrons em sua estrutura^{11, 58}.

Estudos demonstram que a interrupção da oxidação proteica é mais difícil e menos estudada que a oxidação lipídica. A dificuldade está no fato de que a interrupção da oxidação em proteínas é influenciada não apenas pela estrutura química ou a quantidade e localização das hidroxilas no antioxidante, mas também aparenta depender do aminoácido alvo e da localização do aminoácido na cadeia peptídica⁸.

Dessa forma, estudos devem ser realizados para avaliar a eficácia do antioxidante no produto sob análise, uma vez que são inúmeros os antioxidantes e seus potenciais, podendo resultar em diferentes efeitos para cada tipo de oxidação⁸.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Miller KS, Krochta JM. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 1997;8(7):228-37.
2. Ghaani M, Cozzolino CA, Castelli G, Farris S. An overview of the intelligent packaging technologies in the food sector. *Trends in Food Science & Technology*. 2016;51:1-11.
3. Vergis J, Gokulakrishnan P, Agarwal RK, Kumar A. Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015;55(10):1320-3.
4. Lee SY, Lee SJ, Choi DS, Hur SJ. Current topics in active and intelligent food packaging for preservation of fresh foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015;95(14):2799-810.
5. Brockgreitens J, Abbas A. Responsive Food Packaging: Recent Progress and Technological Prospects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016;15(1):3-15.
6. Kerry JP, O'Grady MN, Hogan SA. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*. 2006;74(1):113-30.
7. Cooksey K. Antimicrobial food packaging materials. *Additives for Polymers*. 2001;2001(8):6-10.
8. Lund MN, Heinonen M, Baron CP, Estevez M. Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2011;55(1):83-95.
9. Estevez M. Oxidative damage to poultry: from farm to fork. *Poultry Science*. 2015;94(6):1368-78.
10. Bernardi DM, Bertol TM, Pflanzner SB, Sgarbieri VC, Pollonio MAR. omega-3 in meat products: benefits and effects on lipid oxidative stability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016;96(8):2620-34.
11. Zamora R, Hidalgo FJ. The triple defensive barrier of phenolic compounds against the lipid oxidation-induced damage in food products. *Trends in Food Science & Technology*. 2016;54:165-74.
12. Gomez-Guillen MC, Perez-Mateos M, Gomez-Estaca J, Lopez-Caballero E, Gimenez B, Montero P. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science & Technology*. 2009;20(1):3-16.
13. Zhang YC, Rempel C, Liu Q. Thermoplastic Starch Processing and Characteristics-A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2014;54(10):1353-70.
14. Srinivasa PC, Tharanathan RN. Chitin/chitosan - Safe, ecofriendly packaging materials with multiple potential uses. *Food Reviews International*. 2007;23(1):53-72.

15. Rhim JW, Park HM, Ha CS. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science*. 2013;38(10-11):1629-52.
16. Belan DL, Mopera LE, Flores FP. Development and characterisation of active antioxidant packaging films. *International Food Research Journal*. 2019;26(2):411-20.
17. Peelman N, Ragaert P, De Meulenaer B, Adons D, Peeters R, Cardon L, et al. Application of bioplastics for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*. 2013;32(2):128-41.
18. Tharanathan RN. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*. 2003;14(3):71-8.
19. Galgano F, Condeli N, Favati F, Di Bianco V, Peretti G, Caruso MC. Biodegradable packaging and edible coating for fresh-cut fruits and vegetables. *Italian Journal of Food Science*. 2015;27(1).
20. Koshy RR, Mary SK, Thomas S, Pothan LA. Environment friendly green composites based on soy protein isolate - A review. *Food Hydrocolloids*. 2015;50:174-92.
21. Gomez-Estaca J, Lopez-de-Dicastillo C, Hernandez-Munoz P, Catala R, Gavara R. Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*. 2014;35(1):42-51.
22. Gemili S, Yemenicioglu A, Altinkaya SA. Development of antioxidant food packaging materials with controlled release properties. *Journal of Food Engineering*. 2010;96(3):325-32.
23. Irkin R, Esmer OK. Novel food packaging systems with natural antimicrobial agents. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*. 2015;52(10):6095-111.
24. Castillo LA, Farenzena S, Pintos E, Rodriguez MS, Villar MA, Garcia MA, et al. Active films based on thermoplastic corn starch and chitosan oligomer for food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*. 2017;14:128-36.
25. Krochta JM, DeMulderJohnston C. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technology*. 1997;51(2):61-74.
26. Ferreira MS, Fai AEC, Andrade CT, Picciani PH, Azero EG, Goncalves EC. Edible films and coatings based on biodegradable residues applied to acerolas (*Malpighia puniceifolia* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016;96(5):1634-42.
27. Wu YH, Luo XG, Li W, Song R, Li J, Li Y, et al. Green and biodegradable composite films with novel antimicrobial performance based on cellulose. *Food Chemistry*. 2016;197:250-6.
28. Paunonen S. Strength and Barrier Enhancements of Cellophane and Cellulose Derivative Films: A Review. *Bioresources*. 2013;8(2):3098-121.
29. Cazon P, Vazquez M. Mechanical and barrier properties of chitosan combined with other components as food packaging film. *Environmental Chemistry Letters*.

30. Tian F, Decker EA, Goddard JM. Controlling lipid oxidation of food by active packaging technologies. *Food & Function*. 2013;4(5):669-80.
31. Falowo AB, Fayemi PO, Muchenje V. Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Research International*. 2014;64:171-81.
32. Naveena BM, Muthukumar M, Muthulakshmi L, Anjaneyulu ASR, Kondaiah N. Effect of different cooking methods on lipid oxidation and microbial quality of vacuum-packaged emulsion products from chicken. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2014;38(1):39-47.
33. Zadeh EM, O'Keefe SF, Kim YT. Lignin-Based Biopolymeric Active Packaging System for Oil Products. *Journal of Food Science*. 2019;84(6):1420-6.
34. Johnson DR, Decker EA. The Role of Oxygen in Lipid Oxidation Reactions: A Review. *Annual Review of Food Science and Technology*, Vol 6. 2015;6:171-90.
35. Prisacaru AE. Effect of antioxidants on polyunsaturated fatty acids - review. *Acta Scientiarum Polonorum-Technologia Alimentaria*. 2016;15(2):121-9.
36. Palmeira KR, Marsico ET, Monteiro MLG, Lemos M, Conte CA. Ready-to-eat products elaborated with mechanically separated fish meat from waste processing: challenges and chemical quality. *Cyta-Journal of Food*. 2016;14(2):227-38.
37. Min B, Ahn DU. Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products - A review. *Food Science and Biotechnology*. 2005;14(1):152-63.
38. Pizzimenti S, Ciamporzero E, Daga M, Pettazzoni P, Arcaro A, Cetrangolo G, et al. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Frontiers in Physiology*. 2013;4.
39. Utrera M, Morcuende D, Estevez M. Temperature of frozen storage affects the nature and consequences of protein oxidation in beef patties. *Meat Science*. 2014;96(3):1250-7.
40. Maciel EDS. Perspectiva do consumidor perante produto proveniente da cadeia produtiva de tilápia do Nilo rastreada (*Oreochromis niloticus*) – consumo de pescado e qualidade de vida. Piracicaba: Universidade de São Paulo; 2011.
41. Guyon C, Meynier A, de Lamballerie M. Protein and lipid oxidation in meat: A review with emphasis on high-pressure treatments. *Trends in Food Science & Technology*. 2016;50:131-43.
42. Estevez M, Luna C. Dietary Protein Oxidation: A Silent Threat to Human Health? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016;56(ONLINE).
43. Estevez M. Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Science*. 2011;89(3):259-79.
44. Yahaya WAW, Abu Yazid N, Azman NAM, Almajano MP. Antioxidant Activities and Total Phenolic Content of Malaysian Herbs as Components of Active Packaging Film in Beef Patties. *Antioxidants*. 2019;8(7).

45. Utrera M, Parra V, Estevez M. Protein oxidation during frozen storage and subsequent processing of different beef muscles. *Meat Science*. 2014;96(2):812-20.
46. Villaverde A, Estevez M. Carbonylation of Myofibrillar Proteins through the Maillard Pathway: Effect of Reducing Sugars and Reaction Temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61(12):3140-7.
47. Utrera M, Estevez M. Impact of trolox, quercetin, genistein and gallic acid on the oxidative damage to myofibrillar proteins: The carbonylation pathway. *Food Chemistry*. 2013;141(4):4000-9.
48. Soladoye OP, Juarez ML, Aalhus JL, Shand P, Estevez M. Protein Oxidation in Processed Meat: Mechanisms and Potential Implications on Human Health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2015;14(2):106-22.
49. Budilarto ES, Kamal-Eldin A. The supramolecular chemistry of lipid oxidation and antioxidation in bulk oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2015;117(8):1095-137.
50. Nayak B, Liu RH, Tang JM. Effect of Processing on Phenolic Antioxidants of Fruits, Vegetables, and Grains-A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015;55(7):887-918.
51. Tian F, Decker EA, Goddard JM. Controlling Lipid Oxidation via a Biomimetic Iron Chelating Active Packaging Material. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61(50):12397-404.
52. Moudache M, Colon M, Nerin C, Zaidi F. Phenolic content and antioxidant activity of olive by-products and antioxidant film containing olive leaf extract. *Food Chemistry*. 2016;212:521-7.
53. Liu F, Avena-Bustillos RJ, Chiou BS, Li Y, Ma Y, Williams TG, et al. Controlled-release of tea polyphenol from gelatin films incorporated with different ratios of free/nanoencapsulated tea polyphenols into fatty food simulants. *Food Hydrocolloids*. 2017;62:212-21.
54. Jiang J, Xiong YLL. Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. *Meat Science*. 2016;120:107-17.
55. Maqsood S, Benjakul S, Shahidi F. Emerging Role of Phenolic Compounds as Natural Food Additives in Fish and Fish Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2013;53(2):162-79.
56. Silva L, Martins L, Bantim I, Meireles de Deus M, Ferreira P, Peron A. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. *Acta Toxicológica Argentina*. 2015;23(1):36-43.
57. Soares M, Welter L, Gonzaga L, Lima A, Mancini J, Fett R. Evaluation of antioxidant activity and identification of phenolic acids present in the pomace of Gala variety apples. *Ciencia E Tecnologia De Alimentos*. 2008;28(3):727-32.

58. Aluyor EO, Ori-Jesu M. The use of antioxidants in vegetable oils - A review. *African Journal of Biotechnology*. 2008;7(25):4836-42.

CAPÍTULO 2 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS DE EXTRATOS NATURAIS DE ARATICUM, CAJAZINHO, AÇAFRÃO, CHÁ VERDE/ALECRIM E CASCA DE PEQUI

RESUMO

O objetivo deste estudo foi produzir extratos naturais e avaliar potencial antioxidante e o teor de compostos fenólicos de extratos de chá verde/alecrim, araticum, cajazinho, açafrão e pequi. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com análises em triplicata. Todos os vegetais foram congelados, liofilizados e processados em metanol 70% para a obtenção dos extratos finais. Os dados dos extratos para fenólicos e antioxidantes foram submetidos à análise de variância, seguida de comparação das médias por Tukey com 5% de probabilidade. O extrato de casca e mesocarpo de pequi foi o de maior teor de compostos fenólicos (15.250,3mg GAE.100g⁻¹) e capacidade antioxidante (1.874 µmol.g⁻¹). Outro extrato analisado e com bons resultados foi o extrato comercial de chá verde/alecrim que apresentou para compostos fenólicos 2.048,2mg GAE.100g⁻¹ e capacidade antioxidante 347,96 µmol.g⁻¹. Em razão de seu alto potencial na prevenção dos processos oxidativos, foi realizado o perfil fenólico do extrato de casca de pequi. Os resultados indicaram que os responsáveis no pequi por sua alta capacidade antioxidante são os seguintes compostos: ácido elágico, ácido protocatéquico e ácido gálico. Portanto, a casca de pequi demonstra ser um bom aliado no combate aos processos oxidativos, devido a sua grande fonte de antioxidantes.

Palavras-chave: oxidação; ácido elágico; ácido gálico; perfil fenólico.

CHAPTER 2- ANTIOXIDANT CAPACITY AND PHENOLIC COMPOUNDS OF NATURAL EXTRACTS OF ARATICUM, CAJAZINHO, SAFFRON, GREEN TEA / ROSEMARY AND PEQUI BARK

ABSTRACT

The aim of this study was to produce natural extracts of araticum, cajazinho, saffron and pequi bark and evaluate their antioxidant potential and the content of phenolic compounds. The experiment was conducted in a completely randomized design with triplicate analysis. All natural products were frozen, lyophilized and processed in 70% methanol to obtain the final extracts. Extract data for phenolics and antioxidants were analyzed by analysis of variance, followed by Tukey averages comparison with 5% probability. The pequi bark extract was the one with the highest content of phenolic compounds (15,250.3mg GAE.100g⁻¹) and antioxidant capacity (1,874 $\mu\text{mol.g}^{-1}$). Another extract analyzed and with good results was the commercial extract of green tea / rosemary that presented for phenolic compounds 2,048.2mg GAE.100g⁻¹ and antioxidant capacity 347.96 $\mu\text{mol.g}^{-1}$. Due to its high potential in the prevention of oxidative processes, the phenolic profile of pequi bark extract was performed. The results indicated that those responsible for pequi high antioxidant capacity are: ellagic acid, protocatechic acid and gallic acid. Therefore, pequi bark proves to be a good ally in combating oxidative processes, due to its great source of antioxidants.

Keywords: oxidation; ellagic acid; gallic acid; phenolic profile.

1. INTRODUÇÃO

A deterioração de alimentos frescos é uma preocupação para a indústria de alimentos, pois uma vez ocorrendo, diminui significativamente a qualidade do produto, principalmente quanto ao odor, sabor e textura. Uma das principais reações de deterioração química são as reações de oxidação ¹.

Para conter essas reações são utilizados antioxidantes, substâncias que em baixas concentrações, em relação ao substrato, previnem ou retardam a oxidação do substrato (lipídeos e/ou proteínas)^{2, 3}.

A indústria de alimentos utiliza antioxidantes sintéticos, como tert-butil-hidroquinona (TBHQ), butil-hidroxianisol (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT) para contenção desses processos. O baixo custo e a eficácia comprovada desses compostos resultaram na ampliação de sua utilização⁴, porém pesquisas demonstraram que estes são responsáveis por vários danos à saúde, tais como: danos ao fígado, pulmão e desenvolvimento de alguns tipos de câncer em animais de laboratório^{5, 6}.

Surgiu, assim, a necessidade de substituição destes compostos sintéticos por antioxidantes naturais, que comprovassem eficácia similar. Com o interesse da indústria por essa substituição, pesquisas sobre antioxidantes oriundos de frutas e ervas surgiram⁷.

Os antioxidantes podem ser divididos por função (sequestradores de radicais livres, inibidores de oxidantes ou agentes quelantes), por polaridade ou mecanismo de ação^{2, 8}.

A atividade antioxidante de compostos naturais é, muitas vezes, atribuída a alguns componentes como: carotenóides, flavonóides e compostos fenólicos. Muitas frutas e ervas destacam-se quanto ao teor de polifenóis (ácidos fenólicos, flavonóides incluindo antocianinas, taninos, lignanas, estilbenos e cumarinas). Dependendo da composição e distribuição desses compostos, alguns alimentos possuem maior potencial que outros. Geralmente, os extratos obtidos dos vegetais (liofilizados ou não) são os mais utilizados em alimentos ⁹.

Algumas ervas apresentam propriedades antioxidantes, dentre as quais pode-se citar o chá verde, chá preto, chá oolong, alecrim e açafrão ¹⁰⁻¹². Várias frutas regionais que também possuem alto teor de compostos fenólicos, como pequi (casca e mesocarpo), araticum e cajazinho ainda são pouco exploradas.

O pequi é da família *Caryocaraceae*, presente largamente na América Central e do Sul. No Brasil é um fruto muito importante para a região centro-oeste. Mais de vinte e cinco espécies foram catalogadas e sua estrutura é composta por um epicarpo verde (fina casca), um mesocarpo externo (não comestível), um mesocarpo interno (comestível - polpa),

um endocarpo (possui espinhos) e semente. A parte que possui maior volume do fruto, cerca de 70-75%, é a parte não comestível (epicarpo e mesocarpo externo), e por isso, não utilizada¹³. Poucos estudos trabalham com a casca e mesocarpo deste fruto, por ele ser considerado um resíduo descartável.

Buscando valorizar os frutos do bioma Cerrado, este estudo teve como objetivo produzir extratos naturais de araticum, cajazinho, açafraão e casca de pequi e avaliar o potencial antioxidante, bem como o teor de fenólicos destes extratos. O perfil fenólico do extrato com maior capacidade antioxidante demonstrará os fenólicos responsáveis pela capacidade. Os resultados serão comparados aos do extrato natural industrializado de chá verde/alecrim.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Produção dos Extratos Naturais

Foram adquiridos de produtores do estado de Goiás o pequi, açafraão, cajazinho e araticum. O experimento foi realizado na Faculdade de Nutrição, da Universidade Federal de Goiás.

Para realização do extrato de casca de pequi, o pequi teve a casca separada da polpa e a polpa descartada. O açafraão foi utilizado integralmente, assim como o araticum. Para o cajazinho dois tipos de extratos foram produzidos, sendo um com o cajazinho processado integralmente (com caroço) e outro apenas com a polpa (sem caroço).

Os extratos metanólicos foram produzidos segundo Alves et al.¹⁵. Cada produto foi congelado a -18°C e, posteriormente, fracionado em pequenos pedaços e liofilizado por 48 horas. Homogeneizou-se 0,5 g de amostra liofilizada em 25 mL de metanol/ água (70:30 v/v), em agitador magnético por 2 horas a 4°C. Posteriormente, o extrato obtido foi filtrado em papel de filtro e acondicionado em frasco de vidro âmbar até o momento da análise.

Foi cedido, pela parceria com a empresa Kemin Industries®, um extrato natural comercial industrializado elaborado a partir do chá verde e do alecrim (FORTIUM RGT 12 Plus Dry).

2.2. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos foram analisados de acordo com Singleton e Rossi¹⁶ e quantificados utilizando uma curva padrão de ácido gálico (20 – 100mg/L).

Uma alíquota de 0,25 mL dos extratos foi misturada com 2,75 mL do reagente de Folin- Ciocalteu a 3%. Após 5 minutos à temperatura ambiente, 0,25 mL de solução de carbonato de sódio (10%) foi adicionada, e a mistura, mantida à temperatura ambiente, com luminosidade controlada, por 60 minutos. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 765 nm.

Os resultados foram expressos em miligramas de ácido gálico (GAE) por 100g de amostra liofilizada (mgGAE.100g⁻¹AL).

2.3. Potencial Antioxidante

A análise do potencial antioxidante foi realizada pelo método de DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazila)¹⁷, utilizando uma curva padrão de trolox (0 - 1000µmol/ L).

Uma alíquota de 0,10 mL dos extratos foi misturada com 3,90 mL do reagente de DPPH. A mistura foi mantida à temperatura ambiente, por duas horas, com luminosidade

controlada. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 517 nm.

Os resultados foram expressos em μmol equivalente de trolox (TE) por grama de amostra liofilizada ($\mu\text{molTE.g}^{-1}\text{AL}$).

2.4. Perfil Fenólico

O extrato natural que apresentou os melhores resultados para compostos fenólicos e capacidade antioxidante, foi avaliado quanto ao perfil fenólico e comparado com a literatura do perfil do chá verde e alecrim (extrato industrializado).

A análise de perfil fenólico foi realizada pelo CRTI (Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação), por metodologia própria. A análise qualitativa foi desenvolvida por espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS), utilizando os equipamentos Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000, Thermo Scientific, com coluna Agilent - C18 (4,6 x 100mm; 3 μm), acoplado ao espectrômetro de Massas de Alta Resolução Q-Exactive (MS), Thermo Scientific, com ionização por electrospray (H-ESI), operando em modo negativo, utilizando voltagem do spray 4 kV, gás de bainha 30, gás auxiliar 10, temperatura do capilar de 350°C, temperatura de gás auxiliar 250 °C, *tube lens* 55 e faixa de massas m/z 150-700. A análise por CLAE foi realizada com água deionizada acidificada com 0,1% de ácido fórmico (Fase móvel A, v/v) e metanol acidificado com 0,1% de ácido fórmico (Fase móvel B – v/v). A programação gradiente realizada ocorreu conforme Tabela 2.1.

TABELA 2.1- Composição de tempo e fluxo de gradiente.

FASE A	FASE B	Tempo do gradiente
		(minutos)
93	07	3
70	30	10
50	50	5
30	70	3
20	80	2
0	100	6
93	07	4

O tempo de corrida foi, no total, 33 minutos com fluxo de 0,3 mL/min, volume de injeção 10 µL e temperatura da coluna 20°C. Para o estudo de fragmentação foi utilizado o experimento PRM (Parallel Reaction Monitoring – Monitoramento de Reações Paralelas) com energias de colisão igual a 30 (NCE).

Para identificar compostos fenólicos foi utilizada uma solução estoque com padrões em metanol na concentração de 1 mg.mL⁻¹. A partir das soluções estoque foi preparada a solução da mistura dos padrões na concentração de 50 µg.mL⁻¹. Os padrões de compostos fenólicos utilizados estão na Tabela 2.2. Os dados foram processados no software Xcalibur™.

TABELA 2.2- Padrões de compostos fenólicos utilizados na análise.

Compostos Fenólicos		
ácido gálico	ácido cafeico	kaempferol
ácido protocatequínico	ácido p-cumárico	luteolina
ácido gentísico	ácido vanílico	naringenina
ácido ferúlico	ácido elágico	rutina
catequina	epicatequina	quercetina

2.5. Análise Estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram relatados com média e desvio padrão de três repetições. A análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey foi usada para comparação de médias ($p < 0,05$). Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o software Rstudio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de teor de compostos fenólicos totais ($\text{mgGAE} \cdot 100\text{g}^{-1}$) e da capacidade antioxidante ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) dos extratos estão apresentados na Figura 2.1. O cajazinho inteiro ($757,7\text{mg GAE} \cdot 100\text{g}^{-1}$; $76,497\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) e sem caroço ($714,8\text{mg GAE} \cdot 100\text{g}^{-1}$; $83,7\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) foram os que apresentaram os menores valores. Não diferenciando a presença ou não do seu caroço. O araticum ($1.337\text{mgGAE} \cdot 100\text{g}^{-1}$; $177,68\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$), o açafraão ($5.321,5\text{mg GAE} \cdot 100\text{g}^{-1}$; $373,7\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) e o extrato comercial de chá verde/alecrim ($2.048,2\text{mg GAE} \cdot 100\text{g}^{-1}$; $347,96\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) possuem valores de capacidade antioxidante e de fenólicos totais superiores ou semelhantes a outros estudos^{11, 12, 18}. Porém, os valores encontrados, para o extrato de pequi ($15.250,3\text{mg GAE} \cdot 100\text{g}^{-1}$; $1.874,74\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) foram significativamente superiores a todos os outros extratos naturais analisados.

Já se tem conhecimento que resíduos de algumas frutas (como casca, mesocarpo, caroço, semente e bagaço) possuem altos valores de vitaminas, minerais e, principalmente, compostos antioxidantes¹⁹.

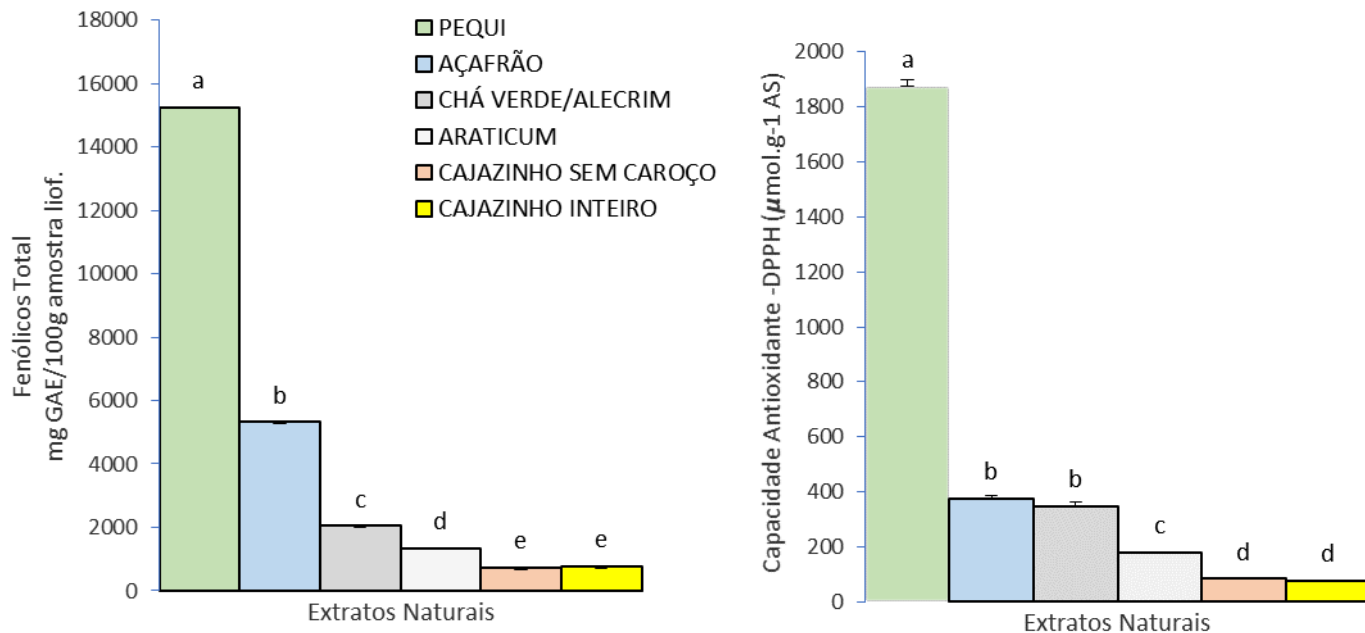


FIGURA 2.1 - Teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante dos extratos naturais. Letras diferentes significam diferença estatística (teste de tukey, $p < 0,05$).

Esse alto valor de compostos antioxidantes em resíduos de vegetais se deve aos compostos secundários das plantas. Esses metabólitos, ou fotoquímicos, são produzidos para

algumas atividades biológicas específicas. Além disso, geralmente possuem estrutura química mais complexa, baixo peso molecular e estão presentes em baixa concentração²⁰.

Dentre esses compostos secundários, o maior e mais importante deste grupo são os compostos fenólicos. Já foram reportados em estudos mais de oito mil compostos fenólicos de plantas, sendo que uma de suas principais funções é a proteção da planta²¹. Por essa razão, os resíduos de frutas são ricos nesses compostos, pois eles estão presentes na casca e na semente para proteger e permitir a perpetuação da planta.

A casca do pequi possui a maior quantidade de compostos fenólicos e, conseqüentemente, capacidade antioxidante, uma vez que, estes compostos realizam a proteção da planta contra radiação ultravioleta, de patógenos e de infecções²².

Os resultados obtidos neste estudo mostram o elevado teor de compostos fenólicos do resíduo de pequi e, também, a sua alta capacidade antioxidante, permitindo que aplicações, para esta parte tão significativa do fruto, sejam criadas²³. Neste trabalho foi encontrado, aproximadamente, 70 vezes mais fenólicos do que em outros estudos com a polpa do pequi, que encontraram valores de 209 a 228mg GAE.100g⁻¹ ^{24, 25}.

Vale ressaltar que ao analisar vários estudos, diferentes teores de compostos fenólicos são encontrados, tanto na casca quanto na polpa de pequi. Essa variação se dá devido a diferentes locais e épocas de coleta, mas, independentemente do teor, o pequi sempre apresenta um bom perfil fenólico e alta capacidade antioxidante¹⁴.

O açafrão (*Curcuma longa* L.), é conhecido pelos seus benefícios à saúde, em razão de sua atividade antioxidante, devido a substâncias curcuminídes, principalmente a curcumina¹¹. Os valores encontrados no presente estudo, também são considerados altos para fenólicos, corroborando com outros estudos (5.9607 mgGAE.100g⁻¹ ¹¹; 2.000 mgGAE.100g⁻¹)^{11,26}.

Esses resultados demonstram o potencial da casca de pequi, apresentando cerca de 77% a mais de fenólicos que o açafrão, conhecido por seu alto teor destes compostos. A casca de pequi também apresentou um teor de fenólicos e antioxidantes maior em relação a uva (fruta fonte de antioxidante). Alguns trabalhos mostram valores de fenólicos totais para uvas frescas de 180 a 330 mgGAE/100g²⁷ e de potencial antioxidante para casca de 140,42 µmol/g e da semente de 586,59µmol/g²⁸.

O araticum (*Annona coriacea*) também conhecido como marolo, trata-se de um fruto com moderado poder antioxidante^{18, 29}. Arruda et al.¹⁸ estudaram o araticum e também

encontraram valores próximos ao presente estudo, com uma capacidade antioxidante de 230 $\mu\text{mol.g}^{-1}$.

O extrato comercial adquirido para comparação e análise possui em sua composição alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e chá verde, ambos conhecidos pela elevada atividade antioxidante^{12, 30}. Este extrato apresentou quantidade de fenólicos significativamente inferior ao extrato de açafrão, mas ao quantificar seu potencial antioxidante, não houve diferença entre os extratos. Este resultado pode ser explicado pela composição de fenólicos.

A potencialidade e a ação dos fenólicos dependerá de sua estrutura química. Dependendo do número e da posição dos grupamentos hidroxilas, da quantidade de anéis aromáticos, do grau de metilação e glicosilação, os fenólicos presentes poderão apresentar maior ou menor potencial antioxidante^{31, 32}.

O extrato de açafrão possuiu maior quantidade de fenólicos que o chá verde/alecrim, porém seus fenólicos possuem estrutura química que lhes dão menor potência antioxidante.

Os resultados do teor de compostos fenólicos totais dos extratos de araticum, de cajazinho, de açafrão, de casca de pequi e do chá verde/alecrim mostraram-se superiores ou similares aos de muitos frutos e temperos já analisados e consagrados como fonte de fenólicos, como a gabiroba do cerrado (1.222,6 mgGAE/100g)¹⁵, resíduo de acerola (545,98 mgGAE/100g)³³, tomilho (181,30 mgGAE/100g)⁴, e em bagaço de maçã (522,74 mgGAE/100g)³⁴. Roesler et al.²³ obtiveram, também, valores consideráveis para fenólicos em extrato etanólico de casca de pequi e para o araticum, de 9.072 mgGAE/100g e de 2.093,7 mgGAE/100g, respectivamente.

Observa-se que os resultados obtidos para o cajazinho (*Spondias mombin*), com ou sem caroço, são bem inferiores aos dos outros extratos, tanto para fenólicos quanto para a capacidade antioxidante, especialmente quando comparados com o extrato de casca de pequi.

Devido aos melhores resultados obtidos, o extrato de casca de pequi foi encaminhado para análise do perfil fenólico. Nesta análise alguns padrões fenólicos são comparados com a amostra para identificar sua presença ou não. Esta análise foi apenas qualitativa, para identificar os fenólicos responsáveis pelo alto potencial antioxidante deste extrato.

Diversos compostos fenólicos foram detectados pela análise (ANEXO A e B), sendo identificados os compostos que por comparação direta correlacionam-se com o tempo de retenção e a massa dos fenólicos presentes na solução padrão. Os principais compostos

fenólicos identificados, responsáveis pela capacidade antioxidante do extrato de casca de pequi, foram: ácido gálico, ácido elágico e ácido protocatequico (ou protocatecuico).

No presente estudo, analisou-se qualitativamente os extratos de casca de pequi, entretanto, alguns trabalhos demonstram quantitativamente a significância destes três compostos (ácido gálico, ácido elágico e ácido protocatequico) para a qualidade fenólica do pequi^{23, 35}. A capacidade antioxidante expressiva do extrato se dá em razão da presença dos ácidos hidroxibenzóicos e de flavanóis³⁶.

Ascari et al.³⁵ afirmaram que o ácido gálico é o componente fenólico presente em maior quantidade no extrato de casca (epicarpo e mesocarpo) de pequi, sendo o responsável pelos altos valores de fenólicos totais e da alta capacidade antioxidante deste extrato. Porém, muitas vezes ele não aparece quantitativamente maior, pois ao realizar o processo de extração reações de esterificação podem ocorrer.

Os resultados obtidos, apesar de não ter sido analisado o perfil fenólico quantitativamente, demonstram que o ácido elágico está mais presente que o ácido gálico, baseado no tamanho do pico no espectrograma. Provavelmente, durante o processo de extração, ocorreram reações de esterificação com o ácido gálico. Lima³⁶ analisou o perfil fenólico quantitativamente e também encontrou maiores quantidade de ácido elágico ao se comparar com o gálico. Este fenólico é formado por duas moléculas de ácido gálico, apresentando alta capacidade antioxidante, em razão das quatro hidroxilas livres, que podem reagir com os radicais livres.

O ácido elágico, encontrado em nozes, avelã e castanha do Pará, mostrou sua ação antimutagênica, anticarcinogênica, como hepatoprotetor em animais intoxicados por tetracloreto de carbono e na diminuição da peroxidação lipídica³⁶. No presente trabalho, apesar da análise qualitativa, observando o espectro da análise o pico formado para o ácido elágico se encontra consideravelmente maior que o pico do padrão ácido elágico, comprovando sua presença expressiva na casca de pequi.

Roesler et al.³⁷, analisando a atividade antioxidante do extrato de casca de pequi através da peroxidação lipídica (*in vitro*) induzida em fígado de ratos, afirmaram que os compostos fenólicos (em especial o ácido gálico) possibilitaram ação antioxidante eficiente na contenção da oxidação lipídica.

Estudos ainda demonstraram que os extratos de casca de pequi além de grande potencial antioxidante apresentam ação fungicida e bactericida^{35, 37}.

Outro extrato que demonstrou boa capacidade antioxidante no presente estudo, foi o extrato de chá verde/alecrim. Os chás de uma forma geral são conhecidos por terem em

média 36% de polifenóis em base seca, o que, consequentemente, gerou vários estudos sobre o perfil dos fenólicos contido em ervas^{38, 39}. Mais de noventa e seis tipos de compostos fenólicos já foram identificados em extratos de chás⁴⁰.

Os principais fenólicos em chás já detectados são catequinas, ácido cumárico, ácido gálico, kempferol e outros derivados da catequina como o galocatequina 3-galato. Os estudos também demonstraram que, de acordo com a espécie do chá e a região de produção, a composição fenólica desses chás pode ser bem diferente^{38, 40}.

Outro fator bastante impactante no teor de fenólicos e, consequentemente, no seu poder antioxidante é o tipo de chá analisado ou o processo de fabricação do chá. O chá verde é considerado não fermentado, razão pela qual é o que possui maior teor de fenólicos. Independentemente da quantidade detectada, estudos mostram o chá verde com grande potencial antioxidante e a importância da catequina e seus derivados nessa ação antioxidante do chá verde⁴¹.

O alecrim, também presente no extrato analisado, apresenta benefícios antioxidantes em razão de sua composição de polifenóis⁴². Estudos quantitativos mostram que os compostos em maior presença são: o ácido rosmarínico, o ácido cafeico e o ácido cumárico e, dentre os diterpenos, o ácido carnósico^{42, 43}.

Vale ressaltar que todos esses produtos de origem natural possuem grande variedade de compostos secundários. Estudos referentes ao perfil fenólico ressaltam os principais compostos, embora uma quantidade superior de polifenóis seja identificada nos extratos, muitas vezes mais de cinquenta compostos⁴³.

4.CONCLUSÕES

O extrato de casca de pequi foi o que apresentou maior teor de fenólicos e maior capacidade antioxidante. O extrato de açafrão obteve maior quantidade de fenólicos que o extrato de chá verde/alecrim, porém a capacidade antioxidante de ambos não se difere, demonstrando a potência dos fenólicos presentes no chá verde/alecrim. O perfil fenólico da casca de pequi mostrou a presença de ácido gálico, ácido elágico e ácido protocatequico, responsáveis pela alta capacidade antioxidante. Portanto, formas de utilização para a casca do pequi devem ser exploradas, aproveitando o grande potencial que este resíduo possui contra processos oxidativos.

5. REFERÊNCIAS

1. Huang L, Xiong YLL, Kong BH, Huang XG, Li J. Influence of storage temperature and duration on lipid and protein oxidation and flavour changes in frozen pork dumpling filler. *Meat Science*. 2013;95(2):295-301.
2. Granato D, Shahidi F, Wrolstad R, Kilmartin P, Melton LD, Hidalgo FJ, et al. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food Chemistry*. 2018;264:471-475.
3. Proestos C, Lytoudi K, Mavromelanidou OK, Zoumpoulakis P, Sinanoglou VJ. Antioxidant Capacity of Selected Plant Extracts and Their Essential Oils. *Antioxidants*. 2013;2:11-22.
4. Stanciu G, Cristache N, Lupsor S, Dobrinas S. Evaluation of Antioxidant Activity and Total Phenols Content in Selected Spices. *Revista De Chimie*. 2017;68(7):1429-1434.
5. Contini M, Baccelloni S, Massantini R, Anelli G, Manzi L, Merendino N. In Vitro and In Vivo Antioxidant Potential of Phenolic Extracts Obtained from Hazelnut Skin By-Products. *Vii International Congress on Hazelnut*. 2009;845:717-722.
6. Hadjmohammadi MR, Ehsani M, Kamel K, Biparva P. Application of experimental design for extraction of BHA and BHT from edible vegetable oil and their determination using HPLC. *QScience Connect*. 2012;2012(7):1-10.
7. Barreto GPM, Benassi MT, Mercadante AZ. Bioactive Compounds from Several Tropical Fruits and Correlation by Multivariate Analysis to Free Radical Scavenger Activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2009;20(10):1856-U124.
8. Zeljkovic SC, Topcagic A, Pozgan F, Stefane B, Tarkowski P, Maksimovic M. Antioxidant activity of natural and modified phenolic extracts from *Satureja montana* L. *Industrial Crops and Products*. 2015;76:1094-9.
9. Carocho M, Morales P, Ferreira I. Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology*. 2015;45(2):284-95.
10. Lin SD, Udompornmongkol P, Yang JH, Chen SY, Mau JL. Quality and antioxidant property of three types of tea infusions. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2014;38(4):1401-1408.
11. Hirun S, Utama-ang N, Roach PD. Turmeric (*Curcuma longa* L.) drying: an optimization approach using microwave-vacuum drying. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*. 2014;51(9):2127-2133.
12. Gird CE, Nencu I, Popescu ML, Costea T, Dutu LE, Balaci TD, et al. Chemical, antioxidant and toxicity evaluation of rosemary leaves and its dry extract. *Farmacia*. 2017;65(6):978-983.
13. Frasao B, Costa M, Silva F, Rodrigues B, Baltar J, Araujo J, et al. Effect of pequi (*Caryocar brasiliense*) and jucara (*Euterpe edulis*) waste extract on oxidation process stability in broiler meat treated by UV-C. *Plos One*. 2018;13(12).

14. Torres LRO, Santana FC, Shinagawa FB, Mancini-Filho J. Bioactive compounds and functional potential of pequi (*Caryocar spp.*), a native Brazilian fruit: a review. *Grasas Y Aceites*. 2018;69(2).
15. Alves AM, Dias T, Hassimotto NMA, Naves MMV. Ascorbic acid and phenolic contents, antioxidant capacity and flavonoids composition of Brazilian Savannah native fruits. *Food Science and Technology*. 2017;37(4):564-569.
16. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics [in grapes and wine] with phosphomolybdic -phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1965;16(3):144-158.
17. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 1995;28(1):25-30.
18. Arruda HS, Pereira GA, Pastore GM. Brazilian Cerrado fruit araticum (*Annona crassiflora Mart.*) as a potential source of natural antioxidant compounds. *International Food Research Journal*. 2018;25(5):2005-2012.
19. Sousa MSB, Vieira LM, da Silva MDM, de Lima A. Nutritional characterization and antioxidant compounds in pulp residues of tropical fruits. *Ciencia E Agrotecnologia*. 2011;35(3):554-9.
20. Pereira RJ, Cardoso MdGa. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. 2012;3(4):146-152.
21. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*. 2009;26(8):1001-1043.
22. Sharma K, Mahato N, Lee YR. Extraction, characterization and biological activity of citrus flavonoids. *Reviews in Chemical Engineering*. 2019;35(2):265-284.
23. Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CAS, Pastore GM. Antioxidant activity of cerrado fruits. *Ciencia E Tecnologia De Alimentos*. 2007;27(1):53-60.
24. De Lima A, Silva A, Trindade RA, Torres RP, Mancini J. Chemical composition and bioactive compounds in the pulp and almond of pequi fruit. *Revista Brasileira De Fruticultura*. 2007;29(3):695-698.
25. Do Nascimento NRR, Alves AM, Silva MR, Naves MMV. Antioxidant capacity of pequi (*Caryocar brasiliense camb.*) pulp is preserved by freeze-drying and light-resistant packaging. *Revista Brasileira De Fruticultura*. 2017;39(1).
26. Akbar A, Ali I, Samiullah, Ullah N, Khan SA, Rehman Z, et al. Functional, antioxidant, antimicrobial potential and food safety applications of curcuma longa and cuminum cyminum. *Pakistan Journal of Botany*. 2019;51(3):1129-1135.
27. Lutz M, Cajas Y, Henriquez C. Phenolics content and antioxidant capacity of Chilean grapes cv. Pais and Cabernet Sauvignon. *Cyta-Journal of Food*. 2012;10(4):251-7.

28. Xia LL, Xu CM, Huang KL, Lu J, Zhang YL. Evaluation of phenolic compounds, antioxidant and antiproliferative activities of 31 grape cultivars with different genotypes. *Journal of Food Biochemistry*. 2019;43(6).
29. Benites RSR, Formagio ASN, Argandona EJS, Volobuff CRF, Trevizan LNF, Vieira MC, et al. Contents of constituents and antioxidant activity of seed and pulp extracts of *Annona coriacea* and *Annona sylvatica*. *Brazilian Journal of Biology*. 2015;75(3):685-91.
30. Carloni P, Tiano L, Padella L, Bacchetti T, Customu C, Kay A, et al. Antioxidant activity of white, green and black tea obtained from the same tea cultivar. *Food Research International*. 2013;53(2):900-8.
31. Silva L, Martins L, Bantim I, Meireles de Deus M, Ferreira P, Peron A. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. *Acta Toxicológica Argentina*. 2015;23(1):36-43.
32. Nayak B, Liu RH, Tang JM. Effect of Processing on Phenolic Antioxidants of Fruits, Vegetables, and Grains-A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015;55(7):887-918.
33. do Carmo JS, Nazareno LSQ, Rufino MDM. Characterization of the acerola industrial residues and prospection of their potential application as antioxidant dietary fiber source. *Food Science and Technology*. 2018;38:236-41.
34. Soares M, Welter L, Gonzaga L, Lima A, Mancini J, Fett R. Evaluation of antioxidant activity and identification of phenolic acids present in the pomace of Gala variety apples. *Ciencia e Tecnologia De Alimentos*. 2008;28(3):727-32.
35. Ascari J, Takahashi JA, Boaventura MAD. The Phytochemistry and Biological Aspects of Caryocaraceae Family. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 2013;15(2):293-308.
36. de Lima A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense camb.*). São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.
37. Roesler R, Catharino RR, Malta LG, Eberlin MN, Pastore G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterisation of components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2008;110(3):711-7.
38. Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*. 2005;89(1):27-36.
39. Yang J, Liu RH. The phenolic profiles and antioxidant activity in different types of tea. *International Journal of Food Science and Technology*. 2013;48(1):163-71.
40. Lin LZ, Chen P, Harnly JM. New phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(17):8130-40.
41. Wu CY, Xu HR, Heritier J, Andlauer W. Determination of catechins and flavonol glycosides in Chinese tea varieties. *Food Chemistry*. 2012;132(1):144-9.

42. Mena P, Cirlini M, Tassotti M, Herrlinger KA, Dall'Asta C, Del Rio D. Phytochemical Profiling of Flavonoids, Phenolic Acids, Terpenoids, and Volatile Fraction of a Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract. *Molecules*. 2016;21(11).
43. Vallverdu-Queralt A, Regueiro J, Martinez-Huelamo M, Alvarenga JFR, Leal LN, Lamuela-Raventos RM. A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chemistry*. 2014;154:299-307.

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DE FILMES ATIVOS BIODEGRADÁVEIS INCORPORADOS COM ANTIOXIDANTES NATURAIS E SINTÉTICO

RESUMO

Objetivou-se produzir filmes de acetato de celulose incorporados com antioxidantes sintético e natural e avaliar suas propriedades mecânicas e de permeabilidade ao CO₂, bem como a migração do antioxidante para água e gordura e a microscopia dos filmes. O experimento foi conduzido no Laboratório Multiusuário da Escola de Agronomia - UFG, em delineamento inteiramente casualizado. Primeiramente, foram produzidos nove filmes com diferentes proporções de acetato de celulose (3, 3,5 e 4g) e tween 80 (10, 20 e 30%). A mistura acetato, tween 80 e acetona (solvente) foi homogeneizada por 24 horas e dispersa em placa de vidro, ocorrendo a formação do filme com a total secagem do solvente. Posteriormente, diferentes antioxidantes foram incorporados a esse filme: BHA, extrato natural comercial de chá verde/alecrim e extrato natural de casca de pequi. O filme que apresentou melhor custo benefício, em relação às análises mecânicas, foi o filme com três gramas de acetato de celulose e 10% de tween. Todos os filmes apresentaram boa resistência mecânica. Os filmes com extratos naturais apresentaram força máxima a perfuração consideravelmente menor, em relação aos filmes com antioxidante sintético. Os antioxidantes naturais apresentaram migração máxima com dois dias, enquanto o antioxidante sintético nas primeiras 24h. Observou-se que o antioxidante sintético migrou mais rapidamente para os meios simulantes, sugerindo uma menor ligação destes à matriz polimérica. A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) confirmou os resultados de permeabilidade, demonstrando a alta porosidade do filme com extrato de pequi. Apesar das diferenças apresentadas, os filmes produzidos com antioxidantes naturais demonstraram-se eficientes para uso em alimentos.

Palavras-chave: acetato de celulose; tensão; permeabilidade; microscopia eletrônica; migração.

CHAPTER 3- DEVELOPMENT AND EVALUATION OF BIODEGRADABLE ACTIVE FILMS INCORPORATED WITH ANTIOXIDANTS

ABSTRACT

The aim was to produce cellulose acetate films incorporated with antioxidants (synthetic and natural) and to evaluate their mechanical properties and CO₂ permeability, as well as the migration of antioxidant to water and fat and the microscopy of the films. The experiment was conducted in the Multiuser Laboratory of the School of Agronomy - UFG, in a completely randomized design. First, nine cellulose acetate films were produced, with different proportions of cellulose acetate (3, 3.5 and 4g) and tween 80 (10, 20 and 30%). The acetate, tween 80 and acetone (solvent) mixture was homogenized for 24 hours and then dispersed on glass plate, forming the film with complete drying of the solvent. The most cost-effective film compared to mechanical analysis was the film with three grams of cellulose acetate and 10% tween. Different antioxidants were incorporated into this film: BHA, natural green tea / rosemary extract and natural pequi bark extract. All films presented good mechanical resistance. Films with natural extracts showed considerably lower maximum perfuration strength than films with synthetic antioxidants. Natural antioxidants obtained maximum migration with two days, while the synthetic antioxidant in the first 24h. It was observed that the synthetic antioxidant migrated faster to the simulant, suggesting a lower binding of these to the polymeric matrix. Scanning electron microscopy (SEM) analysis confirmed the permeability results, demonstrating the high porosity of pequi bark extract film. Despite the differences presented, films produced with natural antioxidants have proven to be efficient for use in food.

Keywords: cellulose acetate; tension; permeability; electron microscopy; migration.

1. INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos é considerada uma das maiores consumidoras de materiais à base de petróleo como os plásticos, sendo que os mais utilizados são: polietileno (PE), poliestireno (PS), polipropileno (PP), polietileno tereftalato (PET) e o policloreto de vinila (PVC)¹. O uso excessivo de plástico na cadeia alimentícia, ao longo dos anos, gerou um grande impacto ambiental, fazendo com que a indústria e os centros de pesquisa começassem a desenvolver alternativas biodegradáveis^{2,3}.

Apesar dos malefícios para o meio ambiente, o uso massivo dessas embalagens ocorreu em razão de grandes vantagens, tais como: baixo custo de produção, boa performance mecânica, durabilidade, transparência e leveza. Assim, o grande desafio das embalagens biodegradáveis é obtê-las com boas propriedades mecânicas, baixa sensibilidade à umidade e permeabilidade adequada aos gases¹.

Por esta razão, nos últimos vinte anos, os bioplásticos ou bioembalagens vêm sendo estudadas intensamente, para que se tenha no mercado de alimentos embalagens biodegradáveis com baixo custo e boas propriedades químicas, mecânicas e térmicas⁴. Para esses biopolímeros apresentarem boas propriedades químicas e mecânicas, algumas substâncias podem ser adicionadas. Os plastificantes, como por exemplo glicerol, são não voláteis e diminuem forças intermoleculares, alterando as propriedades físicas e mecânicas do polímero⁵. Os surfactantes diminuem a tensão superficial da emulsão polimérica, melhorando a molhabilidade e aderência do filme a ser produzido^{6,7}.

Inúmeras fontes para embalagens biodegradáveis vêm sendo pesquisadas, como acetato de celulose, pectina, gomas, quitosana, amidos e outros. Os derivados da celulose, como o acetato de celulose e a hidroximetil celulose, que são polissacarídeos de cadeia longa, têm se mostrado bastante vantajosos, uma vez que são polímeros neutros, biodegradáveis, flexíveis, resistentes e possuem boa permeabilidade a gases⁸⁻¹⁰.

Dentre os derivados de celulose o principal é o acetato, por apresentar bons resultados, tendo assim, grande importância comercial⁹. É produzido pela substituição dos grupos hidroxilas, das unidades de glicose, por grupos acetila¹¹. Um éster de celulose pode passar por várias etapas de esterificação, formando acetato de celulose, diacetato de celulose e triacetato de celulose¹². Todos os ésteres de celulose possuem a capacidade de formação de filmes transparentes e de baixo custo. Podem ser direcionados para formação de membranas em processos de separação e filtração⁹ ou para embalagens primárias (em contato direto com alimentos), na formação de filmes ou revestimentos comestíveis¹².

Revestimentos são suspensões ou emulsões aplicadas diretamente na superfície dos alimentos. Já os filmes, são películas formadas através do método *casting*, no qual uma solução do polímero é aplicada em uma superfície que, através da secagem do solvente presente, resulta na formação de um filme, que será aplicado no alimento⁷.

Revestimentos ou filmes podem ter funcionalidades além das tradicionais. Uma embalagem comum tem como finalidade proteger o alimento de injúrias mecânicas, de processos oxidativos e microbiológicos¹². Uma embalagem ativa reforça essa proteção, uma vez que nela haverá a adição de substâncias antimicrobianas e/ou antioxidantes, que agirão protegendo o alimento^{2, 13}. Ou seja, a ação dessas embalagens modificará de forma positiva as propriedades sensoriais, nutricionais e microbiológicas do alimento, prolongando sua vida útil e mantendo sua qualidade^{2, 14}.

Independente da matriz utilizada na fabricação dos filmes, várias análises para caracterização física são realizadas como permeabilidade a gases, resistência a tração, migração de aditivos e outros.

A permeabilidade de um filme está intimamente ligada a característica molecular do polímero analisado. A difusão do gás ocorre pela sua passagem nos espaços vazios formados no polímero. Dessa forma, a velocidade de difusão desse gás dependerá do número, do tamanho e da disposição desses espaços vazios, que dependem da rigidez das cadeias formadas e das forças de ligação existentes no polímero¹⁵.

Além dos espaços vazios, outro fator que interfere na permeabilidade a gases é a disposição das partículas ligadas ao polímero, podendo facilitar ou atrapalhar a difusão dos gases, promovendo “caminhos mais ou menos tortuosos”¹⁶ (Figura 3.1).

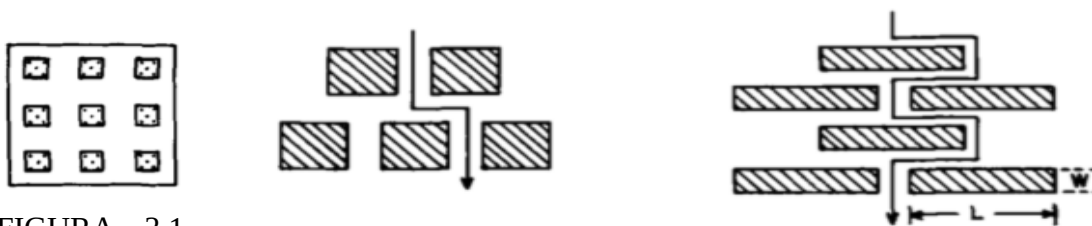


FIGURA 3.1

– Modelo de possíveis caminhos existentes na difusão de gases por um filme.

Fonte: Nielsen¹⁶.

A incorporação dessas substâncias à embalagem se torna mais vantajosa do que a adição direta ao alimento, uma vez que a quantidade liberada dessas substâncias ocorre de forma controlada e gradativa².

Este trabalho teve como objetivo produzir filmes de acetato de celulose incorporados com antioxidantes (sintético e naturais) e avaliar suas propriedades mecânicas e de permeabilidade ao CO₂, bem como a migração do antioxidante para água e gordura e a microscopia dos filmes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Elaboração dos biofilmes

Para produção dos filmes foram utilizados: acetato de celulose, cedido pela empresa Rhodia Solvay; tween 80 P.A. (Vetec, Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e acetona P.A. 99,6 %, (Neon©, Suzano, SP, Brasil).

Os filmes foram elaborados no Laboratório Multiusuário da Escola de Agronomia – UFG. Diferentes proporções entre acetato de celulose, tween 80 (T80) e acetona (Tabela 3.1) foram testadas. Os ingredientes foram medidos e adicionados em frascos âmbar. Esses foram colocados em homogeneizador rotativo (Phoenix, modelo AP32, Araraquara) por 24h e, deixados em repouso por 1h, para estabilização do gel (dissolução das bolhas).

Os filmes foram preparados pelo método “casting”¹⁴. As soluções filmogênicas foram espalhadas manualmente em placas de vidro, com ajuda de um bastão de vidro. Após completa evaporação da acetona, obtiveram-se os filmes, que foram analisados quanto às suas propriedades mecânicas e permeabilidade ao CO₂.

A formulação de melhor custo/benefício foi escolhida para produção dos filmes ativos.

TABELA 3.1 – Composição dos filmes de acetato de celulose produzidos.

Tratamento	Acetato (g)	Tween 80 (%)*	Acetona (mL)
A1	3	10	30
A2	3	20	30
A3	3	30	30
B1	3,5	10	35
B2	3,5	20	35
B3	3,5	30	35
C1	4	10	40
C2	4	20	40
C3	4	30	40

*Porcentagem de T80 em relação ao acetato de celulose.

2.2. Análise de Microscopia

A análise de microscopia foi realizada no laboratório LabMic do Instituto de Física da UFG. As amostras foram fixadas no porta-amostra ("stub") utilizando uma fita

condutora dupla face de carbono e depois recobertas com material condutor, neste caso: o ouro. Em seguida, as amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura, (MEV), Jeol, JSM – 6610, equipado com EDS, Thermo scientific NSS spectral imaging, operado com tensão de aceleração de 5kV.

2.3. Espessura dos filmes ativos

Para determinação da espessura foi utilizado um micrômetro com resolução de 0,0001 mm (Qualitylabor, modelo MEP/Q, Perus). A medição ocorreu em cinco pontos aleatórios em diferentes segmentos dos filmes.

2.4. Permeabilidade ao CO₂

A permeabilidade ao CO₂ foi medida em um analisador PERME VAC – V1 (Labthink, China), segundo a norma ASTM-D1434-82²⁰.

Previamente, os filmes foram cortados em formato circular com 7 cm de diâmetro e acondicionados em dessecador com sílica a 25 °C, por 48 h. A permeabilidade ao CO₂ foi determinada com 3 repetições.

2.5. Propriedades mecânicas

Foram realizados testes de tração em uma máquina universal de ensaios (Instron, modelo 3367, Grove City), com controle pneumático de tração e capacidade para células de carga de até 30 kN ou 6750 Lbs, de acordo com a norma ASTM-D882-10¹⁹.

Foram preparadas tiras de amostras com largura de 10 mm e comprimento de 140 mm. As amostras foram acondicionadas em envelopes de papel e climatizadas a 50 ± 5 % de umidade relativa e em temperatura de 23 ± 2 °C, por 48h.

O equipamento foi ajustado com espaço entre ganchos de 100 mm. As amostras foram tracionadas com velocidade de 12 mm/min, utilizando-se no equipamento uma célula de carga com capacidade de 500 N. Analisaram-se tensão máxima, tensão na ruptura, módulo de elasticidade ou módulo de Young e alongamento ou elongação¹⁹. As propriedades mecânicas foram determinadas com 10 repetições.

A análise de resistência à perfuração foi realizada em Texturômetro (Texture Analyser, TA-XT Plus) com amostras de filmes de 7 cm de diâmetro, acondicionadas em envelopes de papel e climatizadas a 50 ± 5 % de umidade relativa e em temperatura de 23 ± 2 °C, por 48h.

2.6. Preparação do extrato natural de casca de pequi

O pequi foi adquirido no mercado local e teve sua casca separada da polpa. Os extratos metanólicos foram produzidos segundo Alves et al.¹⁷. Cada produto foi congelado a -18°C e, posteriormente, fracionado em pequenos pedaços e liofilizado por 48 horas. Homogeneizou-se 0,5 g de amostra liofilizada em 25 mL de metanol/ água (70:30 v/v), em agitador magnético por 2 horas a 4°C.

Posteriormente, o extrato metanólico produzido foi rotaevaporado por 1 hora, perdendo o solvente presente. O concentrado resultante da rotaevaporação foi diluído em água destilada (1:1 v/v), congelado a -18 °C por 48 h e liofilizado por 72 h, obtendo-se assim, o extrato natural de casca de pequi.

2.7. Produção dos filmes ativos

Os filmes ativos foram produzidos conforme metodologia descrita no item 2.1, acrescentando os antioxidantes à formulação escolhida (Tabela 3.2). Foram incorporados ao filme de acetato, como melhor custo/benefício: antioxidante sintético BHA, marca Sigma-Aldrich, extrato natural de chá verde/alecrim, cedido pela empresa Kemin® e extrato natural de casca de pequi, obtido por extração metanólica segundo Alves et al.¹⁷. O teor máximo permitido do BHA é de 0,02%, segundo a legislação em vigor¹⁸. A maior proporção do extrato de casca de pequi, em relação aos outros antioxidantes, se deve a não purificação deste em laboratório, resultando em um número maior de interferentes em sua migração e eficiência.

TABELA 3.2 - Antioxidantes incorporados aos filmes de acetato de celulose.

Tratamento	Antioxidantes (%)*
Controle - C	0
Pequi - P	20
Chá Verde/Alecrim - CA	10
BHA - B	2

*Porcentagem do antioxidante em relação ao acetato de celulose.

2.8. Análise de Migração

Os filmes ativos foram analisados quanto à migração do antioxidante para meios simulantes de gordura e de água, utilizando soluções de etanol 95% e 10%, respectivamente²¹,

As amostras dos filmes foram cortadas nas dimensões de 3 x 2 cm e colocadas em tubos de ensaio com capacidade de 15 mL. Em seguida, foram adicionados aos tubos 10 mL do simulante. Os tubos foram tampados e cobertos com papel alumínio para evitar a exposição à luz. Posteriormente, foram armazenados em sala climatizada a 20 °C por 10 dias.

As análises foram realizadas nos tempos 1, 2, 6, 8 e 10 dias de armazenamento.

Para os extratos naturais (casca de pequi e chá verde/alecrim), a migração foi quantificada através da análise de capacidade antioxidante DPPH²³. Os dados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$. Para os filmes com BHA, a migração foi quantificada através de análise de BHA por HPLC^{24, 25}. Os dados foram expressos em $\mu\text{g/mL}$ de simulante e determinados com 4 repetições.

2.9. Análise Estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Os filmes foram produzidos com três repetições e os resultados foram relatados com média e desvio padrão. A análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, foi usada para comparação de médias ($p < 0,05$). Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o software RStudio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação dos filmes de acetato de celulose

Entre os tratamentos, observa-se que houve diferença estatística tanto para permeabilidade ao gás carbônico, quanto para as espessuras dos filmes (Tabela 3.3).

Os tratamentos A2 (3 g de acetato de celulose com 20 % de tween 80) e B1 (3,5 g de acetato de celulose com 10 % de tween 80), apresentaram maior espessura e menor permeabilidade. Já os tratamentos A1 (3 g de acetato de celulose com 10 % de tween 80) e B3 (3,5 g de acetato de celulose com 30 % de tween 80), foram os filmes de menor espessura e maior permeabilidade.

A permeabilidade de um filme, a qualquer gás, depende de inúmeros fatores, dentre eles: se há incorporação de aditivos, quantidade adicionada e espessura do filme¹¹. Com o aumento da espessura dos filmes há uma tendência a ocorrer diminuição na permeabilidade aos gases²⁶. De outro modo, a adição de substâncias, como plastificantes e surfactantes, pode gerar uma menor interação entre as moléculas do polímero, proporcionando maior permeabilidade e menor coesão, o que facilita a passagem de gases, devido aos espaços entre as moléculas²⁷.

TABELA 3.3 – Valores de espessura e permeabilidade dos filmes de acetato de celulose ao CO₂.

Filmes	Permeabilidade ao CO ₂ (cm ³ . m ⁻² . 24h.0,1MPa)	Espessura (mm)
A1	6.562,47 ± 557,68 ^a	0,0300 ± 0,001 ^c
A2	3.236,05 ± 123,29 ^c	0,0370± 0,001 ^a
A3	5.219,90 ± 519,83 ^b	0,0252 ± 0,001 ^c
B1	3.762,19 ± 137,06 ^c	0,0364 ± 0,001 ^a
B2	5.028,36± 256,07 ^b	0,0270 ± 0,001 ^c
B3	5.861,93± 547,66 ^a	0,0240 ± 0,001 ^e
C1	4.878,05 ± 776,69 ^b	0,0330 ± 0,001 ^b
C2	5.173,02 ± 327,96 ^b	0,0330 ± 0,001 ^b
C3	4.594,82 ± 86,81 ^b	0,0337± 0,001 ^b

*Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna apresenta diferença significativa ($p \leq 0,05$). A1-filme com 3g acetato celulose e 10%tween80; A2-filme com 3g acetato celulose e 20%tween80; A3-filme com 3g acetato celulose e 30%tween80; B1- filme com 3,5g acetato celulose e 10%tween80;

B2 -filme com 3,5g acetato celulose e 20%tween80; B3-filme com 3,5g acetato celulose e 30%tween80; C1-filme com 4g acetato celulose e 10%tween80; C2-filme com 4g acetato celulose e 20%tween80; C3-filme com 4g acetato celulose e 30%tween80

No presente estudo, a adição de surfactante não interferiu na permeabilidade dos filmes ao gás carbônico, sofrendo influência apenas da espessura.

A grande variedade das espessuras se deve à produção manual do filme. Ao elaborar o gel, este é disperso em uma placa de vidro e espalhado em um único movimento com a utilização de um bastão de vidro. O fato de este processo ser totalmente manual pontos de vulnerabilidade são gerados, possibilitando uma grande variação de espessura de um filme para o outro.

Apesar da variabilidade na espessura, os valores de permeabilidade ao CO₂ encontrados estão de acordo com outros estudos de filmes para alimentos. Magalhães²⁸ e Carvalho et al.¹¹, trabalhando com filmes de acetato de celulose (fabricados com 4 gramas), encontraram valores de 6690 cm³. m⁻². 24h.0,1MPa e 5598 cm³. m⁻². 24h.0,1MPa, respectivamente. Coelho²⁹, em filmes de polietileno com adição de argila modificada, encontrou para o tratamento controle valores de 5800 cm³. m⁻². 24h.0,1MPa.

Os resultados das análises de tração estão apresentados na Tabela 3.4.

TABELA 3.4. Análises de tração dos filmes com diferentes concentrações de acetato de celulose e tween 80.

Filmes	Tensão máx. (MPa)	Tensão ruptura (MPa)	Módulo de Young (MPa)	elongação(%)	Força máx. perfuração (N)
A1	49,828 ± 3,24 ^a	48,303 ± 3,28 ^a	2373,762 ± 63,38 ^{bc}	6,945 ± 4,32 ^{cd}	28,59 ± 2,27 ^a
A2	42,311 ± 3,70 ^c	41,616 ± 4,15 ^{bc}	2043,175 ± 88,20 ^{df}	13,506 ± 5,30 ^{bc}	26,56 ± 4,99 ^{bc}
A3	37,462 ± 4,09 ^d	37,042 ± 4,11 ^c	1838,104 ± 78,87 ^f	13,505 ± 6,96 ^{bc}	24,84 ± 1,93 ^{bcd}
B1	51,411 ± 2,28 ^a	50,467 ± 2,51 ^a	2532,61 ± 97,60 ^{ab}	6,76 ± 1,99 ^{cd}	24,013 ± 4,83 ^{bcd}
B2	42,562 ± 4,06 ^c	41,382 ± 4,21 ^c	2110,55 ± 99,55 ^d	8,68 ± 4,39 ^c	23,69 ± 3,18 ^{bcd}
B3	37,443 ± 4,13 ^d	38,002 ± 5,51 ^c	1907,8 ± 59,99 ^{ef}	10,31 ± 5,15 ^b	22,629 ± 2,84 ^{de}
C1	49,806 ± 4,49 ^a	51,401 ± 4,76 ^a	2722,83 ± 77,61 ^a	4,36 ± 2,06 ^d	28,059 ± 3,51 ^{ab}
C2	42,400 ± 1,38 ^c	41,516 ± 1,57 ^{bc}	2258,13 ± 96,75 ^{cd}	5,09 ± 2,44 ^d	18,295 ± 3,98 ^e
C3	48,258 ± 3,73 ^{bc}	46,596 ± 3,74 ^b	2081,82 ± 97,34 ^{de}	20,81 ± 3,20 ^a	21,295 ± 2,97 ^{de}

* Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna apresenta diferença significativa ($p \leq 0,05$). A1- filme com 3g acetato celulose e 10%tween80; A2-filme com 3g acetato celulose e 20%tween80; A3- filme com 3g acetato celulose e 30%tween80; B1- filme com 3,5g acetato celulose e 10%tween80; B2 - filme com 3,5g acetato celulose e 20%tween80; B3-filme com 3,5g acetato celulose e 30%tween80; C1- filme com 4g acetato celulose e 10%tween80; C2-filme com 4g acetato celulose e 20%tween80; C3- filme com 4g acetato celulose e 30%tween80

A tensão máxima consiste na resistência máxima oferecida pelo material quando submetido à tração²⁹ e a tensão na ruptura é a última tensão suportada pelo material antes da fratura. Os valores de tensão máxima e tensão na ruptura diminuem à medida que se adiciona surfactantes³⁰, relação esta demonstrada pelos valores obtidos no presente estudo. Porém, a quantidade de acetato de celulose na formulação dos filmes não afetou significativamente estes parâmetros.

O módulo de elasticidade ou módulo de Young é um indicador de rigidez do filme, e corresponde a região em que o filme alonga de forma crescente e proporcional à deformação imposta de forma reversível. No presente estudo, assim como para tensão, o módulo de elasticidade diminuiu significativamente com a adição do surfactante. Além disso, o aumento da quantidade de acetato de celulose também aumentou a dureza do filme.

Carvalho et al.¹¹ conseguiram valores próximos para o módulo de elasticidade ($3399 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot 24\text{h} \cdot 0,1\text{Mpa}$) em filmes de acetato de celulose (4 gramas) com tween 80, quando comparado com o filme do tratamento C1 (4 g de acetato de celulose e 10 % de tween 80).

A elongação é a relação entre o alongamento do filme e seu comprimento²⁸. Observa-se que houve diferença estatística entre os tratamentos, tendo em vista que a maior adição de surfactante resultou em maior elongação dos filmes.

Os valores de elongação de um filme são variáveis, dependendo dos espaços entre as moléculas e a presença de plasticizantes e/ou surfactantes. Neste estudo, a elongação dos filmes variou de 4 a 20%, enquanto Carvalho et al.¹¹ encontraram valores menores, com elongação máxima de 15% em filmes de acetato de celulose com adição de tween 80.

A força máxima à perfuração é outro parâmetro de deformação à falha mecânica em um filme³¹. Observa-se que a força à perfuração apresentou comportamento semelhante à tensão. Houve diferença significativa entre os tratamentos à medida que a adição gradual de tween 80 resultou na diminuição deste parâmetro. Novamente, este comportamento está associado à adição de substâncias que provocam menor interação intermolecular, exigindo uma força menor para ruptura mecânica³¹.

Ao analisar os resultados dos nove tratamentos, o filme que apresentou melhores valores de resistência mecânica, boa permeabilidade ao CO_2 , com menor utilização de matéria prima e, por consequência, tendo menor custo, foi o tratamento A1 (3g de acetato de celulose e 10 % de tween 80). Dessa forma, este tratamento foi o escolhido para a incorporação dos antioxidantes.

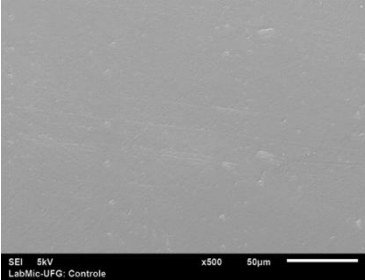
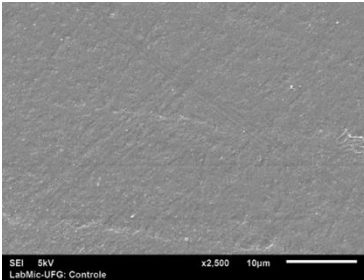
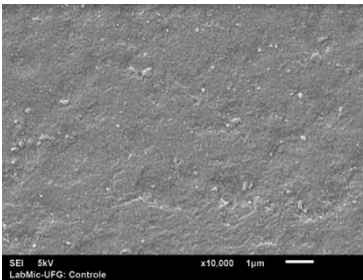
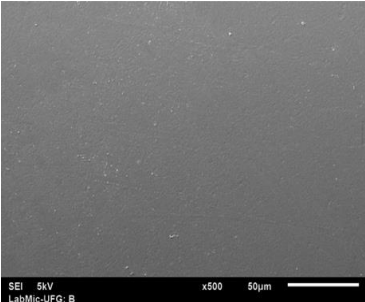
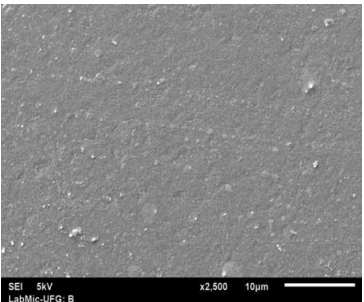
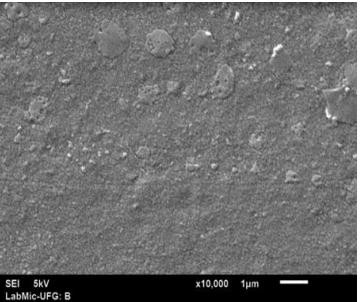
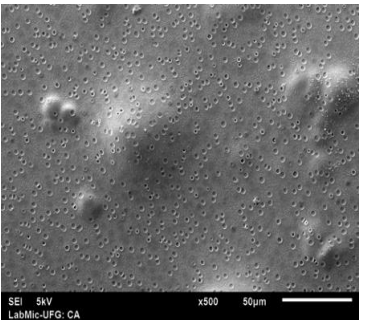
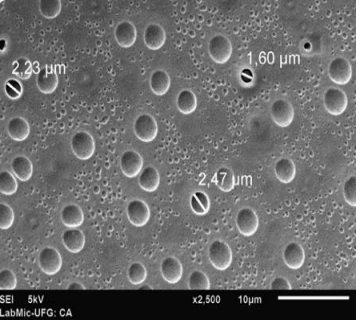
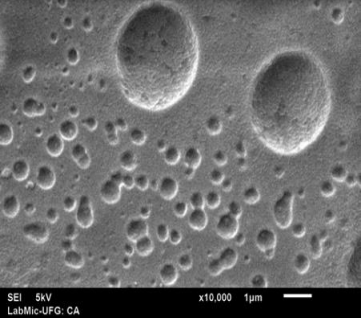
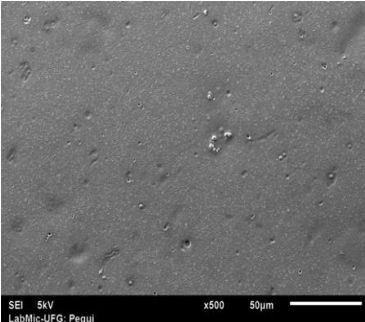
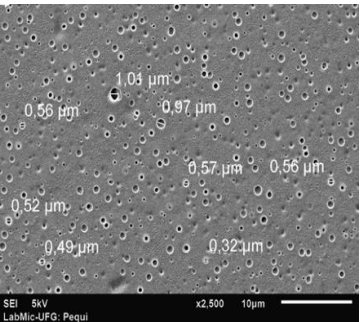
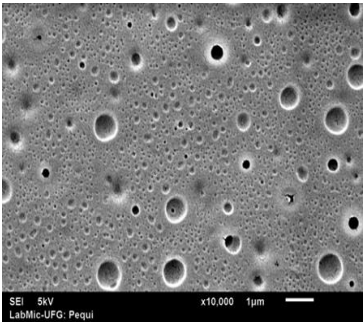
3.2. Análise de microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) promove a correspondência das propriedades mecânicas do filme com sua morfologia. O quadro 3.1 mostra a morfologia por MEV dos quatro filmes estudados^{32, 33}.

Dessa forma, a morfologia da superfície dos filmes consegue explicar, por exemplo, a relação de cada um com os resultados de permeabilidade a gases. O filme controle e com BHA apresentam apenas pequenas “rachaduras” em sua estrutura, demonstrando homogeneidade, menos espaços vazios, confirmando os resultados de permeabilidade e maior resistência mecânica.

Os filmes com chá verde/alecrim possuem vários pontos de rugosidade, interferentes e poucos poros (em torno de $2\mu\text{m}$), o que confirma sua permeabilidade semelhante com a dos filmes controle e com BHA.

QUADRO 3.1 - Microscopia eletrônica de varredura da superfície dos filmes

aumento de 500x	aumento de 2.500x	aumento de 10.000x
CONTROLE		
		
BHA		
		
CHÁ VERDE/ ALECRIM		
		
CASCA DE PEQUI		
		

O filme com adição de extrato de casca de pequi apresentou em sua superfície inúmeros poros, se tornando um filme altamente poroso (0,3 a 1 μ m) e permeável a gases, confirmando o resultado da permeabilidade ao CO₂, visto que este resultado ultrapassou o limite de quantificação do equipamento.

3.3. Avaliação dos filmes ativos

Os filmes ativos incorporados com antioxidantes (C - controle- sem antioxidante; P - 20 % de extrato natural de casca de pequi; CA - 10% de extrato natural de chá verde/alecrim; B - 2% de BHA) e os resultados de suas respectivas espessuras e permeabilidade ao CO₂ estão apresentados na Tabela 3.5.

TABELA 3.5 - Permeabilidade ao CO₂ e espessura dos filmes com incorporação de extrato de casca de pequi (P), extrato de chá verde/alecrim (CA), BHA (B) e filme controle (C).

Filmes	Permeabilidade ao CO ₂ (cm ³ . m ⁻² .24h.0,1MPa)	Espessura (mm)
C	5.550,96 $\pm$ 557,68 ^b	0,0246 $\pm$ 0,001 ^c
P	> L.Q* ^a	0,0380 $\pm$ 0,003 ^b
CA	4.580,53 $\pm$ 145,74 ^b	0,0529 $\pm$ 0,007 ^a
B	4.138,13 $\pm$ 594,83 ^b	0,0261 $\pm$ 0,001 ^c

*Diferença significativa é representada por letras diferentes em uma mesma coluna (p $\leq$ 0,05). L.Q- Limite de quantificação (100.000 cm³. m⁻².24h.0,1MPa)

Observa-se que não houve diferença significativa na espessura dos filmes controle em relação aos com BHA. Os filmes com incorporação de extratos naturais, por possuírem extratos mais fibrosos, geraram filmes mais espessos, consequentemente, apresentaram espessuras diferentes significativamente entre eles e aos demais filmes.

Apesar das diferenças de espessura entre os tratamentos, os valores são próximos aos encontrados em filmes de acetato de celulose incorporados com resveratrol¹³ (0,037 a 0,057 mm) e com óleo de orégano/nanoargila (0,0429 a 0,0498 mm)³⁴. Porém, a espessura depende da maneira que os filmes são fabricados e dos diferentes aditivos incorporados, razão pela qual este parâmetro se torna bastante variável. Filmes de acetato de celulose com incorporação de antimicrobianos³⁵ apresentaram espessuras duas ou até quatro vezes maiores que os do presente trabalho.

Os resultados da análise de permeabilidade ao CO₂ mostraram que os filmes controle, com BHA e com extrato de chá verde/alecrim não apresentaram diferença entre si. O filme com incorporação de extrato de casca de pequi apresentou permeabilidade maior que o limite de quantificação do equipamento.

A permeabilidade do controle e do BHA corroboram com a análise realizada de microscopia eletrônica (Quadro1), demonstrando a similaridade que existe na superfície destes dois filmes. Já o filme de CA possui poucos poros em sua superfície, o que poderia proporcionar um aumento de permeabilidade, mas, possivelmente, sua maior espessura os torna semelhante aos filmes de BHA e controle.

A alta permeabilidade do filme com casca de pequi pode também ser explicada pela análise de microscopia eletrônica (Quadro 3.1), por sua superfície ser composta com alta quantidade de poros, consequentemente sua permeabilidade a gases será alta.

Observa-se que os filmes incorporados com extratos naturais apresentaram resultados de tensão máxima, tensão na ruptura e módulo de elasticidade (Tabela 3.6) significativamente menores que os demais filmes. A adição dos extratos naturais (mais fibroso) gerou filmes com menor resistência à tração e menos rígidos. A composição desses extratos pode resultar filmes com empacotamento heterogêneo de camadas, tornando menor a interação intermolecular e causando um decréscimo nos valores desses parâmetros ²⁹.

TABELA 3.6. Valores das análises de tração dos filmes com incorporação de extrato de casca de pequi (P), extrato de chá verde/alecrim (CA), BHA (B) e filme controle (C).

Filmes	Tensão máx. (MPa)	Tensão ruptura (MPa)	Módulo de Young (MPa)	Elongação (%)	Força máx. perfuração (N)
C	51,582 ± 3,786 ^a	51,081 ± 3,569 ^a	2511,773 ± 229,332 ^a	5,216 ± 1,556 ^a	22,658 ± 1,748 ^a
P	31,823 ± 4,217 ^b	32,282 ± 3,226 ^b	1871,064 ± 84,790 ^b	2,255 ± 0,460 ^b	7,579 ± 1,777 ^b
CA	24,955 ± 1,67 ^c	24,855 ± 1,641 ^c	1303,380 ± 92,536 ^c	5,609 ± 1,343 ^a	7,062 ± 2,305 ^b
B	52,901 ± 3,501 ^a	52,068 ± 3,298 ^a	2642,759 ± 111,733 ^a	4,441 ± 1,296 ^a	20,727 ± 3,634 ^a

*Diferença significativa é representada por letras diferentes em uma mesma coluna (p ≤ 0,05).

Coelho²⁹ adicionou nanoargila em filmes de polietileno e também notou queda nos valores de tensão, porém obteve valores ainda menores (12 a 14 Mpa) que os do presente estudo.

Filmes de acetato de celulose incorporados com óleos de resina³⁶, óleo de cravo e de orégano²⁸, também apresentaram queda significativa na tensão máxima. A adição de alecrim/pimenta e de óleo de capim limão aos filmes de acetato de celulose diminuiu significativamente o módulo de elasticidade¹⁰.

Observa-se que o filme com extrato de casca de pequi apresentou alongação significativamente menor que os demais filmes. O acréscimo de óleos e extratos naturais pode diminuir a tensão de um filme e aumentar sua alongação. Porém, dependendo da quantidade adicionada, essa relação pode não ocorrer²⁸. Em determinadas quantidades, o filme pode não ter um alongamento significativo, apresentando valores baixos de alongação, o que, provavelmente, ocorreu no presente estudo, ao se adicionar 20% do extrato de casca de pequi.

Ao analisar a força máxima à perfuração, observa-se que os filmes com extratos naturais apresentaram resistência significativamente menor que os demais filmes. Esse parâmetro também, provavelmente, foi afetado pelas forças intermoleculares e pela orientação das moléculas. A diminuição dessas interações pode ser a explicação para a baixa resistência desses filmes à ruptura, uma vez que esses são os filmes mais espessos^{31, 37}.

A força de resistência à perfuração tende a seguir os padrões estabelecidos pela resistência à tensão e tensão à ruptura, uma vez que aumentam ou diminuem de acordo com uma maior ou menor interação entre as moléculas³.

Os filmes com extratos naturais, mesmo apresentando valores menores, ainda são considerados com boa resistência à perfuração ao serem comparados com filmes de amido com adição de poli-3-hidroxibutirato, que apresentaram valores de 0,2 a 0,54N à medida que se aumentou o teor de amido³¹, ou com filmes com 3% de amido e 20% de glicerol com 6N de força à perfuração³.

Desta forma, os resultados mostram que ao se adicionar os extratos naturais, que são de uma composição mais complexa que o aditivo BHA, esses acabam diminuindo as interações entre moléculas, reduzindo todos os parâmetros de resistência mecânica do filme.

O fato de estes parâmetros dependerem da interação molecular de seus componentes e da orientação de suas moléculas (ocorrido durante a elaboração manual do filme), sua variabilidade acaba sendo maior, o que não permite observar uma padronização entre os estudos.

3.4. Análise de migração

A migração de antioxidantes através de um polímero é um processo complexo e é afetado, principalmente, pela matriz desse polímero, pela natureza do antioxidante, pela interação entre eles e pela composição do alimento em contato com o polímero³⁸.

O teste de migração ocorreu 10 dias de armazenamento, como demonstrado nas Figuras 3.2 e 3.3. Para os extratos naturais, a migração foi mensurada através do potencial antioxidante presente nos simulantes de água (5% de etanol) e de gordura (95% etanol). O potencial antioxidante mostrou atingir uma liberação máxima com dois dias, apresentando, posteriormente, queda até o último dia de análise. Isso pode ser explicado em razão da instabilidade de compostos antioxidantes, principalmente compostos fenólicos, que facilmente são oxidados, degradados ou volatilizados no meio ambiente³⁹.

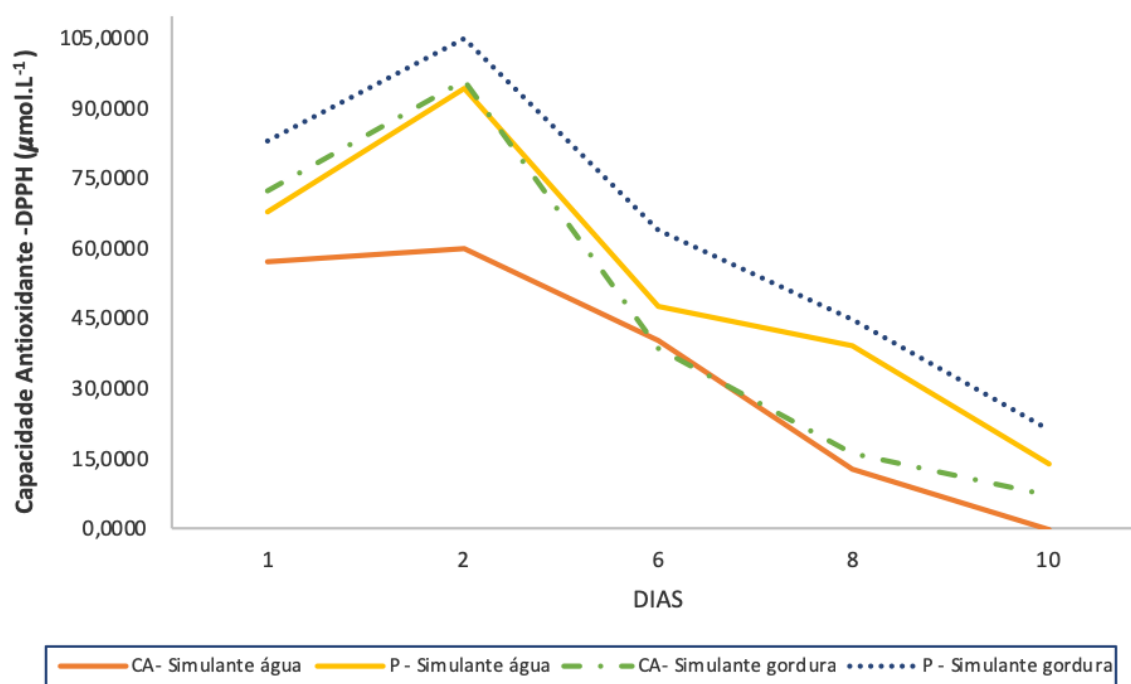


FIGURA 3.2 - Migração dos antioxidantes naturais (chá verde/alecrim e casca de pequi) para os simulantes de água e de gordura.

Vale ressaltar que para a migração dos compostos fenólicos após dois dias, não se pode afirmar que há queda na migração, mas sim que os compostos disponíveis no simulante para detecção se degradam, diminuindo o potencial antioxidante medido.

O tempo para se atingir a migração máxima de um composto é muito variável, já que depende não só da matriz, mas do aditivo e da interação entre eles. Além da natureza do composto presente no filme, outros fatores influenciam na migração de compostos, tais como o tamanho, a forma das moléculas e a porosidade do filme¹². Filmes de acetato de celulose

com adição de timol apresentaram migração máxima com duas horas¹, enquanto no presente estudo ocorreu com dois dias.

A migração dos filmes com BHA (Figura 3.3) se manteve estável durante os dez dias de análise. Esse resultado sugere que a máxima migração deste composto tenha ocorrido durante as primeiras 24 horas e, em razão de sua estabilidade química, esteve presente no simulante durante todo o período de análise.

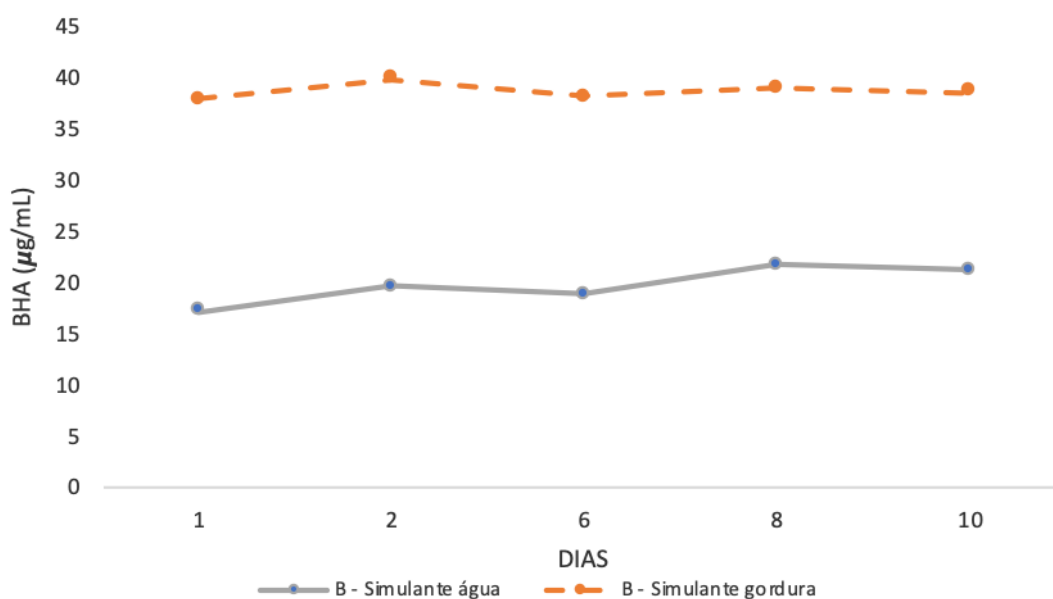


FIGURA 3.3 - Migração do BHA para os simulantes de água e gordura.

Filmes de acetato de celulose com incorporação com complexo ciclodextrina-resveratrol após atingirem o máximo de migração para o simulante também apresentaram estabilidade¹³.

O fator em comum entre os sistemas de migração foi que, em meio simulante de gordura, independentemente do substrato, a quantidade liberada para o meio se mostrou superior à quantidade liberada quando inserida no simulante de água. Isso ocorreu devido a maior afinidade entre os aditivos e a natureza química do simulante. Dicastillo et al.³⁸ também encontraram maior migração em simulante 95% de etanol do que em simulante 10% de etanol, para todos os filmes testados de EVOH com adição de quercetina, ácido ferúlico, ácido ascórbico e extrato de chá verde.

4. CONCLUSÃO

O filme com melhor custo benefício foi o de 3 g de acetato de celulose e 10% de tween 80, sendo a formulação escolhida para a produção dos filmes ativos.

Os filmes com extratos naturais (casca de pequi e chá verde/alecrim) obtiveram menor resistência mecânica, porém apresentaram migração para os simulantes mais gradativa do que o filme de BHA.

Ao analisar a parte morfológica dos filmes, a microscopia eletrônica de varredura confirma os dados para permeabilidade ao CO₂, mostrando a alta porosidade/permeabilidade do filme com incorporação de extrato de casca de pequi.

Todos os filmes serão capazes de serem utilizados como filmes ativos em alimentos, uma vez que sua ação direta no alimento é protegida por uma embalagem externa, não exigindo grandes resistências mecânicas.

5. REFERÊNCIAS

1. Rodriguez FJ, Torres A, Penaloza A, Sepulveda H, Galotto MJ, Guarda A, et al. Development of an antimicrobial material based on a nanocomposite cellulose acetate film for active food packaging. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*. 2014;31(3):342-53.
2. Marcos B, Sárraga C, Castellari M, Kappen F, Schennink G, Arnau J. Development of biodegradable films with antioxidant properties based on polyesters containing a -tocopherol and olive leaf extract for food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*. 2014;1(2):140-50.
3. da Matta MD, Sarmiento SBS, de Oliveira LM, Zocchi SS. Mechanical properties of pea starch films associated with xanthan gum and glycerol. *Starch-Starke*. 2011;63(5):274-82.
4. Herniou-Julien C, Mendieta JR, Gutierrez TJ. Characterization of biodegradable/non-compostable films made from cellulose acetate/corn starch blends processed under reactive extrusion conditions. *Food Hydrocolloids*. 2019;89:67-79.
5. McHugh TH, Krochta JM. Sorbitol-plasticized vs glycerol-plasticized whey-protein edible films - integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1994;42(4):841-5.
6. Rodriguez M, Osés J, Ziani K, Mate JI. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*. 2006;39(8):840-6.
7. Pinheiro AC, Cerqueira MA, Souza BWS, Martins JT, Teixeira JA, Vicente AA. Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares. *Boletim de Biotecnologia*. 2010;out 2010:18-28.
8. Silva FA, Ferreira VC, Madruga MS, Estevez M. Effect of the cooking method (grilling, roasting, frying and sousvide) on the oxidation of thiols, tryptophan, alkaline amino acids and protein cross-linking in jerky chicken. *Journal of Food Science and Technology*. 2016;54(on line).
9. Cerqueira DA, Rodrigues G, Carvalho RD, Valente AJM. H-1-NMR Characterization of Cellulose Acetate Obtained from Sugarcane Bagasse. *Polimeros-Ciencia E Tecnologia*. 2010;20(2):85-91.
10. Bastos MDR, Laurentino LD, Canuto KM, Mendes LG, Martins CM, Silva SMF, et al. Physical and mechanical testing of essential oil-embedded cellulose ester films. *Polymer Testing*. 2016;49:156-61.
11. Carvalho DD, Takeuchi KP, Geraldine RM, de Moura CJ, Silveira MFA. Active film of cellulose acetate incorporated with nanosuspension of curcumin. *Polimeros-Ciencia E Tecnologia*. 2017;27:70-6.
12. Paunonen S. Strength and Barrier Enhancements of Cellophane and Cellulose Derivative Films: A Review. *Bioresources*. 2013;8(2):3098-121.

13. Silva A, Duarte A, Sousa S, Ramos A, Domingues FC. Characterization and antimicrobial activity of cellulose derivatives films incorporated with a resveratrol inclusion complex. *Lwt-Food Science and Technology*. 2016;73:481-9.
14. Silveira MFA, Soares NFF, Geraldine RM, Andrade NJ, Botrel DA, Goncalves MPJ. Active film incorporated with sorbic acid on pastry dough conservation. *Food Control*. 2007;18(9):1063-7.
15. Sarantopoulos FGT. Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades 2 Ed ed. Campinas: ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos; 2017. 432 p.
16. Nielsen LE. Models for the Permeability of Filled Polymer Systems. *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry*. 1967;1(5):929-42.
17. Alves AM, Dias T, Hassimotto NMA, Naves MMV. Ascorbic acid and phenolic contents, antioxidant capacity and flavonoids composition of Brazilian Savannah native fruits. *Food Science and Technology*. 2017;37(4):564-9.
18. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº64 de 16 de setembro de 2008. Regulamento Técnico sobre Atribuição de aditivos e seus limites máximos para alimentos. [acesso em 15 março de 2017] Disponível em www.anvisa.gov.br.
19. American Society for Testing and Material – ASTM. 882-10: Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting . West Conshohocken: ASTM (2010).
20. American Society for Testing and Material – ASTM. 434-82: Standard test method for determining gas permeability characteristics of plastic film and sheeting. West Conshohocken: ASTM (2010).
21. European Commission Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, (2011).
22. Nilsuwan K, Benjakul S, Prodpran T. Properties and antioxidative activity of fish gelatin-based film incorporated with epigallocatechin gallate. *Food Hydrocolloids*. 2018;80:212-21.
23. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 1995;28(1):25-30.
24. Beker D, Lovrec V. Determination of butylated hydroxytoluene in poultry premix by high-performance liquid-chromatography. *Journal of Chromatography*. 1987;393(3):459-61.
25. Baker MM, Belal TS, Mahrous MS, Ahmed HM, Daabees HG. A validated stability-indicating HPLC-DAD method for simultaneous determination of econazole nitrate, triamcinolone acetonide, benzoic acid and butylated hydroxyanisole in cream dosage form. *Analytical Methods*. 2016;8(10):2185-200.
26. Mousavi SA, Gholizadeh M, Sedghi S, Pourafshari-Chenar M, Barmala M, Soltani A. Effects of preparation conditions on the morphology and gas permeation properties of

polyethylene (PE) and ethylene vinyl acetate (EVA) films. *Chemical Engineering Research & Design*. 2010;88(12A):1593-8.

27. Guillard V, Mauricio-Iglesias M, Gontard N. Effect of Novel Food Processing Methods on Packaging: Structure, Composition, and Migration Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2010;50(10):969-88.

28. Magalhaes RMF. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e incorporação em filme de acetato celulose na conservação de carne resfriada de frango. [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos; 2012..

29. Coelho LB. Efeito da incorporação do nanocomposto montmorilonita e do óleo essencial de orégano em filmes de polietileno de baixa densidade atividade antimicrobiana de óleos essenciais e incorporação em filme de acetato celulose na conservação de carne resfriada de frango. [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos; 2013.

30. Andreuccetti C, Carvalho RA, Galicia-Garcia T, Martinez-Bustos F, Grosso CRF. Effect of surfactants on the functional properties of gelatin-based edible films. *Journal of Food Engineering*. 2011;103(2):129-36.

31. Reis KC, Pereira J, Smith AC, Carvalho CWP, Wellner N, Yakimets I. Characterization of polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate (PHB-HV)/maize starch blend films. *Journal of Food Engineering*. 2008;89(4):361-9.

32. Roy S, Rhim JW. Preparation of carbohydrate-based functional composite films incorporated with curcumin. *Food Hydrocolloids*. 2020;98.

33. Davanco T, Tanada-Palmu P, Grosso C. Composite films made with gelatin, tracetin, stearic and caproic acids: effect of pH and surfactants addition on the functionality of films. *Ciencia E Tecnologia De Alimentos*. 2007;27(2):408-16.

34. Pola CC, Medeiros EAA, Pereira OL, Souza VGL, Otoni CG, Camilloto GP, et al. Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. *Food Packaging and Shelf Life*. 2016;9:69-78.

35. Santiago-Silva P, Soares NFF, Nobrega JE, Junior MAW, Barbosa KBF, Volp ACP, et al. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA (R) 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control*. 2009;20(1):85-9.

36. Takeuchi AP. Caracterização antimicrobiana de componentes do açafrão (curcuma longa) e elaboração de filmes ativos com montmorilonita e óleo resina de açafrão. [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos; 2012

37. Galus S, Kadzinska J. Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science & Technology*. 2015;45(2):273-83.

38. Lopez-de-Dicastillo C, Gomez-Estaca J, Catala R, Gavara R, Hernandez-Munoz P. Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. *Food Chemistry*. 2012;131(4):1376-84.

39. Lopez-de-Dicastillo C, Alonso JM, Catala R, Gavara R, Hernandez-Munoz P. Improving the Antioxidant Protection of Packaged Food by Incorporating Natural Flavonoids into Ethylene-Vinyl Alcohol Copolymer (EVOH) Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(20):10958-64.

CAPÍTULO 4 – EFEITO DE FILMES DE ACETATO DE CELULOSE ATIVOS NA OXIDAÇÃO LIPÍDICA E PROTEICA DE FILÉS DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi produzir filmes ativos de acetato de celulose, com a incorporação de antioxidantes, e avaliar seu efeito na oxidação lipídica e proteica de filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*). O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, composto por quatro tratamentos (controle, BHA, extrato chá verde/alecrim e pequi) e quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, seguida de comparação das médias por Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os filés foram envoltos nos filmes ativos, embalados a vácuo em sacos de polietileno e armazenados por 15 dias a 4°C. Análises físico-químicas foram realizadas nos tempos 0 (fez-se pool dos filés de peixes) e no tempo 15. Análises microbiológicas (*Salmonella sp.* e *Staphylococcus sp.*), de TBARS, carbonilas proteicas e sulfidrilas foram realizadas nos tempos 0, 4, 7, 10, 12 e 15 dias. Durante o período de armazenamento, todos os filés mantiveram qualidade microbiológica. Em relação à oxidação lipídica, o filme controle retardou a formação de malonaldeído (MDA) por apenas 4 dias, enquanto os filés acondicionados em filmes incorporados com BHA e extrato de casca de pequi obtiveram resultados abaixo de 2mg MDA/Kg de carne (recomendado) até 10 dias de armazenamento. Estes também foram os filmes que conseguiram manter a oxidação proteica controlada por sete dias.

Palavras-chave: antioxidante; acetato de celulose; pequi, chá verde; alecrim; BHA.

CHAPTER 4- EFFECT OF ACTIVE CELLULOSE ACETATE FILMS ON LIPID AND PROTEIN OXIDATION OF TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) FILLETS

ABSTRACT

The aim of this study was to produce active cellulose acetate films with incorporation of antioxidants and to evaluate their effect on lipid and protein oxidation of tilapia (*Oreochromis niloticus*) filets. The experiment was conducted in a randomized block design, composed of four treatments (control, BHA, green tea extract / rosemary and pequi) and four replications. Data were analyzed by analysis of variance after media comparison by Scott-Knott with 5% probability. The filets were wrapped in active films, vacuum packed in polyethylene bags and stored for 15 days at 4 ° C. Physical and chemical analyzes were performed at times 0 (made a pool of fish filets) and at time 15 (with each treatment). Microbiological analyzes (*Salmonella sp. and Staphylococcus sp.*) and TBARS, protein carbonyls and sulfhydryl were performed at 0, 4, 7, 10, 12 and 15 days. During storage, all filets maintained microbiological quality. Regarding lipid oxidation, the control film delayed the formation of malonaldehyde (MDA) by only 4 days, while the filets packed in films incorporated with BHA and pequi peel extract obtained results below 2mg MDA / kg meat (recommended) up to 10 days . These were also the films that were able to keep protein oxidation under control for seven days.

Keywords: antioxidant; cellulose acetate; BHA, green tea; rosemary; pequi.

1. INTRODUÇÃO

É crescente a preocupação do consumidor com a qualidade dos alimentos, tanto em relação a serem saudáveis e nutritivos, quanto à praticidade, ao sabor e à inocuidade¹.

Durante os processos de fabricação, distribuição e armazenamento dos alimentos, estes sofrem alterações químicas e microbiológicas. A deterioração química mais relevante que ocorre nestes processos é a oxidação, seja de lipídeos ou proteínas², o que diminui a vida útil, o valor nutricional, as propriedades funcionais e a qualidade sensorial dos alimentos³.

A oxidação de lipídeos foi uma das primeiras reações químicas de deterioração estudada em alimentos. Ela provoca perda de sabor, rancidez e mudança na textura e cor dos alimentos⁴. É uma reação com alta energia de ativação para a formação de radicais livres, podendo ser ativada pela exposição do alimento ao calor, luz, íons metálicos ou oxigênio^{5, 6}.

A formação de radicais livres, por qualquer forma de ativação, gera uma reação em cadeia, “atacando” os lipídeos presentes e alterando a composição química e a qualidade do alimento⁵. Durante a oxidação lipídica, na degradação dos ácidos graxos poli-insaturados, ocorre a formação de aldeídos com potencial tóxico, diminuindo consideravelmente o valor nutricional do alimento^{4, 7}.

Os primeiros compostos a serem formados neste “ataque” são os hidroperóxidos, que são altamente reativos, formando, posteriormente, as reações de auto-oxidação. Os produtos secundários da oxidação são aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos (alcanos e alcenos) e álcoois. Estes compostos voláteis são os responsáveis pela perda de sabor, odor e rancidez dos alimentos^{8, 9}.

Outro tipo importante de oxidação em alimentos é o das proteínas. Esse tipo de oxidação já é estudado na medicina há muito tempo (ligada a doenças como Alzheimer), mas só há pouco mais de dez anos começou a ser relacionada à qualidade de alimentos^{10, 11}.

Neste processo, vários produtos são formados dependendo do alimento, da composição de aminoácidos presentes e do “ativador” do processo oxidativo¹⁰. Alguns dos aminoácidos mais susceptíveis a reações oxidativas são: lisina, prolina, cisteína, metionina, arginina, treonina e histidina^{8, 12}.

Dentre as principais alterações causadas pela oxidação proteica estão a formação de carbonilas, as ligações cruzadas inter e intramoleculares, a perda da estrutura proteica, a formação de pontes dissulfetos, e ditirosina, além da diminuição da solubilidade proteica^{10, 12}.

Todas essas alterações químicas afetam a qualidade dos alimentos, modificando a coloração, diminuindo a digestibilidade, as propriedades de formação de gelatina, a

capacidade de retenção de água, redução da maciez e suculência em carnes e produtos cárneos^{11, 13}.

Ambas as reações de oxidação são potentes. Por esta razão, as substâncias antioxidantes vêm sendo utilizadas no combate destes processos oxidativos, já que uma reação afeta diretamente a outra. Os antioxidantes diminuem as taxas de reações oxidativas por diversos meios, ligando-se aos radicais livres ou combinando-se com metais pró-oxidativos. Podem ainda reagir com oxigênio singlete e fotossensibilizadores ou inativar lipoxigenases¹⁴.

Existem antioxidantes naturais e sintéticos. Os sintéticos mais utilizados pela indústria de alimentos são: butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), galato de propila (PG) e terc-butil hidroquinona (TBHQ)¹⁴. Porém, o consumo desses compostos sintéticos vem sendo correlacionado aos efeitos tóxicos e cancerígenos³ e, por precaução a saúde, nos últimos anos, estão sendo substituídos pelos antioxidantes naturais¹⁵. Dentre os antioxidantes naturais estão os carotenoides, flavanois, ácidos fenólicos e tocoferol, podendo ser encontrados em frutas, ervas, temperos, chás, tubérculos e outros^{9, 14}.

Os antioxidantes podem ser adicionados direta ou indiretamente ao alimento. Através do uso de embalagens ativas, essa adição, que ocorre de forma gradativa e indireta, vem se mostrando muito eficiente no controle de processos oxidativos⁵.

Em relação à deterioração, as carnes e produtos cárneos se mostram muito susceptíveis, devido a sua composição química, sofrendo, assim, ambos os tipos de oxidação. Dentre eles, os pescados se destacam em razão de seu potencial nutritivo, já que são ricos em ácidos graxos poli-insaturados e proteínas, o que os tornam alvos desses processos, em face de sua composição química^{1, 16, 17}.

O consumo de pescados no Brasil ainda é tímido em razão do alto preço e por problemas de controle de qualidade na cadeia de produção. Em relação a outros produtos, ainda há pouca variedade disponível no mercado, baixo e dificuldades de se encontrar produto fresco. No Brasil, um dos peixes mais populares é a tilápia (*Oreochromis niloticus*), sendo este peixe cultivado e comercializado, principalmente, na forma de filés congelados¹⁸.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi produzir filmes ativos de acetato de celulose com a incorporação de antioxidantes sintético (BHA) e naturais (extrato de chá verde/alecrim e extrato de casca de pequi) e avaliar seu efeito na oxidação lipídica e proteica de filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) refrigerados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparação do extrato natural de casca de pequi

O pequi, fruto do bioma Cerrado, foi adquirido no mercado local e teve sua casca separada da polpa. Os extratos metanólicos foram produzidos segundo Alves et al.¹⁹. Cada produto foi congelado a -18°C e, posteriormente, fracionado em fragmentos de 6cm² e liofilizado por 48 horas. Homogeneizou-se 0,5 g de amostra liofilizada em 25 mL de metanol/água (70:30 v/v), em agitador magnético por 2 horas a 4°C.

Posteriormente, o extrato metanólico produzido foi rotaevaporado por 1 hora, perdendo o solvente presente. O concentrado resultante da rotaevaporação foi diluído em água destilada (1:1 v/v), congelado a -18 °C por 48 h e liofilizado por 72 h, obtendo-se assim, o extrato natural de casca de pequi.

2.2. Produção dos filmes ativos

Para produção dos filmes foram utilizados: acetato de celulose cedido pela empresa Rhodia; tween 80 P.A. marca Vetec, acetona P.A. 99,6% marca Neon, BHA marca Sigma-Aldrich, extrato natural de casca pequi, obtido neste estudo, e extrato natural de chá verde/alecrim cedido pela empresa Kemin®.

Frascos âmbar contendo 3g de acetato de celulose, 0,3g de tween 80 (T80), 30 mL de acetona e antioxidante (Tabela 4.1), foram colocados em homogeneizador rotativo (Phoenix, modelo AP32, Araraquara) por 24h e, em seguida, deixados em repouso por 1h, para evitar a formação de bolhas.

TABELA 4.1 - Antioxidantes incorporados aos filmes ativos.

Tratamento	Antioxidante (%)*
Controle - C	0
Pequi - P	20
Chá Verde/Alecrim - CA	10
BHA - B	2

* Porcentagem do antioxidante em relação ao acetato de celulose.

Os filmes foram preparados pelo método “casting”²⁰. As soluções filmogênicas foram espalhadas manualmente em placa de vidro, com ajuda de um bastão de vidro. Após completa evaporação da acetona, obtiveram-se os filmes.

O uso máximo permitido do BHA é regido por legislação (0,02%)²¹. Já a maior proporção do extrato de casca de pequi se deve a não purificação deste em laboratório, fazendo com que haja mais interferentes em sua migração e eficiência.

2.3. Armazenamento dos filés de tilápia com os filmes ativos

Os filés de tilápia foram adquiridos em um frigorífico de pescados da região. Foram distribuídos, aleatoriamente, em embalagens para os diferentes tratamentos: filme sem antioxidante (C - controle), filme com extrato natural de casca e mesocarpa de pequi (P), filme com extrato natural de chá verde/alecrim (CA) e filme com BHA (B).

Cada filé, com peso de 110 a 135g, foi envolto no filme ativo e acondicionado em embalagem de polietileno, a vácuo. Depois de embalados, os filés foram mantidos sob refrigeração ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), durante 15 dias.

Nos tempos 0 (filés antes do acondicionamento), 4, 7, 10, 12 e 15 dias de estocagem, os filés foram analisados quanto à oxidação lipídica (TBARS), à oxidação proteica (carbonilas e sulfidrilas) e ao controle microbiológico (*Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* spp.). Também nos tempos 0 e 15 dias foram realizadas análises físico-químicas dos filés.

2.4. Ensaios físico-químicos

As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata. O teor de umidade foi obtido pelo método de secagem em estufa a 105°C , até peso constante. Para as cinzas realizou-se a incineração da matéria orgânica das amostras em mufla a 550°C ²². A análise de proteína foi realizada pelo método de Kjeldahl²², considerando fator de 6,25. E para a quantificação de lipídeos foi utilizado o método de Bligh e Dyer²³.

2.5. Ensaios de oxidação

2.5.1 Oxidação proteica – carbonilas

A carbonila proteica foi determinada pelo método descrito por Oliver et al.²⁴, modificado por Vuorela et al.²⁵. Para cada amostra, duas medidas foram realizadas na quantificação da oxidação proteica: I) quantificação de carbonila e II) determinação do branco.

Pesou-se 1 g de amostra triturada, que foi homogeneizada com 10 mL de cloreto de potássio 0,15 M por 1 min. Da mistura obtida, para cada procedimento (I e II), foram coletados 200 μL e colocados em tubos para centrifuga, contendo 2 mL de TCA 10%.

Procedeu-se a centrifugação dos tubos a 2.880g por 5 min a 4°C e o líquido sobrenadante foi descartado.

Para o procedimento I (carbonila), ao sedimento resultante da centrifugação adicionou-se 2 mL de ácido clorídrico 2 M, contendo 0,2% de 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH) (2,4-Dinitrophenilhydrazine). Para o II (branco) foram adicionados 2 mL de ácido clorídrico 2 M. Ambas as amostras foram incubadas por 1 h a temperatura ambiente, sendo agitadas em vórtex a cada 20 min.

Em seguida, para ambas as amostras, adicionou-se 2 mL de TCA 10% e centrifugou a 2.880g por 5 min a 4°C. O líquido sobrenadante foi removido, de forma a não coletar sólidos dos sedimentos. Os sedimentos foram lavados com 2 mL da mistura de etanol e acetato de etila (1:1), agitados em vórtex e centrifugados a 11.500 g por 5 min a 4°C. O procedimento foi realizado três vezes.

Após remover o líquido sobrenadante completamente, os sedimentos foram secos com nitrogênio gasoso e adicionou-se 3 mL de solução de fosfato 20 mM, contendo cloridrato de guanidina 6 M (de pH final de 2,3, ajustado com ácido trifluoroacético), em cada tubo. As amostras foram agitadas e centrifugadas a 2.880 g por 5 min a 4°C. Posteriormente, foram realizadas as leituras das amostras e dos brancos a 370 nm, em espectrofotômetro UV/VIS (Lambda 25, PerkinElmer).

A carbonila foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de $21.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e o resultado expresso em nmol de carbonila.mg⁻¹ de proteína. A análise foi realizada em triplicata. Para a quantificação de proteína das amostras utilizou-se o método de Kjeldahl²².

2.5.2 Oxidação proteica - sulfidrila

O conteúdo dos grupos sulfidrila foi determinado utilizando o ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) de acordo com o método de Ellman²⁶, modificado por Eymard et al.²⁷.

Pesou-se 0,5 g de amostra de filé triturada, que foi homogeneizada com 10 mL de tampão fosfato 0,05 M e pH 7,2 por 1 min. Do homogeneizado coletou-se 1 mL, transferiu-se para tubo de centrífuga e homogeneizou-se com 9 mL de tampão fosfato 0,05 M e pH 7,2, contendo ureia 8 M, NaCl 0,6 M e EDTA 6 mM (solução A). A mistura foi centrifugada durante 15 min a 14.000g a 5°C.

Coletaram-se 3 mL do sobrenadante, que foi homogeneizado com 40 μ L de solução de DTNB 0,01 M, preparada com acetato de sódio 0,05 M. Após, a mistura foi incubada a 40°C por 15 min. O branco foi preparado com 1 mL de tampão fosfato 0,05 M e pH 7,2 e 9 mL de solução A. A absorbância foi determinada a 420 nm, em espectrofotômetro UV/VIS (Lambda 25, PerkinElmer). A sulfidril foi quantificada utilizando o coeficiente de extinção molar de $13.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e o resultado expresso em nmol de sulfidril.g⁻¹ de proteína.

2.5.3. Oxidação lipídica – TBARS

A oxidação dos lipídeos das amostras dos filés foi realizada pela avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme metodologia de Vyncke²⁸.

Para a extração ácida, adicionou-se 50 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 7,5% em 10g de amostra triturada em multiprocessador de alimentos. A mistura foi homogeneizada por 5 minutos. Após, realizou-se a filtração com filtro quantitativo em balão volumétrico de 50 mL, completando o volume do filtrado com TCA 7,5%. Coletaram-se 5 mL do filtrado, em tubo com tampa rosqueável, para reagir com 5 mL de solução de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,02 M. Os reagentes foram agitados em vórtex. Fez-se um branco com 5 mL de água destilada e 5 mL de TCA 7,5%. Os tubos foram aquecidos em banho-maria fervente por 10 min, seguido de resfriamento em água corrente. A absorbância foi determinada a 538 nm, em espectrofotômetro UV/VIS (Lambda 25, PerkinElmer).

Para a quantificação de TBARS, cujo principal composto oxidado é o malonaldeído (MDA) e que reage com o TBA, utilizou-se equação da reta, obtida de curva padrão, composta por seis pontos de solução de tetraetoxipropano (TEP) (1,1,3,3-tetraethoxypropano) em TBA, variando de 0,18 a 0,79 mg.L⁻¹. A leitura das amostras e dos pontos da curva padrão foram feitas em espectrofotômetro UV/VIS (Lambda 25, PerkinElmer) a 538 nm. O resultado foi expresso em mg MDA.kg⁻¹ de amostra de filé.

2.6. Ensaios microbiológicos

2.6.1 *Salmonella* spp.

A análise de *Salmonella* spp. ocorre em várias etapas. Primeiramente há o pré-enriquecimento em solução de água peptonada tamponada e incubação a 37°C por 18 horas. Após essa fase há a etapa de enriquecimento em dois caldos: em caldo Rappaport-Vassiliadis Soja (Caldo RVS) a 41,5°C por 24 horas e em caldo Muller-Kauffmann com tetratonato

novobiocina (MKTTn) a 37°C por 24 horas. Após essas etapas as culturas são inoculadas em meio sólido de Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD). Este procedimento foi realizado segundo ISO 6579:2002²⁹.

2.6.2. *Staphylococcus coagulase positiva*

A contagem de *Staphylococcus sp.* ocorre após semeadura em superfície (em ágar Baird-Parker) e incubação a 35-37°C por 24 e 48 horas. Após esse período é realizado a contagem de coagulase positiva. Este procedimento foi realizado segundo ISO 6888:1999³⁰.

2.7. Análise Estatística

O experimento sob refrigeração foi conduzido em delineamento em blocos casualizados. Todas as análises de oxidação e microbiológicas foram realizadas em quatro blocos, sendo cada bloco com seis tempos de análise e cada análise em triplicata. Foi realizada análise de variância (ANOVA), seguido da comparação das médias pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o software RStudio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas no tempo inicial (zero) e no último tempo (quinze dias), com o objetivo de mensurar umidade, proteína, lipídeos e cinzas, além de observar se os processos oxidativos iriam interferir nos valores totais desses parâmetros.

Observando os dados obtidos (Tabela 4.2), pode-se perceber que o único tratamento que não obteve diferença entre o tempo zero e o tempo quinze, para todos os dados físico-químicos, foi o filé embalado com filme incorporado com extrato de casca de pequi. Para todos os outros tratamentos houve queda significativa em um ou mais parâmetros.

TABELA 4.2. Valores da composição físico-química dos filés de peixe armazenados com filmes controle, com extrato de casca de pequi, com extrato de chá verde/alecrim e BHA, nos tempos 0 e com 15 dias de estocagem.

Tratamentos	Umidade (%)		Cinzas (%)		Proteína (%)		Lipídeo (%)	
	0	15	0	15	0	15	0	15
Controle		75,285 ^{bb} ± 0,577		0,952 ^{ab} ± 0,033		17,278 ^{bb} ± 1,124		1,255 ^{aa} ± 0,281
Pequi		76,953 ^{aa} ± 0,501		1,022 ^{aa} ± 0,071		18,014 ^{aa} ± 0,726		1,313 ^{aa} ± 0,073
Chá verde/alecrim	77,836 ^A ± 0,648	76,833 ^{ab} ± 0,666	1,088 ^A ± 0,203	1,006 ^{ab} ± 0,044	18,347 ^A ± 1,120	17,704 ^{abA} ± 0,804	1,478 ^A ± 0,336	1,103 ^{ab} ± 0,159
BHA		76,282 ^{abB} ± 0,814		0,977 ^{ab} ± 0,108		17,944 ^{abA} ± 0,498		1,409 ^{aa} ± 0,241

* Valores com letras minúsculas diferentes no tempo 15 e letras maiúsculas diferentes entre antes do tratamento e tempo 15, há diferença estatística ($p < 0,05$).

Os filés com filme controle apresentaram perda significativa de umidade, cinzas e proteína, mostrando que o processo de oxidação influenciou quantitativamente a composição química.

O tratamento com incorporação de extrato de chá verde e alecrim só não apresentou diferença para a quantificação de proteína, demonstrando que para esse parâmetro a oxidação não teve influência. Já no tratamento com incorporação de BHA, os processos oxidativos não alteraram o quantitativo nem de proteína, nem de lipídeos, havendo apenas perda de umidade.

Os dados confirmam que todos os tratamentos apresentaram perda de umidade, também obtiveram perda de cinzas, tendo em vista que na liberação de exsudado (perda de umidade), ocorre perda parcial das cinzas diluídas neste líquido¹.

Quanto aos teores de proteína e lipídeos, estes podem ou não ser afetados pelos processos oxidativos e microbiológicos. A diminuição desses teores será significativa dependendo do grau de oxidação e de deterioração microbiológica^{1, 27}.

Estudos com adição de extrato de pequi em carnes também obtiveram sucesso na diminuição dos processos oxidativos, não repercutindo em diferença estatística para os parâmetros físico-químicos³. Lago et al.¹ estudaram embutidos de pescados armazenados por 60 dias, obtendo diferença significativa para oxidação lipídica, porém sem influenciar o quantitativo lipídico¹.

Quando se compara apenas os tratamentos entre si (no tempo 15), nota-se que para umidade e cinzas somente o tratamento com extrato de casca de pequi se diferenciou do controle. Já para lipídeos, o tratamento com extrato de chá verde/alecrim foi o único que não apresentou diferença com o controle. Além disso, o único parâmetro que todos os tratamentos diferiram do controle foi para proteína.

3.2 Análises de oxidação

Os grupos carbonila são os principais produtos químicos formados na oxidação proteica. Durante os quinze dias de estudo, os tratamentos com extrato de casca de pequi e BHA foram os que obtiveram a menor formação destes grupos (Figura 4.1).

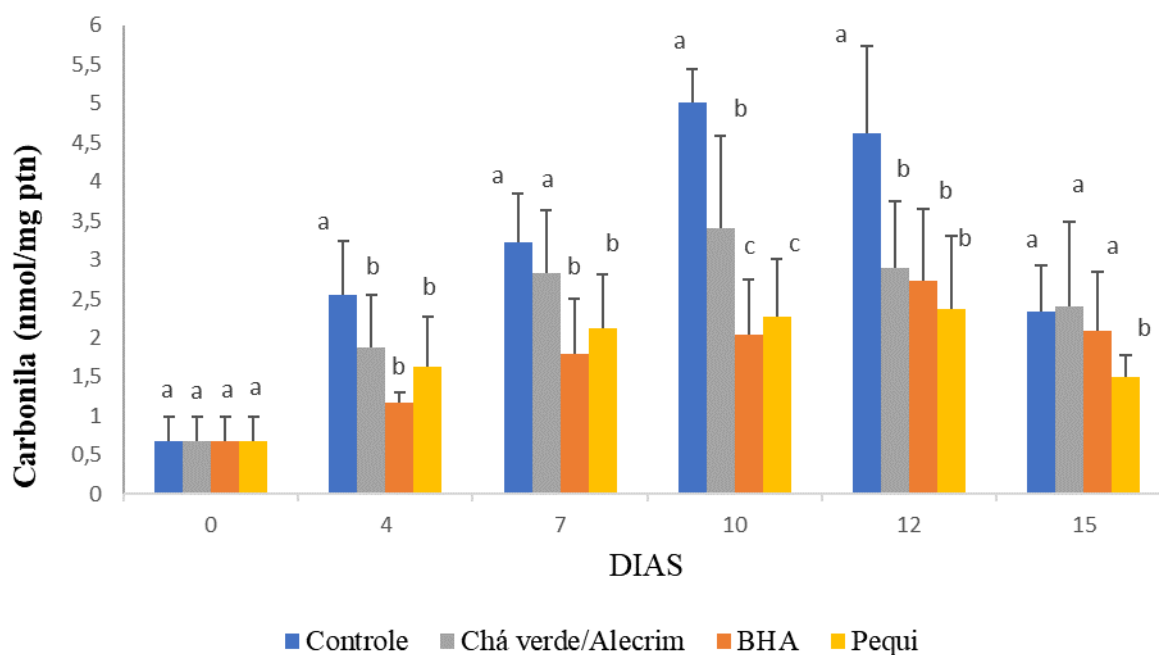


FIGURA 4.1 - Valores para carbonila proteica (nmol/mg proteína) nos filés de peixe armazenados com filmes controle, com extrato de casca de pequi, com extrato de chá verde/alecrim e BHA. Valores com letras minúsculas diferentes no mesmo tempo há diferença estatística ($p < 0,05$).

Nota-se que os valores de carbonila crescem até o décimo dia para a amostra controle e chá verde/alecrim e até o décimo segundo dia para a amostra de pequi e BHA, sendo que após esse período, há queda no quantitativo encontrado. Esse declínio pode ocorrer, pois, uma vez formadas, as carbonilas podem reagir com outros aminoácidos, ou fazerem ligações cruzadas com outras proteínas, diminuindo, assim, o total quantificado desse grupo³¹.

Estudos apontam que alimentos considerados “oxidados” possuem valores de carbonila maiores que 2nmol/mg proteína^{32, 33}. Considerando este limite e comparando os tratamentos dentro de cada tempo, pode-se afirmar que os tratamentos com pequi e BHA conseguiram manter os filés de tilápia “não oxidados”, em relação a carbonila, por sete dias, enquanto o tratamento com chá verde/alecrim manteve por quatro dias e o controle apenas no tempo zero.

Observa-se que no tempo zero, os filés já demonstravam a existência de carbonilas proteicas. Isso ocorre devido ao estresse oxidativo que os animais sofrem ainda *in vivo*, sendo que o grau e o impacto desse stress dependerá da espécie do animal, idade e parte muscular analisada¹³.

Apesar dos dados da literatura mostrarem o extrato de chá verde/alecrim como bons antioxidantes, sua ação no combate às carbonilas não se mostrou eficiente neste estudo. Lund et al¹⁰ não encontraram valores significativos para oxidação proteica com o uso de extrato de alecrim e afirmaram que este extrato não possui efeito sobre a formação de carbonilas.

Outra forma de se medir a oxidação proteica é pela perda de grupos tiol, conhecida por análise de grupos sulfidril. Os grupos sulfidril estão presentes nas proteínas miofibrilares e distribuídos principalmente na cabeça da miosina. Porém, durante o armazenamento e/ou processamento, mudanças estruturais podem ocorrer expondo esses grupos, sendo estes alvos de oxidantes. Uma vez oxidados, há a queda na quantificação destes grupos¹³.

Durante todo o armazenamento, houve queda progressiva dos grupos tiol ao longo do tempo de armazenamento (Figura 4.2). Em todos os tempos de análise, os tratamentos com antioxidantes não diferiram entre si, havendo apenas diferença com o tratamento controle.

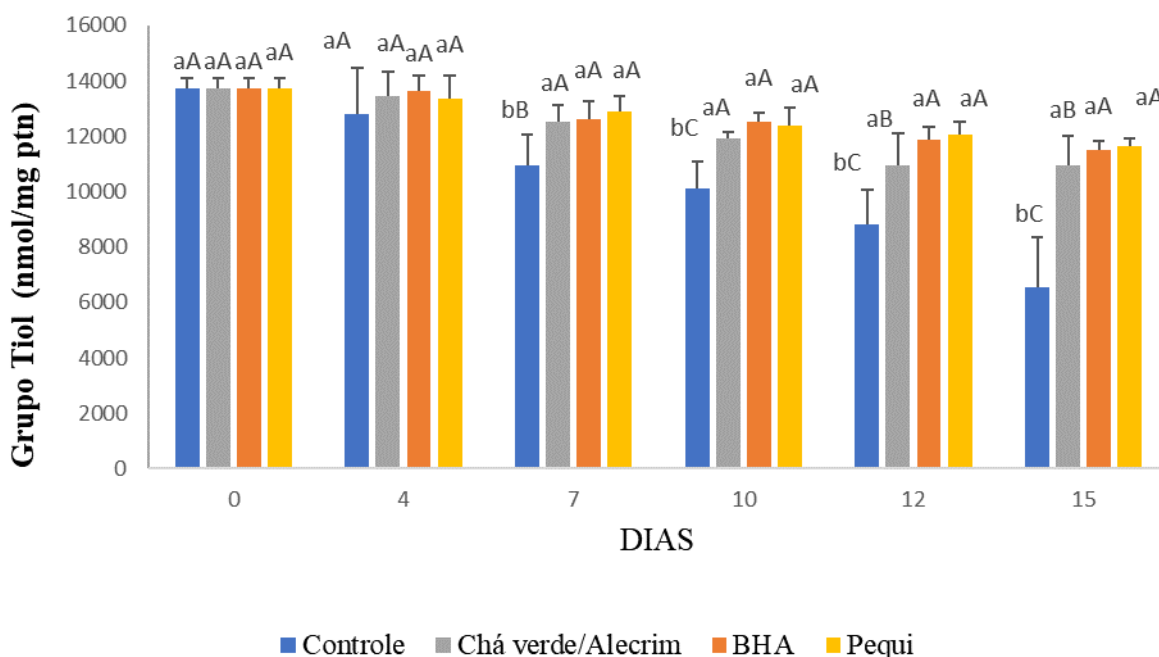


FIGURA 4.2 - Valores para sulfidril (nmol/mg proteína) nos filés de peixe armazenados com filmes controle, com extrato de casca de pequi, com extrato de chá verde/alecrim e BHA. Valores com letras minúsculas diferentes no mesmo tempo e letras minúsculas diferentes nos tratamentos há diferença estatística ($p < 0,05$).

Para quantificação de grupos sulfidril, ainda não há limite aceitável, mas pode-se inferir que neste estudo houve diferença significativa na queda destes grupos, ao longo do armazenamento, no tratamento controle, a partir do sétimo dia, e para o chá verde/alecrim, a partir do décimo segundo dia. Apenas os tratamentos com extrato de casca de pequi e BHA não apresentaram queda significativa ao longo do armazenamento.

Estudos mostram a alta reatividade de aminoácidos que contém enxofre, como cisteína e metionina, quando comparados com outros aminoácidos como arginina e lisina. Desta forma, os grupos tiol nas proteínas são mais susceptíveis a mínimas quantidades de agentes oxidativos, como ocorre, por exemplo, em ambiente sem oxigênio (a vácuo), onde não há índices de oxidação lipídica, embora haja perda significativa de grupos tiol^{8, 34}.

Zhao et al.³¹ armazenaram filés de tilápia com extratos de semente de uva como antioxidante e obtiveram significativa contenção na perda de grupos tiol. Tratamentos com antioxidante apresentaram queda de até 25% de grupos tiol após 12 dias de armazenamento, enquanto o grupo controle apresentou perda de 62%. Ao se analisar o presente estudo, o tratamento com extrato de casca de pequi obteve uma queda de 16% em grupos tiol, enquanto o controle de 53%.

Outra medida de processo oxidativo é a oxidação lipídica através da análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Essas substâncias são indicadores da segunda etapa da oxidação lipídica, em que são formados os compostos que alteram o sabor e o odor dos alimentos⁴.

Na literatura há alguns valores máximos de TBARS para que o alimento seja considerado aceitável para o consumo. Estudos apontam um valor máximo de 1,0 mg MDA/Kg amostra⁴, outros 1,5 mg MDA/Kg amostra³².

A primeira etapa da oxidação lipídica gera hidroperóxidos e somente quando estes são degradados é que há a formação dos compostos secundários. Este fato é comprovado no presente estudo (Figura 4.3), pois observa-se a formação de MDA somente após o sétimo dia para o tratamento com pequi e após o quarto dia para os outros tratamentos.

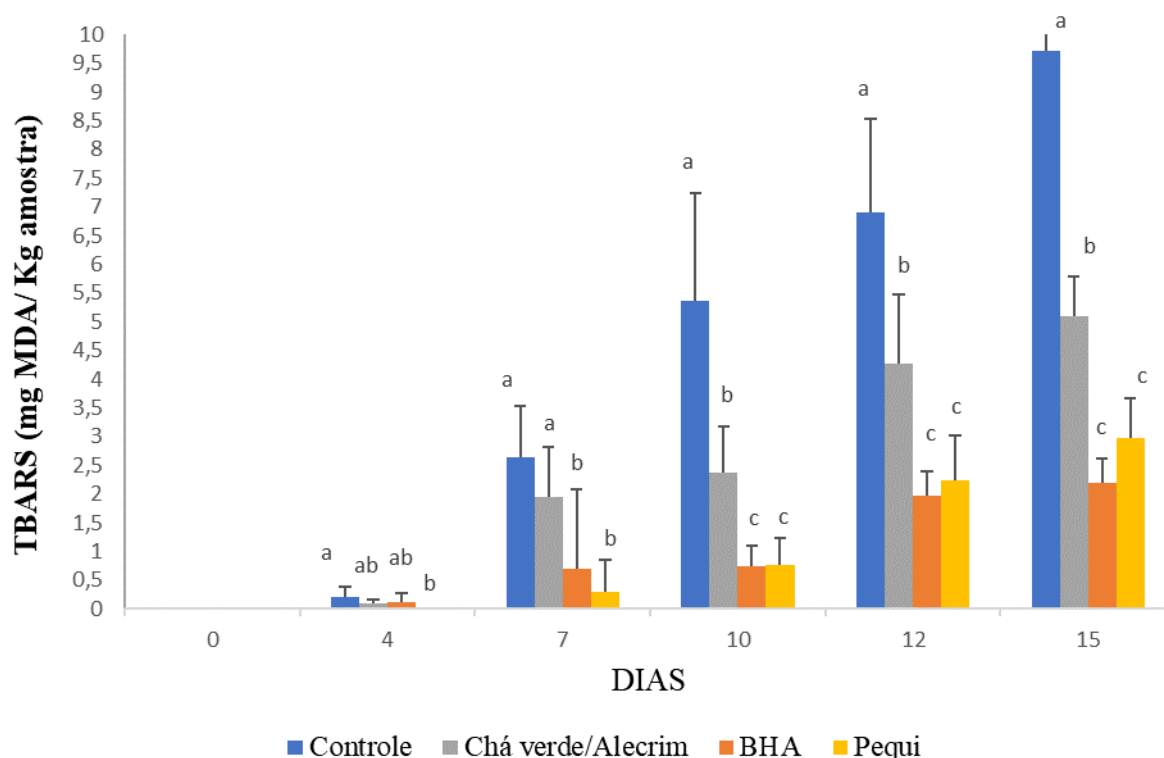


FIGURA 4.3 - Valores para TBARS (mg MDA/Kg amostra) nos filés de peixe armazenados com filmes controle, com extrato de casca de pequi, com extrato de chá verde/alecrim e BHA. Valores com letras minúsculas diferentes no mesmo tempo há diferença estatística ($p < 0,05$).

Independente do limite máximo aceitável utilizado, os tratamentos controle e com extrato de chá verde/alecrim conseguiram manter os filés apenas até o quarto dia de

armazenamento, enquanto os tratamentos com BHA e com extrato de casca de pequi foram eficientes até o décimo dia.

Camo et al.³⁵ comparando o efeito de extrato de orégano e de alecrim na oxidação lipídica em carne de cordeiro, afirmaram que a ação antioxidante e inibidora de TBARS do alecrim não era satisfatória.

Frasao et al.³ compararam a ação de extrato de pequi com o BHT e perceberam que em dez dias de armazenamento o extrato foi o mais eficiente no combate a oxidação lipídica em carne de frango, superando o antioxidante sintético.

Ainda não se sabe ao certo o mecanismo de ação dos antioxidantes em embalagens ativas no combate à formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Não é possível definir, portanto, se o mecanismo de ação ocorre através da migração de moléculas antioxidantes, inativando os radicais livres, ou se pela eliminação de moléculas oxidantes da carne para o filme ativo³⁶.

Independente do mecanismo de ação, o que se consegue comprovar de forma incontestável é que o uso dessas embalagens ativas com incorporação de BHA e extrato de casca de pequi foram eficientes no combate a oxidação em filés de tilápia.

3.3 Análises Microbiológicas

A utilização das análises de *Staphylococcus* e *Salmonella* neste estudo foi uma medida de controle, tendo como principal alvo a ação das embalagens ativas na oxidação de lipídeos e proteínas. Porém, a qualidade microbiológica não podia ser desconsiderada.

No caso de peixes frescos, a legislação brasileira³⁷ determina um limite máximo para *Staphylococcus* coagulase positiva de 10^3 UFC/g de amostra e para *Salmonella* spp. a ausência deste microrganismo.

Durante todos os quinze dias de armazenamento dos filés de tilápia, em temperatura de refrigeração, todos os tratamentos conseguiram manter a qualidade microbiológica dentro dos limites permitidos pela legislação (Tabela 4.3).

Outros estudos utilizaram as análises de controle microbiológico e também obtiveram valores dentro da legislação após o período de armazenamento^{1, 38}.

TABELA 4.3 - Valores para *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g) e *Salmonella spp* nos filés de peixe armazenados com filmes controle (C), com extrato de casca de pequi (P), com extrato de chá verde/alecrim (CA) e BHA (B).

Trat	Análise	Tempo de estocagem (dias)					
		0	4	7	10	12	15
C	<i>Staphylococcus</i>	<1,0x10 ²	5,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²
	<i>Salmonella</i>	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
P	<i>Staphylococcus</i>	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²
	<i>Salmonella</i>	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
CA	<i>Staphylococcus</i>	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	5,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²
	<i>Salmonella</i>	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
B	<i>Staphylococcus</i>	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²	<1,0x10 ²
	<i>Salmonella</i>	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

* Padrão permitido: *Staphylococcus* coagulase positiva máximo 10³; *Salmonella spp*: ausência³⁷.

4. CONCLUSÃO

Os filmes com incorporação de casca de pequi e BHA foram eficientes no controle dos processos oxidativos e microbiológicos. O extrato de chá verde/alecrim, já sendo um extrato comercializado, não apresentou a eficiência esperada, não se diferenciando do controle.

O tempo de validade de pescado refrigerado costuma ser cerca de 4 dias, este presente trabalho demonstrou que com o uso de vácuo e de biofilmes ativos com BHA ou casca de pequi, este tempo pode ser prorrogado para até 10 dias.

Uma vez que o uso e o consumo de antioxidantes sintéticos vêm se mostrando deletérios à saúde, este estudo demonstra a alta eficiência do extrato de casca de pequi, apresentando-se como uma alternativa viável e saudável para utilização em alimentos no combate à oxidação.

5. REFERÊNCIAS

1. Lago AMT, Teixeira JT, Olimpio BJG, Schiassi M, Pimenta CJ, Gomes MED. Shelf life determination of frozen fish sausage produced with fillet and minced fish derived from the Nile tilapia processing. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2019;43(7).
2. Nerin C, Tovar L, Djenane D, Camo J, Salafranca J, Beltran JA, et al. Stabilization of beef meat by a new active packaging containing natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(20):7840-6.
3. Frasao B, Costa M, Silva F, Rodrigues B, Baltar J, Araujo J, et al. Effect of pequi (*Caryocar brasiliense*) and jucara (*Euterpe edulis*) waste extract on oxidation process stability in broiler meat treated by UV-C. *Plos One*. 2018;13(12).
4. Yahaya WAW, Abu Yazid N, Azman NAM, Almajano MP. Antioxidant Activities and Total Phenolic Content of Malaysian Herbs as Components of Active Packaging Film in Beef Patties. *Antioxidants*. 2019;8(7).
5. Zadeh EM, O'Keefe SF, Kim YT. Lignin-Based Biopolymeric Active Packaging System for Oil Products. *Journal of Food Science*. 2019;84(6):1420-6.
6. Nikoo M, Benjakul S, Xu XM. Antioxidant and cryoprotective effects of Amur sturgeon skin gelatin hydrolysate in unwashed fish mince. *Food Chemistry*. 2015;181:295-303.
7. Gomez-Estaca J, Lopez-de-Dicastillo C, Hernandez-Munoz P, Catala R, Gavara R. Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*. 2014;35(1):42-51.
8. Jongberg S, Wen J, Tørngren MA, Lund MN. Effect of high-oxygen atmosphere packaging on oxidative stability and sensory quality of two chicken muscles during chill storage. *Food Packaging and Shelf Life*. 2014;1(1):38-48.
9. de Abreu DAP, Losada PP, Maroto J, Cruz JM. Lipid damage during frozen storage of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in active packaging film containing antioxidants. *Food Chemistry*. 2011;126(1):315-20.
10. Lund MN, Hviid MS, Skibsted LH. The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. *Meat Science*. 2007;76(2):226-33.
11. Lund MN, Heinonen M, Baron CP, Estevez M. Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2011;55(1):83-95.
12. Jongberg S, Skov SH, Torngren MA, Skibsted LH, Lund MN. Effect of white grape extract and modified atmosphere packaging on lipid and protein oxidation in chill stored beef patties. *Food Chemistry*. 2011;128(2):276-83.

13. He YF, Huang H, Li LH, Yang XQ, Hao SX, Chen SJ, et al. The effects of modified atmosphere packaging and enzyme inhibitors on protein oxidation of tilapia muscle during iced storage. *Lwt-Food Science and Technology*. 2018;87:186-93.
14. Jamshidian M, Tehrany EA, Desobry S. Antioxidants Release from Solvent-Cast PLA Film: Investigation of PLA Antioxidant-Active Packaging. *Food and Bioprocess Technology*. 2013;6(6):1450-63.
15. Radha Krishnan K, Babuskin S, Rakhavan KR, Tharavin R, Azhagu Saravana Babu P, Sivarajan M, et al. Potential application of corn starch edible films with spice essential oils for the shelf life extension of red meat. *J Appl Microbiol*. 2015;119(6):1613-23.
16. Barbosa-Pereira L, Manuel Cruz J, Sendon R, Rodriguez Bernaldo de Quiros A, Ares A, Castro-Lopez M, et al. Development of antioxidant active films containing tocopherols to extend the shelf life of fish. *Food Control*. 2013;31(1):236-43.
17. Barbosa-Pereira L, Aurrekoetxea GP, Angulo I, Paseiro-Losada P, Cruz JM. Development of new active packaging films coated with natural phenolic compounds to improve the oxidative stability of beef. *Meat Science*. 2014;97(2):249-54.
18. Maciel EDS. Perspectiva do consumidor perante produto proveniente da cadeia produtiva de tilápia do Nilo rastreada (*Oreochromis niloticus*) – consumo de pescado e qualidade de vida. Piracicaba: Universidade de São Paulo; 2011.
19. Alves AM, Dias T, Hassimotto NMA, Naves MMV. Ascorbic acid and phenolic contents, antioxidant capacity and flavonoids composition of Brazilian Savannah native fruits. *Food Science and Technology*. 2017;37(4):564-9.
20. Silveira MFA, Soares NFF, Geraldine RM, Andrade NJ, Botrel DA, Goncalves MPJ. Active film incorporated with sorbic acid on pastry dough conservation. *Food Control*. 2007;18(9):1063-7.
21. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº64 de 16 de setembro de 2008. Regulamento Técnico sobre Atribuição de aditivos e seus limites máximos para alimentos. [acesso em 15 março de 2017] Disponível em www.anvisa.gov.br.
22. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists.; 2012.
23. Bligh EG, Dyer WJ. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1959;37(8):911-7.
24. Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. Age-related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262(12):5488-91.
25. Vuorela S, Salminen H, Mäkelä M, Kivikari R, Karonen M, Heinonen M. Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53(22):8492-7.
26. Ellman GL. Tissue Sulfhydryl Groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1959;82(1):70-7.

27. Eymard S, Baron CP, Jacobsen C. Oxidation of lipid and protein in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) mince and washed minces during processing and storage. *Food Chemistry*. 2009;114(1):57-65.
28. Vyncke W. Direct Determination of the Thiobarbituric Acid Value in Trichloroacetic Acid Extracts of Fish as a Measure of Oxidative Rancidity. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 1970;72(12):1084-7.
29. Standardization I-IOf. ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Suíça: ISO; 2002. p. 1-34.
30. S Standardization I-IOf. ISO 6888-1:1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. Suíça: ISO; 1999. p. 1-16.
31. Zhao X, Zhou YG, Zhao L, Chen L, He Y, Yang HS. Vacuum impregnation of fish gelatin combined with grape seed extract inhibits protein oxidation and degradation of chilled tilapia fillets. *Food Chemistry*. 2019;294:316-25.
32. Lorenzo JM, Batlle R, Gomez M. Extension of the shelf-life of foal meat with two antioxidant active packaging systems. *Lwt-Food Science and Technology*. 2014;59(1):181-8.
33. Demirhan B, Candogan K. Active packaging of chicken meats with modified atmosphere including oxygen scavengers. *Poultry Science*. 2017;96(5):1394-401.
34. Davies DIPaMJ. Reactions of Myeloperoxidase-Derived Oxidants with Biological Substrates: Gaining Chemical Insight into Human Inflammatory Diseases. *Current Medicinal Chemistry*. 2006;13(27):3271-90.
35. Camo J, Beltran JA, Roncales P. Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. *Meat Science*. 2008;80(4):1086-91.
36. Camo J, Lores A, Djenane D, Beltran JA, Roncales P. Display life of beef packaged with an antioxidant active film as a function of the concentration of oregano extract. *Meat Science*. 2011;88(1):174-8.
37. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, [acesso em 18 abril de 2017] Disponível em www.anvisa.gov.br.
38. Machado de Melo AA, Geraldine RM, Araujo Silveira MF, Lopes Torres MC, Minafra e Rezende CS, Fernandes TH, et al. Microbiological Quality and other Characteristics of Refrigerated Chicken Meat in Contact with Cellulose Acetate-Based Film Incorporated with Rosemary Essential Oil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012;43(4):1419-27.

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas últimas décadas houve um crescente número de pesquisas sobre a substituição de compostos sintéticos antioxidantes e/ou antimicrobianos, por extratos naturais de plantas e frutas. Concomitante a estes estudos, também cresceram as pesquisas com embalagens ativas com a finalidade de aumentar a vida útil de vários alimentos considerados altamente perecíveis. Dentre estes alimentos, destacam-se os pescados, as carnes frescas de frango, suíno e bovino, em razão de seu alto valor comercial e curta vida útil. Desse modo, a presente pesquisa contribui com a área de ciência animal, haja vista que os filmes produzidos com extratos naturais foram utilizados para manter a qualidade de pescados frescos por um maior período de tempo.

Foram analisados os teores fenólicos e o poder antioxidante dos extratos produzidos de açafraão, cajazinho, araticum e casca de pequi. O extrato de casca de pequi, incorporado ao filme de acetato de celulose, mostrou-se superior aos outros extratos produzidos.

Os filmes ativos do presente estudo foram produzidos com a incorporação de um extrato natural comercial de chá verde/alecrim, com extrato de casca de pequi e com BHA. Apesar dos filmes com extratos naturais possuírem forças de resistência menores que os filmes com BHA e controle, seus resultados foram satisfatórios.

Os filmes de casca de pequi mostraram ser altamente porosos e consequentemente com alta permeabilidade. Entretanto, isso não se torna uma desvantagem, uma vez que esses filmes envolveram o alimento e posteriormente ainda foram envoltos por uma embalagem secundária (polietileno).

Os filmes com incorporação de casca de pequi mostraram-se eficientes no controle dos processos oxidativos durante o armazenamento de filés de tilápia refrigerada. Estes filmes conseguiram manter por até dez dias a oxidação em níveis satisfatórios, e também mantiveram a qualidade microbiológica.

Além de demonstrar alta eficiência antioxidante, a utilização da casca de pequi é extremamente vantajosa como uma via de sustentabilidade, uma vez que na região centro-oeste o elevado consumo do fruto pequi, gera uma alta quantidade de resíduo (casca).

Dessa forma, o uso da casca para a produção de extrato seria de baixo custo e apresentaria inúmeras possibilidades de uso para a exploração do seu potencial antioxidante, como por exemplo, em filmes ativos.

Por fim, sugerem-se pesquisas com o uso do extrato da casca de pequi em filmes ativos não apenas para a conservação de pescados, como também para outros produtos perecíveis. No mesmo sentido, o uso deste extrato não deve se limitar somente às embalagens, mas também utilizá-lo como ingrediente na fabricação de produtos alimentícios, como fonte de antioxidantes.

ANEXO A. - Padrões de compostos fenólicos analisados por Espectro ESI-MS

Número do Pico	Nome do Composto	Tempo de Retenção (min)	Fórmula molecular	Massa Detectada	Massa Calculada	Erro (ppm)
1	Ác. gálico	11,64	C ₇ H ₆ O ₅	169,01331	169,01370	1,244
2	Ác. protocatequico	16,28	C ₇ H ₆ O ₄	153,01833	153,01879	0,816
3	Ác. gentísico	19,88	C ₇ H ₆ O ₄	153,01836	153,01879	0,620
4	Ác. elágico	24,58	C ₁₄ H ₆ O ₈	300,99908	300,99845	3,942
5	Luteolina	26,23	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,04056	285,03992	4,194
6	Kaempferol	26,81	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,04051	285,03992	4,019

ANEXO B. Espectro ESI-MS do extrato metanólico da casca de pequi (P) em comparação com padrão (C). Fenólicos apresentados por: 1-ácido gálico; 2- ácido protocatequico; 3- ácido gentísico; 4- ácido elágico, 5-luteolina e 6- kaempferol.

