



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

EFEITO DA ADIÇÃO DE NANOESTRUTURAS, ÓLEOS ESSENCIAIS E QUITOSANA
NO DESENVOLVIMENTO DE FILMES E COBERTURAS BIODEGRADÁVEIS COM
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E ANTIMICROBIANAS

CARLOS HENRIQUE PAGNO

Porto Alegre

2016

CARLOS HENRIQUE PAGNO

EFEITO DA ADIÇÃO DE NANOESTRUTURAS, ÓLEOS ESSENCIAIS E QUITOSANA
NO DESENVOLVIMENTO DE FILMES E COBERTURAS BIODEGRADÁVEIS COM
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E ANTIMICROBIANAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, como requisitos para
a obtenção do grau de Doutor em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

Orientadores

Prof. Dr^a. Simone Hickmann Flores

Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Pagno, Carlos Henrique
Efeito da Adição de Nanoestruturas, Óleos
Essenciais e Quitosana no Desenvolvimento de Filmes
e Coberturas Biodegradáveis com Propriedades
Antioxidantes e Antimicrobianas / Carlos Henrique
Pagno. -- 2016.
177 f.

Orientadora: Simone Hickmann Flôres.
Coorientadora: Alessandro de Oliveira Rios.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de
Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. filmes biodegradáveis. 2. embalagens ativas.
3. coberturas comestíveis. I. Flôres, Simone Hickmann,
orient. II. Rios, Alessandro de Oliveira, coorient.
III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Autor: Carlos Henrique Pagno

Título da dissertação: Efeito da Adição de Nanoestruturas, Óleos Essenciais e Quitosana no Desenvolvimento de Filmes e Coberturas Biodegradáveis com Propriedades Antioxidantes e Antimicrobianas

Submetida como parte dos requisitos para a obtenção do grau de
DOUTOR EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em:/...../.....
Pela banca examinadora:

Homologada em:/...../.....
Por:

Prof^a. Dra. Simone Hickmann Flôres
Orientadora
Docente do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos
PPGCTA/UFRGS

Prof^a. Dra. Rosane Rech
Coordenadora do PPGCTA

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Diretor do ICTA

Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios
Coorientador
Docente do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos
PPGCTA/UFRGS

Banca: Prof^a. Dra. Florência Cladera
Oliveira
Doutora em Engenharia Química
PPGCTA/UFRGS

Banca: Prof^a. Dra. Ligia D. F. Marczak
Doutora em Engenharia Mecânica
PPGEQ/UFRGS

Banca: Prof. Dr. Carlos Prentice
Doutor em Engenharia de Alimentos -
Professor da Universidade Federal do Rio
Grande, Escola de Química e Alimentos.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer e acima de tudo dedicar essa tese em primeiro lugar à minha família, ao meu irmão, meu padrasto, aos meus padrinhos e principalmente à minha mãe Nerlei, pela dedicação e cuidados ao longo dos anos, por ser um exemplo de pessoa e por apoiar todas as minhas decisões na busca dos meus sonhos, eu sei que cada conquista minha é dela também.

A minha orientada Simone Flôres, por me aguentar todos esses anos, desde o mestrado e todo o doutorado, por ter confiado em mim e por sempre estar disponível, incentivando e apoiando em todos os momentos. Levo comigo um enorme aprendizado!

Ao meu coorientador Alessandro Rios, pelo auxílio e apoio no desenvolvimento de todo esse trabalho, e os conhecimentos compartilhados.

À querida Prof^a Erna (*in memorium*), sei que ficaria muito feliz com essa conquista, e estará sempre na minha memória.

Aos queridos amigos e colegas do Laboratório 211 do ICTA, que juntos dividimos angustias e alegrias, fazendo do Lab. 211 um segundo lar.

Aos grandes amigos, que estiveram e estão ao meu lado, compartilhando alegrias e ajudando a levar uma vida mais leve, longe de uma possível loucura, em especialmente ao Rafael T.R por todo apoio e dedicação.

Aos amigos que fiz na Itália, Willian, Tai, Nick, Mateus, Brenda, que se tornaram pessoas extremamente importantes... Que venham muitas viagens pela frente!

À universidade de Pisa na Itália por me abrir as portas, a professora Annamaria Ranieri por me receber em seu laboratório, e aos amigos italianos Antonella, Marco, Luigi, Annalisa, Claudia, Anna Maria, Elia e Giacomo por terem tornado meus meses na Itália os melhores.

“Io vorrei ringraziare all'università di Pisa, la professoressa Annamaria Ranieri e i miei amici italiani Antonella, Marco, Luigi, Annalisa, Claudia, Anna Maria, Elia e Giacomo per fare i miei mesi in Italia il meglio”

À UFRGS e ao ICTA.

À banca examinadora, pela disponibilidade e contribuição para esse trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

RESUMO

A principal função das embalagens tradicionais utilizadas pela indústria de alimentos é a proteção dos alimentos de contaminações externas sem interagir com o mesmo. No entanto, a maioria dessas embalagens é produzida a partir de fontes não biodegradáveis e não renováveis. Para atender à crescente demanda em relação à sustentabilidade ambiental, os filmes e coberturas comestíveis têm despertado o interesse e atenção por parte de indústrias e pesquisadores. Além disso, tais filmes ou coberturas podem ser acrescidos de diferentes compostos, para conferir as mesmas um caráter ativo, com interação positiva com os alimentos, para auxiliar a conservação. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo (1) desenvolver filmes ativos pela técnica de *casting* a partir de matrizes biodegradáveis, com atividade antimicrobiana devido a incorporação de nanopartículas de ouro (AuNPs) e óleos essenciais, além de filmes com atividade antioxidante pela adição de nanocápsulas de bixina, (2) avaliar as características mecânicas, físicas e de barreira dos filmes ativos, além da atividade antimicrobiana e antioxidante, e (3) verificar a eficiência na aplicação de coberturas comestíveis na conservação de alimentos. Os filmes com atividade antimicrobiana utilizaram como matérias primas o amido e a farinha integral de grãos quinoa (*Chenopodium quinoa* W.). Os filmes de amido de quinoa foram preparados com 4 % de matéria prima e 1 % de glicerol como plastificante e incorporados com solução de nanopartículas de ouro nas concentrações de 2,5 % e 5 % (v/v). A presença de AuNPs levou a uma melhoria nas propriedades mecânicas, ópticas e morfológicas dos filmes, sem alterar as propriedades térmicas e de barreira, além de exibirem forte atividade antibacteriana contra agentes patogênicos de origem alimentar, com porcentagens de inibição de 98 % contra *E. coli* e *S. aureus*. Nos filmes ativos elaborados com a farinha de quinoa (6 % de matéria prima e 1 % de glicerol como plastificante em 100 g de solução filmogênica), foram adicionados os óleos essenciais (OE) de orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) (0,5 %, 1 % e 2 % p/p). Observou-se que o tipo de OE não interferiu significativamente nos parâmetros físicos e de barreira dos filmes. Já o aumento na concentração dos OEs, produziu filmes mais elásticos e menos resistentes, bem como, menos solúveis em água e com menor permeabilidade aos vapores de água. Os filmes com 1 % e 2 % de OEs exibiram um efeito inibidor sobre o crescimento de *S. aureus* e *E. coli*. No entanto, o *S. aureus* mostrou-se mais sensível a ambos os OEs; e os filmes com orégano foram mais eficazes na inativação de ambos os microrganismos. As embalagens antioxidantes foram elaboradas a partir de amido de mandioca (4 % de matéria prima e 1 % de glicerol como plastificante em 100 g de solução

filmogênica) incorporadas com solução de nanocápsulas de bixina (0 %, 2 %, 5%, 8 % e 10 %). Os filmes foram caracterizados em relação as suas propriedades de barreira, mecânicas e físicas e a atividade antioxidante foi avaliada pelo efeito protetor do óleo de girassol exposto a condições de oxidação aceleradas (13 dias a 65 % UR / 35 °C). Embalagens com maiores concentrações de nanocápsulas demonstraram maior resistência e elasticidade, bem como, uma melhora significativa na proteção contra os raios UV e luz visível. O óleo de girassol embalado nos filmes contendo nanocápsulas de bixina apresentaram índices de peróxidos abaixo dos estipulados pelo *Codex Alimentarius* ($<10 \text{ meq. O}_2 \text{ kg}^{-1}$) para óleos frescos para o período de armazenamento testado. A cobertura comestível foi preparada à base de quitosana (1,5 %) e foi aplicada sobre tomates armazenados por 14 dias (20 ° C), com acompanhamento da perda de peso, sólidos solúveis totais (SST), firmeza e acidez titulável (AT), taxa de respiração, produção de etileno e quantificação de carotenoides e compostos fenólicos por CLAE. Os frutos revestidos demonstraram retardo no processo de amadurecimento com a diminuição da taxa respiratória e produção de etileno, bem como menores perdas de peso, firmeza e atraso no acúmulo de compostos bioativos como licopeno e β -caroteno e menor degradação de compostos fenólicos durante o armazenamento, em comparação com frutos controle (não revestidos). Os resultados sugerem que o desenvolvimento de filmes ativos para conservação de alimentos é um campo promissor, pois além do forte apelo ambiental, filmes ativos podem auxiliar na conservação dos alimentos, para retardar a proliferação de microrganismos patogênicos e degradações oxidativas. Em relação a aplicações de coberturas comestíveis, os resultados indicaram ter potencial para uma utilização comercial no auxílio de prolongamento da vida útil de tomates.

Palavras chave: filmes biodegradáveis, embalagens ativas; antioxidante; antimicrobianas, coberturas comestíveis.

ABSTRACT

The principal function of traditional packaging used by the food industry is the protection of food against external contamination without interacting with it. However, most of these packages are produced from non-biodegradable and non-renewable sources. Films and edible coatings have attracted the interest and attention from industries and researchers due increasing demand on environmental sustainability. In addition, this films and coatings can be added with different compounds to confer an active character, with positive food interaction and increased of preservation. This study aimed to (1) to develop active films by casting technique from biodegradable matrices with antimicrobial activity, incorporated of gold nanoparticles (AuNPs) and essential oils, as well as films with antioxidant activity by addition of nanocapsules of bixin, (2) evaluate the mechanical, physical and barrier characteristics of active films, and capacity antimicrobial and antioxidant, and (3) verify the efficiency in the application of edible coatings in food preservation. The active antimicrobial films it was used as raw material starch and flour quinoa (*Chenopodium quinoa*, W.). Starch quinoa films were prepared with 4 % raw material and 1% glycerol as plasticizer (100 g filmogenic solution), incorporating gold nanoparticles at concentrations of 2.5% and 5% (v / v). The presence of gold nanoparticles produces improvement in the mechanical, optical and morphological properties, maintaining the thermal and barrier properties unchanged when compared to the standard biofilm. The active biofilms exhibited strong antibacterial activity against food-borne pathogens with inhibition percentages of 99 % against *E. coli* and 98 % against *S. aureus*. The active films produced with flour quinoa (6% of raw material and 1% glycerol as a plasticizer in 100 g of filmogenic solution), incorporated with oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils (EO) (0.5%, 1% and 2% p/p). It was observed that the kind of EO was not significant for the physical and barrier parameters of the films, however, the increase in the EOs concentration promote increase in the elongation but decrease in the tensile strength, solubility and water vapor permeability. Films containing 1% and 2 % EOs, inhibit the growth of *S. aureus* and *E. coli*. However, *S. aureus* was more sensitive to both EOs and the oregano oil was more efficient in the inactivation to both microorganisms. The antioxidant packages were prepared from cassava starch (4% raw material and 1% glycerol as plasticizer in 100 g of filmogenic solution), incorporated with solution of different concentrations of bixin nanocapsules (0 %, 2 %, 5%, 8 % e 10 %). Films with higher concentrations of bixin nanocapsules exhibited significant reduction tensile strength and increases in elongation at break, well as, improvement in

protection against UV and visible light and decreased water solubility and increased water vapor permeability. The sunflower oil packed in films containing nanocapsules bixin exhibited lower oxidation rates, thus maintaining its freshness according to *Codex Alimentarius* guidelines (< 10 milliequivalent.kg⁻¹), for the storage time tested (13 days / 65 % RH / 35 °C). The edible coating was prepared based on chitosan (1.5 %), and it was applied on tomatoes stored for 14 days (20 °C). The analyses carried out on tomato fruit were: weight loss, total soluble solid (TSS), firmness, and titratable acidity (TA), respiration rate, ethylene production and quantification of carotenoids and phenolics by HPLC. Coated fruit delayed the ripening process by decrease of the rate of respiration and ethylene production, as well changes of weight, firmness and TSS concentration and delay peak of lycopene and β -carotene accumulation and degradation of phenolic compounds during storage, compared to uncoated control. The results suggest that the development of active films for food preservation is a promising field, because besides the strong environmental appeal, active films can increase the food preservation, to decrease the proliferation of pathogenic microorganisms and oxidative degradation. Regarding the edible coatings applications, the results indicated that coating is a promising tool for commercial use in helping to prolong the storage of tomatoes

Key words: biodegradable films, active packaging, antioxidant; antimicrobial, edible coatings.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

- Figura 1** Obtenção de filmes pelo método de *casting*: (1) formulação de suspensão (solução filmogênica) de amido, (2) solução filmogênica depositada sobre um molde ou superfície, (3) resfriamento e secagem. (4) remoção do filme formado..... 29
- Figura 2** Aplicação de coberturas comestíveis pelo método de (A) imersão, (B) pulverização e (C) aplicação de filme pré-formado. 30
- Figura 3** Amilose: (a) Estrutura; (b) Conformação helicoidal 33
- Figura 4** Amilopectina: (a) Estrutura; (b) Formato de ramificações 33
- Figura 5** Sistemas de embalagem e o comportamento das substâncias antimicrobianas. (A) embalagem sem espaço interno livre – contato direto alimento/embalagem e (B) embalagem com espaço interno livre. 39
- Figura 6** Sistemas de embalagem: Composto, com ação antimicrobiana, imobilizado na superfície do filme. 40

CAPÍTULO 4 MATERIAIS E MÉTODOS

- Figura 7** Suspensão de farinha de quinoa em banho-maria para solubilização das proteínas e posterior gelatinização do amido 56
- Figura 8** Análise de espessura efetuada em micrômetro digital 57
- Figura 9** Análise de solubilidade dos filmes em água..... 58
- Figura 10** Texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems, Reino Unido)..... 59
- Figura 11** Células de permeação de alumínio (A) e cuba de vidro de vidro contendo solução saturada de NaCl (UR 75 %)..... 60
- Figura 12** Desenho do aparato montado para medir a permeabilidade de gás de filmes: (a) computador; (b) aquisição de dados; (c) termopares; (d) transdutor de pressão; (e) filme e suporte para o filme. (f) banho termostático; (g) bomba á vácuo; (h) compartimentos. 61
- Figura 13** Calorímetro (modelo CR-300, Minolta Co. Ltd, Japão) 62
- Figura 14** Espectrofotômetro (modelo UV-1800, Shimadzu, Japão) 63
- Figura 15** Analisador termogravimétrico 64
- Figura 16** Microscópio eletrônico de varredura (A) e *stubs* de alumínio com os filmes metalizados com ouro (B). 65
- Figura 17** Microscópio eletrônico de transmissão (JEM-1220, JEOL, Japão)..... 65
- Figura 18** Agitador rotativo de cilindros..... 67

Figura 19 Halo de inibição formado pelo filme com a superfície do ágar.....	68
Figura 20 Óleo de girassol embalado em filmes biodegradáveis	68
Figura 21 Elaboração da cobertura de quitosana.....	69
Figura 22 Secagem dos frutos de tomate após aplicação da cobertura de quitosana (A) e câmaras climatizadas (UR 85% a 20 °C) (B).	70
Figura 23 Titulador automático e pHmetro para acompanhar viragem de pH (A) e processo de titulação (B)	72
Figura 24 Frutos colocados em jarros herméticos para avaliação da evolução de gás carbônico e etileno	73
Figura 25 HPLC com detector de arranjo de diodos UV 6000 LP e coluna CL-18 RP	75

CAPÍTULO 5 ARTIGOS CIENTÍFICOS

ARTIGO 1 Development of Active Biofilms of Quinoa (*Chenopodium quinoa* w.) Starch Containing Gold Nanoparticles and Evaluation of Antimicrobial Activity

Fig. 1. Scanning Electron Microscopy (SEM) images of the biofilms containing gold nanoparticles with concentrations of 5 % - AuNPs5 (a), 2.5 % - AuNPs2.5 (b) and standard biofilm (c).....

Fig. 2 Transmission Electron Microscopy (TEM) images of the biofilms containing gold nanoparticles with concentrations of 5 % - AuNPs5 (a) and 2.5 % - AuNPs2.5 (b).....

Fig. 3 Thermogravimetric Analysis (TGA) analyses of standad biofilms and and biofilms containing gold nanoparticles with concentrations of 2.5 % (AuNPs2.5) and 5 % (AuNPs5).....

Supplementary Material

Fig. 1 Pictures of the biofilms.....

Fig. 2 UV-Vis absorption spectra of standard biofilms and and biofilms containing gold nanoparticles with concentrations of 2.5 % (AuNPs2.5) and 5 % (AuNPs5)

Fig. 3 UV-Vis spectrum of gold nanoparticle dispersion

Fig. 4. TEM images of the gold nanoparticles dispersion with gold concentration of $18.5 \times 10^{-6} \text{ g m L}^{-1}$

Fig 5. SEM images of the blank biofilms that is films with stabilizer only, without gold nanoparticles.....

ARTIGO 2 Physical and Antimicrobial Properties of Quinoa Flour-Based Films Incorporated With Essential Oil

Fig. 1 Images of zones of inhibition of essential oils of rosemary (*rosmarinus officinalis*), cloves (*Eugenia caryophyllata*), sage (*Salvia officinalis*), oregano (*Origanum vulgare*. L) and thyme (*Thymus vulgaris* L) against *Staphylococcus aureus*.....109.

Fig. 2. Water vapor permeability (WVP) of the films of quinoa flour incorporated with essential oils (EOs).....112

Fig. 3 Scanning Electron Microscopy (SEM), images of film surface without essential oil (control) and with essential oil of oregano at concentration of 0.5% (OR 0.5%), 1% (OR 1%), 2% (OR 2%) and oil of thyme at concentration of 0.5 (Th0.5%), 1% (Th 1%), 2% (Th 2%). 116

Fig. 4 Thermogravimetric Analysis (TGA) analyses of control films and films containing essential oil of de oregano (1% and 2%) and thyme (1% and 2%). 117

ARTIGO 3 Synthesis of Biodegradable Films with Antioxidant Properties Based on Cassava Starch Containing Bixin Nanocapsules

Fig. 1 Scanning Electron Microscopy (SEM) images of the biofilms standard (A) and containing bixin nanocapsules with concentrations of 2 % (B), 5 % (C), 8 % (D) and 10 % (E) (samples B2%, B5%, B8%, B10%, respectively)135

Fig. 2 Thermogravimetric Analysis (TGA) analyses of standard biofilms and biofilms containing bixin nanocapsules with concentrations of 2 % (B2 %), 5 % (B5 %), 8 % (B8 %) and 10 % (B10 %).136

Fig. 3 Peroxide value (PV) of the sunflower oil protected by standard biofilms, biofilms containing bixin nanocapsules and of control samples without protection (without packaging - WP and closed package - CP).138

ARTIGO 4 Chitosan Edible Coating in Delaying Post-Harvest Ripening of Tomato Fruit

Fig. 1 Quality parameters: (A) Weight loss, calculated in comparison with the initial weight (B) Fruit firmness expressed in newtons (N), (C) titratable acidity expressed as percentage citric acid (%) and (D) total soluble solid (TSS) content expressed as percent of soluble solids (%), of control and chitosan-coated tomatoes during storage period. For each time, significant differences between chitosan-coated and control fruit are indicated by * ($P \leq 0.05$), ** ($P \leq 0.01$), *** ($P \leq 0.001$), according to one-way ANOVA followed by Tukey's test. 149

Fig. 2 (A) Ethylene and (B) CO₂ emission of control and chitosan-coated tomatoes during storage period. For each time, significant differences between chitosan-coated and control fruit are indicated by * ($P \leq 0.05$), ** ($P \leq 0.01$), *** ($P \leq 0.001$), according to one-way ANOVA followed by Tukey's test. 151

Fig. 3 Concentration of phytoene (A), phytofluene (B), lycopene (C), b-carotene (D) and lutein (E), expressed as g kg⁻¹ dry weight (d.w), of control tomatoes and chitosan-coated tomatoes, during storage peroxide. Data represent the mean of 3 replicates \pm DS. For each time, significant differences between chitosan-coated and control fruit are indicated by * ($P \leq 0.05$), ** ($P \leq 0.01$), *** ($P \leq 0.001$), according to one-way ANOVA followed by Tukey's test.....153

Fig. 4 Concentration of (A) chlorogenic acid, (B) caffeic acid, (C) ferulic acid, (D) rutin, (E) quercetin and (F) kaempferol, expressed as g kg⁻¹ dry weight (d.w), of control tomatoes and chitosan-coated tomatoes, during storage peroxide. Data represent the mean of 3 replicates \pm DS. For each time, significant differences between chitosan-coated and control fruit are indicated by * ($P \leq 0.05$), ** ($P \leq 0.01$), *** ($P \leq 0.001$), according to one-way ANOVA followed by Tukey's test.....155

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 5: ARTIGOS CIENTÍFICOS

ARTIGO 1 Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* w.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity

Table 1 Thickness, tensile strength (TS), elongation at break (E), water vapour permeability (WVP), and solubility of standard biofilm, control biofilms, and biofilms containing gold nanoparticles.....87

Table 2 Optical properties of color and opacity of standard biofilms, control biofilms, and biofilms containing gold nanoparticles.....90

Table 3 Antimicrobial activity of biofilms containing gold nanoparticles and control biofilms against *E. coli* and *S. aureus*. The antimicrobial activity is represented by the percent growth inhibition.....95

ARTIGO 2 Physical and Antimicrobial Properties of Quinoa Flour-Based Films Incorporated with Essential Oil

Table 1 Properties mechanical of tensile strength (TS), elongation at break (EB) and modulo de Young (YM), of films prepared quinoa flour with and without essential oils (Eos)110

Table 2 Moisture content (MC) and solubility (S) of the films of quinoa flour incorporated with essential oils (EOs)111

Table 3 Color parameters of films of quinoa flour incorporated with essential oils.....113

Table 4 Opacity ($A \text{ mm}^{-1}$) of quinoa flour films and films containing essential oils at different wavelengths (nm)114

Table 5 Zone of inhibition of edible films prepared with quinoa flour and films containing essential oils against *E. coli* (ATCC 25972) and *S. aureus* (ATCC 1901).....119

ARTIGO 3 Synthesis of biodegradable films with antioxidant properties based on cassava starch containing bixin nanocapsules

Table 1 Thickness, Tensile strength (TS) and elongation at break (E) of standard films and films containing bixin nanocapsules.....131

Table 2 Water vapor permeability (WVP) and solubility of standard films and films containing bixin nanocapsules132

Table 3 Optical properties of color and opacity of standard biofilms and biofilms with the addition of bixin nanocapsules133

CAPÍTULO 6 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Tabela 1 Resumo da caracterização e propriedades dos filmes biodegradáveis.....	163
----------------------------------------------------------------------------------------	-----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
CAPITULO 3 FUNDAMENTAÇÃO TEORICA.....	25
3 FUNDAMENTAÇÃO TEORICA	26
3.1 EMBALAGENS	26
3.2 FILMES E COBERTURAS BIODEGRADÁVEIS	27
3.3 COMPOSIÇÃO DOS FILMES E COBERTURAS.....	32
3.3.1 Amidos.....	32
3.3.2 Quitosana	35
3.3.3 Blendas.....	35
3.4 FILMES ATIVOS	37
3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	44
3.5.1 Propriedades Mecânicas	44
3.5.2 Propriedades de Barreira.....	46
3.5.3 Propriedades Ópticas	48
3.5.4 Propriedades Estruturais	49
3.5.5 Estabilidade Térmica	49
CAPITULO 4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS.....	52
4.1.1 Nanopartículas de Ouro (AuNPs).....	52
4.1.2 Nanocápsulas de Bixina.....	52
4.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMIDO E FARINHA DE QUINOA...53	
4.2.1 Obtenção do Amido de Quinoa.....	53
4.2.2 Obtenção da Farinha de Quinoa	54
4.2.3 Caracterização do Amido e Farinha de Quinoa	54
4.3 ELABORAÇÃO DOS FILMES	55
4.3.1 Filmes de Amido Quinoa contendo nanopartículas de ouro.....	55

4.3.2 Filmes de Farinha de Quinoa Contendo Óleos Essências.....	55
4.3.3 Filmes de Amido com Nanocápsulas de Bixina.....	56
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	57
4.4.1 Espessura.....	57
4.4.2 Umidade	57
4.4.3. Solubilidade.....	57
4.4.4 Propriedades Mecânicas	58
4.4.5 Permeabilidade ao vapor de água.....	59
4.4.6 Permeabilidade a Gás	60
4.4.7 Propriedades Ópticas	62
4.4.8 Estabilidade Térmica	63
4.4.9 Propriedade Estrutural	64
4.4.10 Atividade Antimicrobiana.....	66
4.4.11 Atividade Antioxidante.....	68
4.5 ELABORAÇÃO E APLICAÇÃO DAS COBERTURAS	69
4.5.1 Cobertura de Quitosana	69
4.5.2 Aplicação da cobertura de quitosana	69
4.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DAS FRUTAS	71
4.6.1 Perda de Peso	71
4.6.2 Textura.....	71
4.6.3 Sólidos Solúveis Totais.....	71
4.6.4 Acidez Total Titulável	71
4.6.5 Emissão de Etileno e Taxa Respiratória (CO ₂).....	72
4.6.6 Extração e Quantificação de Flavonoides por HPLC.....	73
4.6.7 Extração e Quantificação de Carotenoides	74
4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	75
CAPITULO 5 ARTIGOS CIENTÍFICOS	76
ARTIGO 1 Development of active biofilms of quinoa (<i>chenopodium quinoa</i> w.)	
starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity	78
Abstract	78
1. Introduction.....	78
2. Materials and Methods	80
2.1 Quinoa Starch Production.....	80

2.2 Proximate Analysis of the Quinoa Starch.....	80
2.3 Obtaining a Gold Nanoparticle Dispersion.....	81
2.4 Preparation of Starch Quinoa Biofilms	81
2.5 Characterization of Quinoa Starch Biofilms.....	82
2.5.1 Mechanical properties.....	82
2.5.2 Water vapor permeability (WVP)	82
2.5.3 Solubility.....	83
2.5.4 Optical properties (color and opacity)	83
2.5.5 Gas permeability.....	83
2.5.6 Scanning electron microscopy (SEM)	84
2.5.7 Transmission electron microscopy (TEM)	84
2.5.8 Thermogravimetric analysis.....	85
2.6 Antimicrobial Activity.....	85
2.7 Statistical Analysis	86
3. Results and Discussion	86
3.1 Composition of Quinoa Starch.....	86
3.2 AuNPs Aqueous Dispersion	86
3.3 Biofilm Characterization	87
3.3.1. Mechanical properties.....	87
3.3.2 Water vapor permeability (WVP)	88
3.3.3 Solubility.....	89
3.3.4 Optical properties (color and opacity)	90
3.3.5 Gas permeability.....	91
3.3.6 Morphological properties.....	92
3.3.7 Thermal stability.....	93
3.4 Antimicrobial Activity.....	94
4. Conclusions.....	95
SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	96
References	98
ARTIGO 2 Physical and Antimicrobial Properties of Quinoa Flour-Based Films	
Incorporated with Essential Oil	102
Abstract	102
INTRODUCTION.....	102

MATERIALS AND METHODS	104
Materials.....	104
Quinoa Flour Production and Proximate Composition.....	104
Selection of Essential Oils	104
Film Preparation	105
Film Characterization	105
<i>Mechanical properties.....</i>	105
<i>Water Solubility.....</i>	106
<i>Water vapor permeability (WVP)</i>	106
<i>Optical Properties (color and opacity)</i>	106
<i>Morphological Properties</i>	107
<i>Thermal Stability.....</i>	107
Antimicrobial Activity	107
Statistical Analysis	108
RESULTS AND DISCUSSION	108
Proximate Analysis of Quinoa Flour	108
Selection of Essential Oils	108
Mechanical Properties	109
Water Solubility and Water Vapor Permeability (WVP).....	111
Optical Properties (color and opacity)	113
Morphological Properties	115
Thermal Stability	117
Antimicrobial Activity	117
CONCLUSIONS	120
REFERENCES	120
ARTIGO 3 Synthesis of biodegradable films with antioxidant properties based on cassava starch containing bixin nanocapsules	124
Abstract	124
Introduction	124
Materials and Methods	126
Materials.....	126
Obtaining Bixin Nanocapsules	126
Preparation of Films.....	127

Characterization of Films	127
<i>Mechanical properties</i>	127
<i>Water vapor permeability (WVP)</i>	127
<i>Water solubility</i>	128
<i>Optical properties (color, opacity)</i>	128
<i>Morphological properties</i>	129
<i>Thermal stability</i>	129
Testing Acceleration of Antioxidant Effect of Films.....	129
Statistical Analysis	130
Results and Discussion	130
Water Vapor Permeability (WVP) and water Solubility.....	131
Optical Properties (color, opacity)	133
Morphological Properties	134
Thermal Stability	135
Acceleration of Oxidative Rancidity in Sunflower Oil.....	136
Conclusion	138
References	139

ARTIGO 4 Chitosan edible coating in delaying post-harvest ripening of tomato fruit.....	143
Abstract	143
1 Introduction	143
2 Materials and Methods	145
2.1 Tomato Fruit, Chitosan Treatment, and Storage Condition	145
2.2 Determination of Fruit Quality Parameters	145
2.3 Respiration Rate and Ethylene Production	145
2.4 Extraction and Quantification of Carotenoids	146
2.5 HPLC Analysis of Phenolics and Flavonoids.....	146
2.6 Statistical Analysis	147
3 Results and Discussion	147
3.1 Determination of Fruit Quality Parameters	147
3.2 Respiration Rate and Ethylene Production	150
3.3 Carotenoids	151
3.4 HPLC analysis of phenolics and flavonoids	153

4 Conclusions.....	156
References	156
CAPITULO 6 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	161
DISCUSSÃO GERAL.....	162
CONCLUSÃO.....	169
REFERENCIAS.....	170

1 INTRODUÇÃO

A embalagem é uma das etapas mais importantes no processo de fabricação de alimentos, uma vez que mantém a qualidade do produto durante o armazenamento, transporte e utilização final, e impede a deterioração dos alimentos devido às influências fisiológicas e ambientais. No entanto, a maioria das embalagens tradicionais utilizadas pelas indústrias de alimentos é produzida a partir de resinas derivadas de fontes fósseis, ou seja, não renováveis. Os plásticos provenientes de fonte não renovável, como petróleo, por ser um material hidrofóbico, não sofrem a ação microbiana, e levam centenas de anos para se decompor.

A indústria de alimentos é o usuário majoritário de embalagens. Assim, mesmo uma pequena redução da quantidade de materiais utilizados para cada embalagem resultaria numa significativa redução de custos e poderia melhorar os problemas de resíduos sólidos gerados. Para atender a crescente demanda em relação à sustentabilidade e segurança ambiental, investigações têm sido direcionadas para o desenvolvimento de novos materiais para produção de embalagens que possam degradar-se, rapidamente, no ambiente.

Os biopolímeros são uma das alternativas mais favoráveis a serem explorados e utilizados como matéria prima para embalagens, devido à sua alta biodegradabilidade, que se decompõem facilmente, no ambiente, em subprodutos orgânicos, tais como o dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O).

Levando em consideração a importância da tecnologia de embalagens na qualidade dos alimentos e as preocupações ambientais, novas pesquisas são focadas na criação de novos sistemas de embalagem, tais como as embalagens biodegradáveis produzidas a partir de biopolímeros, também, chamadas de biofilmes. Biofilme é o termo dado aos filmes ou coberturas que são formados a partir de macromoléculas biodegradáveis. A cobertura é uma fina camada de material aplicado diretamente sobre o alimento e formado diretamente na superfície do produto, enquanto que o filme é pré-formado, separadamente, e aplicado posteriormente. Filmes e coberturas podem atuar como uma barreira contra trocas gasosas e umidade entre alimento e o ambiente ou proteção microbiana, prolongando a vida de prateleira de vários produtos alimentares.

Tradicionalmente, a matéria prima para produção de embalagens é selecionada com intuito de apresentar a mínima interação com o alimento, constituindo assim, barreiras inertes, com função de proteger o produto embalado. Entretanto, na última década, estudos têm desenvolvido sistemas de embalagens com o objetivo de interagir com o alimento, chamados de filmes ou coberturas ativos.

Muitos destes filmes ativos podem ser incorporados com diferentes compostos, tais como óleos essenciais ou nanoestruturas, e conferir a estes, propriedades específicas. Dentre estes, estão os filmes com ação antioxidante, que retardam ou diminuem o processo de oxidação de produto embalado ou aqueles com ação antimicrobiana, que retardam a proliferação de microrganismos patógenos e/ou deteriorantes. Apesar da utilização de nanotecnologia ser incipiente na área de alimentos, vários seguimentos demonstram seu potencial uso, desde a agricultura (pesticidas, fertilizantes ou vacinas utilizadas em animais) até o processamento de alimentos (encapsulação de realçadores de sabor ou odor, compostos bioativos e agentes de textura).

Inegavelmente, filmes e coberturas são sistemas promissores para a melhoria da qualidade, da vida de prateleira, segurança e funcionalidade dos alimentos. A área de embalagens tem sido a mais ativa no desenvolvimento de pesquisas que visem aplicação da nanociência, através do desenvolvimento de filmes ou coberturas que interajam com o alimento e possam tanto retardar o desenvolvimento de microrganismos patógenos ou deteriorantes como os processos oxidativos. Dessa forma, este trabalho teve por objetivos o desenvolvimento e aplicação de filmes e coberturas biodegradáveis com propriedades bioativas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento e caracterização de embalagens ativas com adição de compostos com ação antimicrobiana e antioxidante, a partir de matrizes biodegradáveis e aplicação de coberturas comestíveis a base de quitosana

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Desenvolvimento e caracterização de filmes ativos antimicrobianos de amido de quinoa (*Chenopodium quinoa*, W.) com adição de nanopartículas metálicas de ouro (AuNPs);
- 2 Desenvolvimento e caracterização de filmes ativos antimicrobianos a partir de farinha de quinoa com adição de óleos essenciais;
- 4 Desenvolvimento e caracterização de filmes ativos antioxidantes a partir de amido de mandioca com adição de nanopartículas de bixina;
- 6 Aplicação de coberturas de quitosana em tomates conservados sob refrigeração e avaliação dos parâmetros físico-químicos e bioquímicos.

CAPITULO 3
FUNDAMENTAÇÃO TEORICA

3 FUNDAMENTAÇÃO TEORICA

Este capítulo faz uma descrição geral sobre embalagens biodegradáveis utilizadas na conservação de alimentos, com definições, características e principais matérias primas utilizadas na sua elaboração, bem como técnicas de elaboração de filmes e coberturas e das principais análises de caracterização de filmes biodegradáveis.

3.1 EMBALAGENS

Historicamente, as embalagens foram desenvolvidas para proteger os alimentos da luz, calor, umidade, oxigênio, microrganismos, insetos e sujeira, garantindo a conservação e a distribuição segura dos produtos até o consumo (HAN, 2014a). As embalagens podem ser produzidas a partir de diferentes materiais, tais como: plásticos, papel, papelão, metal e vidro. No entanto, os plásticos derivados de petróleo são utilizados na grande maioria das embalagens, sejam como filmes individuais ou combinados com outros materiais (tais como o cartão de papel e metais) (ZHAO, TORLEY e HALLEY, 2008). Apesar de serem materiais resistentes e com bom desempenho, os plásticos convencionais são materiais bastante estáveis à degradação, o que faz com que sejam considerados, na atualidade, causadores, em parte, do grande acúmulo de lixo nos centros urbanos (NASCIMENTO, CALADO e CARVALHO, 2012).

A indústria de plásticos convencionais cresceu consideravelmente desde os anos 1950, quando iniciou o uso do petróleo bruto em grande escala para o desenvolvimento de polímeros sintéticos (ORTEGA-TORO, 2015). De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Plástico, em 2014 a produção mundial de resinas plásticas foi de aproximadamente 250 milhões de toneladas, já, a produção brasileira foi de 6,5 milhões de toneladas, o que representa 2,7% da produção mundial, a mais significativa da América Latina. A indústria de alimentos e bebidas são um dos setores que mais faz uso desse material, com consumo aproximado em 16% da produção total. Em relação ao consumo *per capita* do brasileiro, tem-se um valor de 35 kg/habitante, porém, bem abaixo dos índices observados em países desenvolvidos, que têm consumo próximo a 100 kg / habitante (ABIPLAST, 2014).

As alternativas encontradas para minimizar o efeito negativo dos resíduos gerados pelas embalagens deste tipo vão desde a reciclagem, até a substituição parcial ou total dos materiais sintéticos por materiais biodegradáveis. A área de pesquisa e desenvolvimento de materiais biodegradáveis tem sido bastante destacada, em especial o emprego de

biopolímeros, como o amido ou gelatinas para produção de embalagens (GARCÍA, MARTINO e ZARITZKY, 2000).

A obtenção de embalagens biodegradáveis a partir de recursos renováveis com propriedades termoplásticas pode diminuir o impacto ambiental causado pelo intenso uso de embalagens originadas de derivados de petróleo, como as embalagens de polietileno, polipropileno e poliestireno (LAROTONDA *et al.*, 2004). O amido, um biopolímero renovável é a matéria prima mais utilizada para a produção de embalagens biodegradáveis, uma vez que tem baixo custo, é, relativamente, fácil de manusear, totalmente, biodegradável e amplamente disponível na natureza (ARAUJO-FARRO *et al.*, 2010).

3.2 FILMES E COBERTURAS BIODEGRADÁVEIS

O desenvolvimento de tecnologia de biomateriais, aplicáveis aos vários setores industriais, na área de embalagens, tem uma atenção especial em relação à questão da preservação ambiental. Sabe-se que as embalagens plásticas garantem proteção aos diferentes produtos alimentícios, mas, também, são as maiores responsáveis pela poluição, devido ao acúmulo no meio ambiente. As alternativas encontradas para minimizar os efeitos negativos dos resíduos gerados pelas embalagens derivadas de petróleo vão desde a reciclagem, até a substituição parcial ou total dos materiais sintéticos por polímeros biodegradáveis (GARCIA, MARTINO e ZARITZKY, 2000).

Em termos de nomenclatura os polímeros biodegradáveis, são polímeros que sofrem biodegradação, ou seja, degradação causada por atividade biológica de ocorrência natural, não necessariamente, proveniente de fontes renováveis, já, o termo biopolímeros é utilizado para polímeros ou copolímeros produzidos a partir de matérias primas renováveis, como milho, cana-de-açúcar, celulose, quitina, e outras (ABNT, 2008).

Os biopolímeros são definidos como polímeros formados, naturalmente, durante o crescimento e desenvolvimento de organismos vivos; são formados no interior das células por complexos processos metabólicos; assim, têm a capacidade de serem degradados ou decompostos, com liberação de subprodutos orgânicos, tais como, dióxido de carbono, compostos inorgânicos e água. Dessa forma, os biopolímeros são considerados como uma matéria prima alternativa para o desenvolvimento de embalagens biodegradáveis ao plástico produzido a partir de petróleo (FAKHOURI *et al.*, 2013).

De acordo com sua origem biológica e tecnológica, os polímeros biodegradáveis podem ser classificados em quatro grupos: primeiro os naturais extraídos a partir da biomassa,

como amido e derivados de celulose; segundo os polímeros microbianos, formados a partir da fermentação de substratos de origem agrícola (poli-hidroxi-alcanoatos - PHA); terceiro os produtos biotecnológicos, formados por polímeros que envolvem a produção biotecnológica/fermentativa do monômero, porém, é necessário um processo de síntese ou polimerização convencional, como, por exemplo, o ácido poliláctico (PLA); e quarto são os produtos da indústria petroquímica, quimicamente sintetizados, convencionalmente, a partir de produtos de petróleo. Os primeiros três grupos são derivados a partir de recursos renováveis, enquanto o último grupo é derivado a partir do petróleo (WIHODO e MORARU, 2013; OTHMAN, 2014).

As embalagens produzidas a partir de biopolímeros, chamadas de biofilmes ou filmes biodegradáveis, são obtidas a partir de recursos renováveis, tais como, matérias-primas naturais (amido, celulose, e proteína); de síntese química de monômeros bioderivados (polilactato); ou polímeros produzidos, naturalmente, por microrganismos (polihidroxibutirato e polihidroxivalerato) (WIHODO e MORARU, 2013). O desenvolvimento e aplicações de biofilmes como embalagens biodegradáveis estão direcionadas às formulações de baixo custo, em especial, aquelas que utilizam matérias primas disponíveis de origem agropecuária como amidos e proteínas, além da combinação destes materiais (SAKANAKA, 2007).

As formulações de biofilmes são constituídas de macromoléculas dispersas em um solvente (água, etanol, etanol/água ou ácidos orgânicos) e podem ser adicionados alguns aditivos (plastificantes agentes de ligação, entre outros) para melhorar as características dos filmes. O princípio de obtenção baseia-se na dispersão de macromoléculas em um solvente ou mistura de solventes adequados, com a posterior adição de aditivos para reforçar as propriedades mecânicas ou protetoras, para obter uma solução filmogênica que será submetida a operações de secagem para a formação de uma rede tridimensional (MONTERREY e SOBRAL, 1999).

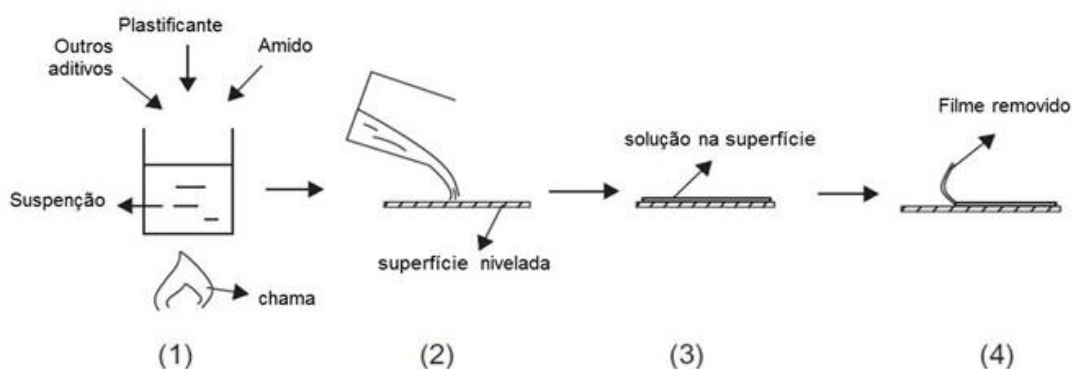
Os filmes obtidos a partir de polímeros de alto peso molecular são classificados em três categorias baseada na natureza de seus componentes: em hidrocolóides (polissacarídeos, proteínas), lipídeos (ácidos graxos, ceras) ou compósitos (combinação de substâncias a partir das duas categorias anteriores). As forças de coesão necessárias para formar matriz filmogênica dependem de estruturas poliméricas de cadeias longas dispersas em solventes adequados. Agentes de ligação cruzada, presença de aditivos e condições ambientais durante a formação do filme também, influenciam as forças de coesão (WOLF, 2007).

No que diz respeito, à nomenclatura, alguns pesquisadores usam os termos “filme” e “cobertura”, indiscriminadamente. No entanto, biofilme é o termo dado aos filmes ou

coberturas que são formados a partir de macromoléculas biodegradáveis. As coberturas são obtidas quando a solução filmogênica é aplicada, diretamente, nas superfícies dos alimentos, ao passo que os filmes são películas finas obtidas pela secagem da solução filmogênica sobre um suporte (PETERSSON e STADING, 2005). Um filme ou cobertura pode ser definido como embalagem primária feita a partir de componentes comestíveis. Uma fina camada de material comestível pode ser revestida, diretamente, sobre os alimentos ou formado em um filme e ser usado como um envoltório de alimentos sem alterar os ingredientes originais ou o método de processamento (GALUS e KADZIŃSKA, 2015). No entanto, para serem considerados comestíveis, os filmes devem ser reconhecidos como seguros para alimentação humana GRAS (*Generally Recognized as Safe*) e para tal, todos os seus componentes devem ser, individualmente, reconhecidos como GRAS (KROCHTA e DEMULDERJOHNSTON, 1997).

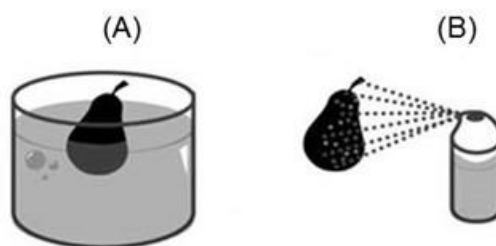
O método mais utilizado para a elaboração dos filmes é o de secagem por moldagem, denominado de *casting* (Figura 1) onde a solução filmogênica é depositada sobre um molde ou superfície não adesiva (acrílico, teflon, entre outros), levado à secagem, geralmente, em estufas ou secadores de bandejas e então se obtém um material similar ao plástico que pode ser utilizada como uma embalagem (ANDRADE-MAHECHA, TAPIA-BLACIDO e MENEGALLI, 2012). No entanto, esta técnica é, comumente, usada em laboratórios para estudar a gelatinização do amido, de plastificação, e propriedades termomecânicas da película, e não é prático para a produção em escala industrial. Para o fabrico em grande escala, um processo de extrusão pode ser utilizado (ZHANG, REMPEL e MCLAREN, 2014).

Figura 1 Obtenção de filmes pelo método de *casting*: (1) formulação de suspensão (solução filmogênica) de amido, (2) solução filmogênica depositada sobre um molde ou superfície, (3) resfriamento e secagem. (4) remoção do filme formado.



Coberturas, por sua vez, podem ser aplicadas por imersão (Figura 2A), quando o alimento é mergulhado em recipiente com a solução filmogênica ou pela pulverização (Figura 2.B) da solução filmogênica sobre o alimento, que, posteriormente, é deixado em repouso a temperatura ambiente ou refrigerado para evaporação do solvente e formação da película (DAS, DUTTA e MAHANTA, 2013).

Figura 2 Aplicação de coberturas comestíveis pelo método de (A) imersão e (B) pulverização



Qualquer tipo de material utilizado como revestimento ou envolvimento em alimentos para prolongar a vida de prateleira do produto, que pode ser consumido em conjunto com o alimento, com ou sem remoção adicional é considerado como um filme ou cobertura comestível. Os biofilmes fornecem uma substituição e/ou camadas de fortificação naturais para evitar perdas de umidade, enquanto controla a troca de gases importantes que estão envolvidas em processos de respiração (PAVLATH e ORTS, 2009).

Dessa forma, conhecer as características do produto, as condições de estocagem e distribuição, são importantes para avaliar as propriedades do material a ser utilizado como embalagem para uma aplicação específica. As propriedades de barreira incluem permeabilidade a gases (O_2 , CO_2 , N_2 , etileno, etc.), vapor da água e luz; estes são fatores vitais para manutenção da qualidade dos alimentos. No entanto, o material a ser aplicado como biofilme não pode ser escolhido apenas em relação a sua propriedade de barreira. Fatores como propriedades mecânicas (resistência à tração, alongamento, força de rasgo, resistência à perfuração, fricção, etc.), migração/absorção (global e específica), além, das propriedades morfológicas e de resistência ao calor, também devem ser avaliadas (PETERSEN *et al.*, 1999).

Filmes elaborados a partir de proteínas ou polissacarídeos apresentam boas propriedades mecânicas, ópticas e sensoriais, no entanto, são sensíveis à umidade e exibe alta permeação aos vapores de água, o que aumenta a troca com o ambiente. Ao contrário, filmes compostos de lipídios apresentam boas propriedades de barreiras ao vapor de água, mas, são

opacos e pouco flexíveis, além de apresentarem sabor residual o que pode influenciar as características sensoriais do alimento (GALLO *et al.*, 2000). Dessa forma, a utilização de misturas de polissacarídeos, proteínas e lipídios ou o uso de agentes de reforço, pode ser utilizado como uma nova oportunidade para o desenvolvimento de materiais na área de películas biodegradáveis e comestíveis (DIAS *et al.*, 2011).

São encontradas na literatura pesquisas que associam a aplicação de filmes de amido na conservação de alimentos. No trabalho de desenvolvimento de cobertura a base de amido de trigo e glúten aplicados diretamente sobre morangos, resultados satisfatórios foram obtidos em relação à manutenção de qualidade da fruta durante o período de armazenagem (16 dias). As frutas mantiveram sua firmeza e peso, bem como as propriedades físico-químicas mantiveram-se estáveis quando comparadas com a fruta controle, sem recobrimento (TANADA-PALMU e GROSSO, 2005). Outros autores aplicaram filmes de amido com glicerol para recobrir couve de Bruxelas, os mesmos observaram que após 42 dias de armazenamento o ácido ascórbico e o conteúdo de flavonoides totais mantiveram-se, praticamente, constantes, além das propriedades físico-químicas, quando comparados ao controle (VIÑA *et al.*, 2007).

Ao aplicarem coberturas de goma arábica em tomates (*Solanum lycopersicum* L) armazenados por 20 dias (20 °C / 80-90% UR), ALI *et al.*, (2010) observaram que os frutos revestidos apresentaram atraso significativo nas alterações de perda de peso, redução da firmeza, acidez titulável, concentração de sólidos solúveis, teor de ácido ascórbico e desenvolvimento de cor em comparação com frutos controle não revestidos. Os autores sugerem que o uso de goma arábica como coberturas podem retardar o processo de amadurecimento de tomates armazenados a 20 °C por até 20 dias sem qualquer alteração. Ao avaliar a capacidade antioxidante dos tomates (*Solanum lycopersicum* L) com coberturas de goma arábica ALI, *et al.*, (2013), notaram que frutos revestidos apresentaram redução da taxa respiratória e na produção de etileno, por consequência, uma diminuição dos processos fisiológicos dos tomates, mantendo com isso a capacidade antioxidante total, o teor de licopeno, compostos fenólicos e carotenóides totais, durante o armazenamento, em comparação com frutos não revestidos que apresentaram redução de tais parâmetros.

Para avaliar o efeito de coberturas de quitosana, ALI, *et al.*, (2011), aplicaram a mesma em mamões papaia (*Caricacpapaya* L.) armazenados sobre refrigeração (12 ± 1 °C a 85–90 % UR) durante cinco semanas. Os autores observaram uma lenta diminuição da acidez titulável ao longo do armazenamento nos frutos revestidos, além de menores taxas de perda de peso e firmeza. O painel sensorial aplicado (escala hedônica de cinco pontos) revelou

diferença significativa ($p < 0.05$) no sabor, na cor da casca e polpa, textura e sabor. Os frutos tratados com quitosana atingiram pontuação máxima pelos provadores em todos os parâmetros testados. Os autores sugerem que a quitosana poderia ser utilizada comercialmente para prolongar o armazenamento dos frutos de mamão papaia.

3.3 COMPOSIÇÃO DOS FILMES E COBERTURAS

Como já mencionado, a aplicação de filmes e coberturas está muito relacionada com as características do alimento que serão aplicados. Em geral, eles são produzidos a partir de proteínas (glúten de trigo, zeína de milho, colágeno, gelatina, queratina, caseína, proteína isolada de soja, proteína de amendoim ou de soro de leite), polissacarídeos (derivados de celulose hidrossolúveis, amidos, alginatos, pectinas) e lipídeos (ceras, óleos hidrogenados, triglicerídeos). Tais matérias primas para obtenção dos filmes e coberturas podem ser utilizadas isoladamente ou em conjunto, para adquirir características desejadas para cada aplicação (GALLO *et al.*, 2000).

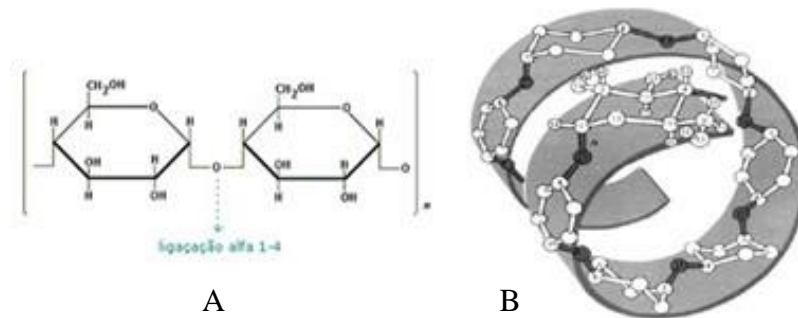
A revisão a seguir trata apenas dos polímeros biodegradáveis utilizados neste trabalho para obtenção dos filmes ou coberturas.

3.3.1 Amidos

O amido é um dos polissacarídeos mais empregados para a produção de filmes, por ser naturalmente abundante, de baixo custo, e ser encontrado, basicamente, em todas as formas de vegetais, seja nas suas raízes, caules, sementes ou frutas. Sendo dentre os carboidratos, o mais abundante e constitui a principal fonte de energia armazenada pelas espécies botânicas e está armazenado sob a forma de grânulos (SINGH *et al.*, 2003).

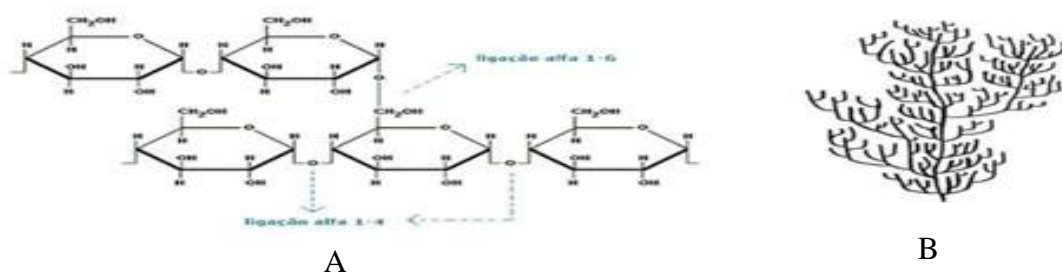
O grânulo de amido é uma mistura de dois polissacarídeos, amilose e amilopectina, em diferentes proporções, de acordo com sua origem botânica. A cadeia de amilose (Figura 3A) é constituída de ligações α -1-4 D- glicose e no espaço apresenta conformação helicoidal (Figura 3B).

Figura 3 Amilose: (a) Estrutura; (b) Conformação helicoidal



A amilopectina (Figura 4A), além de ligações α -1-4 D- glicose, possui em sua cadeia ligações do tipo α -1-6 D- glicose, que dão à molécula um aspecto de cadeia ramificada (Figura 4B) (KRAMER, 2009).

Figura 4 Amilopectina: (A) Estrutura; (B) Formato de ramificações



Fisicamente, o amido nativo assume a forma de grânulos em que a amilose e amilopectina são estruturadas por ligação de hidrogênio, que contém regiões cristalinas e não cristalinas em camadas alternadas. A amilose e os pontos de ramificação de amilopectina formam as regiões amorfas, enquanto as cadeias curtas ramificadas na amilopectina são os principais componentes cristalinos em amido granular. Assim, o teor mais elevado de amilopectina no amido nativo significa maior cristalinidade (JIMÉNEZ *et al.*, 2012).

A proporção de amilose e amilopectina depende da fonte e da idade do amido; geralmente, o amido contém 20 a 25 % de amilose e 75 a 80 % de amilopectina. Teores diferentes podem ser observados, por exemplo, no amido de trigo, milho e de batata que contém em média 20 a 30 % de amilose, enquanto que o seu teor em amidos cerosos é inferior a 5 %, e em amidos de alto teor de amilose pode chegar a 50 a 80% de amilose (SOUZA e ANDRADE, 2000).

Grânulos de amido nativo não são solúveis em água fria devido as suas fortes ligações de hidrogênio; no entanto, quando é aquecido em solução, a estrutura cristalina é rompida e as moléculas de água interagem com os grupos hidroxilas da amilose e amilopectina, para produzir a solubilização parcial do amido. Muitas das suas propriedades funcionais são exibidas, somente, após a ruptura da estrutura do grânulo após aquecimento em meio aquoso. A temperatura na qual ocorre este tipo de transformação é chamada de temperatura de gelatinização, que é um processo irreversível (JIMÉNEZ *et al.*, 2012).

O amido é considerado um dos biopolímeros com maior potencial para a produção de materiais biodegradáveis, em especial, embalagens de alimentos descartáveis, onde o tempo de uso é, relativamente, curto (WANG, THOMPSON e LIU, 2012). Estudos têm sido publicados sobre caracterizações das propriedades funcionais de filmes de amido, pois este apresenta possibilidades de modificação química, física ou genética; o que representa uma matéria prima muito promissora para elaboração de filmes biodegradáveis (GARCIA, MARTINO e ZARITZKY, 2000; MARAN *et al.*, 2013).

Uma das características únicas de polímeros à base de amido é sua propriedade de processamento térmico, que é muito mais complexa do que polímeros convencionais, uma vez que, várias reações químicas e físicas podem ocorrer durante o processamento, tais como a difusão de água, a expansão granular, a gelatinização, a decomposição, a fusão e a cristalização. Entre estas transições de fase, a de gelatinização é, particularmente, a mais importante porque está intimamente relacionada com a conversão do amido em material termo plástico (FAKHOURI *et al.*, 2013). Além disso, apresentam características físicas apropriadas além de ser inodoro, insípido e incolor. No entanto, apresenta sensibilidade à água, devido ao seu caráter hidrófilo e suas propriedades mecânicas são mais fracas em comparação a polímeros sintéticos convencionais (DIAS *et al.*, 2010).

Embora o amido apresente comportamento termoplástico ele não pode ser utilizado puro, principalmente, porque filmes compostos, exclusivamente, por amido são quebradiços, ou seja, não apresentam boas propriedades mecânicas (AHAMED *et al.*, 1996). Para contornar essas dificuldades, o amido pode ser usado em misturas com outros polímeros biodegradáveis renováveis ou plastificantes na elaboração de filmes (ARAUJO-FARRO *et al.*, 2010). Tais misturas podem ser constituídas de material de origem biológica como proteínas animais ou vegetais, polissacarídeos e lipídios, adicionados de plastificantes. De acordo com a composição, a funcionalidade destes materiais pode variar, já, que os componentes oferecem diferentes propriedades à matriz obtida (PARRIS *et al.*, 1997; Dias *et al.*, 2010). Estudos direcionados para a melhoria das propriedades mecânicas e físicas das

embalagens produzidas a partir de biopolímeros tem demonstrado que a adição de nanoestruturas foi estabelecida como uma via promissora para melhoria de tais propriedades, para possibilitar sua aplicação como embalagens de alimentos (OTHMAN, 2014).

Na literatura são encontrados alguns trabalhos de desenvolvimento de filmes ou coberturas de amido das mais diferentes origens, como amido de quinoa (*Chenopodium quinoa* W) (ARAUJO-FARRO *et al.*, 2010), amido de arroz (DIAS *et al.*, 2010; DAS, DUTTA e MAHANTA, 2013), amido de mandioca (SOUZA *et al.*, 2013; REIS *et al.*, 2015), amido de milho (SINGH *et al.*, 2003; ORTEGA-TORO, 2015), entre outros.

3.3.2 Quitosana

Quitosana é um polissacarídeo linear catiônico derivado da quitina, um componente presente em cascas de camarão, caranguejo e insetos, é insolúvel em água e o segundo polímero natural mais abundante depois de celulose (AIDER, 2010). É obtida pela desacetilação da quitina, com a substituição de grupos acetilas (COCH₃) por grupos aminos livres (-NH₂) que podem ser protonados em meio ácido (-NH₃⁺) fazendo com que a quitosana seja solúvel em soluções ácidas de ácidos, como acético, cítrico, ascórbico, láctico, málico, oxálico, ácido succínico, adípico e propiónicos (ZHONG, SONG e LI, 2011).

A quitosana pode ser utilizada como biopolímero em função da propriedade de formar filmes. Os filmes a base de quitosana apresentam moderadas propriedades de barreira ao oxigênio e boas propriedades de barreira ao dióxido de carbono, além, de apresentarem alta permeabilidade ao vapor de água, devido à sua natureza hidrofílica (SANCHEZ-GONZALEZ *et al.*, 2010). Além disso, a quitosana e seus derivados apresentam atividade antimicrobiana e antifúngica contra uma vasta gama de microrganismos e são amplamente, estudados como conservantes de alimentos (BONILLA *et al.*, 2013).

Sua atividade antimicrobiana aumenta com a diminuição do pH, mas, também depende da força iônica e alguns fatores intrínsecos, tais como seu peso molecular ou o grau de desacetilação. Quitosana de baixo peso molecular é mais solúvel, sendo mais reativa com as membranas celular microbiana (CORRALES, FERNÁNDEZ e HAN, 2014).

3.3.3 Blendas

A mistura de dois ou mais biopolímeros para elaboração de um filme ou cobertura, é chamada de blenda polimérica, ou, simplesmente, blenda. Nos últimos anos, grande atenção

vem sendo dada às chamadas blendas poliméricas, tanto do ponto de vista acadêmico, quanto para aplicação a nível industrial. Sem grandes investimentos no desenvolvimento de novas tecnologias, é possível obter materiais com as mais diversas propriedades desejadas, pela simples combinação de diferentes polímeros com características específicas. Dessa maneira, as blendas poliméricas são uma alternativa tecnológica para obter materiais poliméricos com as mais diversas especificações a um custo relativamente baixo.

Filmes de proteína são elaborados, a partir de matérias primas de elevado peso molecular tal como a gelatina, as proteínas miofibrilares, glúten, proteínas de soro de leite, entre outros. Estas películas são caracterizadas por boas propriedades mecânicas, apesar de serem, geralmente, muito permeável à água e gases (TAPIA-BLACIDO, SOBRAL e MENEGALLI, 2005). Já o amido, é o polissacarídeo mais amplamente utilizado para a produção da película, porque é, naturalmente, abundante e de baixo custo. Filmes de amido apresentam boas propriedades mecânicas, mas a sua sensibilidade à umidade é uma grande desvantagem. Apesar de apresentar comportamento termoplástico ele não pode ser utilizado puro, principalmente, porque filmes compostos, exclusivamente, por amido são quebradiços (Araujo-Farro, 2008). Por sua vez, lipídeos podem ser empregados na formulação de filmes e revestimentos, como componente majoritário da matriz polimérica ou como aditivo incorporado em menores quantidades em filmes hidrofílicos, com objetivo de aumentar a sua hidrofobicidade. Em função da baixa polaridade de suas moléculas, filmes lipídicos apresentam baixa permeabilidade ao vapor de água e sua principal atuação é bloquear o ganho de umidade nos alimentos. Contudo, estes filmes exibem pouca flexibilidade, baixa resistência aos esforços mecânicos e reduzida estabilidade à oxidação (GARCIA, MARTINO e ZARITZKY, 2000).

Uma alternativa para melhorar as propriedades físicas é a preparação de blendas poliméricas, através do uso combinado de dois ou mais polímeros em conjunto com um plastificante e um solvente. A mistura pode, em alguns casos, exibir propriedades superiores quando comparadas às propriedades individuais de cada polímero, o que permite ampliar, vantajosamente, sua aplicação. (CAMPOS, 2014).

Filmes ou coberturas obtidas através das misturas de diferentes biopolímeros podem ser obtidos tanto combinando diferentes polímeros isolados, ou através do uso de farinhas integrais de diferentes origens. De acordo com alguns pesquisadores, a utilização de misturas naturais (farinhas) a partir de culturas agrícolas tem atraído cada vez mais atenção, tendo em vista, as diversas fontes botânicas disponíveis como material para o desenvolvimento de filmes comestíveis, aliadas a possibilidade de melhorar as suas propriedades mecânicas e de

barreira pelas combinações naturais. As características das películas à base de farinha é resultado das interações que ocorrem, naturalmente, entre o amido, proteínas e lipídeos durante a formulação dos biofilmes (TAPIA-BLACIDO, SOBRAL e MENEGALLI, 2005; DIAS *et al.*, 2011; ANDRADE-MAHECHA, TAPIA-BLACIDO e MENEGALLI, 2012; Dick, MELINA *et al.*, 2015).

3.4 FILMES ATIVOS

Embalagens tradicionais fornecem além da proteção mecânica para os produtos alimentares, também a proteção contra contaminações externas, tais como, a contaminação química e microbiana, vapor de água, oxigênio, luz, insetos, sujeira e partículas de pó, etc. O papel base da embalagem é inerte em relação ao contato com os alimentos, ou seja, as embalagens tradicionais, não devem interagir com os mesmos (LEE e RAHMAN, 2014).

No entanto, para prolongar a vida de prateleira de produtos alimentares, várias estratégias são, comumente, empregadas para melhorar a eficácia de embalagem. Com isso, nas últimas décadas, surgiram novas linhas de pesquisa com o objetivo de desenvolver embalagens em que os materiais resultantes interagem, positivamente, com os alimentos, corrigem deficiências das embalagens passivas e atuam, favoravelmente, na preservação e na qualidade do alimento. Assim, surgem novas pesquisas para o desenvolvimento das chamadas embalagens ativas e inteligentes (SILVA-WEISS *et al.*, 2013; VANDERROOST *et al.*, 2014).

Os termos embalagens ativas e embalagens inteligentes estão, intimamente, relacionados, embora não haja uma distinção importante entre estes dois. Esses termos foram definidos de forma diferente por alguns autores. No entanto, de maneira geral, as embalagens inteligentes podem ser definidas como aquelas que monitoram as condições do alimento acondicionado ou do ambiente externo à embalagem (LEE e RAHMAN, 2014; VANDERROOST *et al.*, 2014); as embalagens ativas, por sua vez, são aquelas que interagem de maneira intencional com o alimento, para prolongar a vida de prateleira ou para melhorar as propriedades de segurança ou sensoriais, mantendo a qualidade do alimento embalado. Muitas dessas embalagens ativas podem ser desenvolvidas a partir de matérias primas naturais e renováveis, as quais, além de conferir caráter ativo, são biodegradáveis (SANTANA *et al.*, 2013).

Tradicionalmente, uma embalagem aumenta a segurança do alimento por proporcionar uma barreira às contaminações (microbiológicas e químicas), além de ter como uma das principais características a prevenção na migração de seus próprios componentes para o

alimento. Por sua vez, os sistemas de embalagem ativa devem acumular funções adicionais, entre as quais podem ser destacadas a absorção ou liberação de compostos que aumentam sua vida de prateleira, segurança e qualidade ou melhoram suas características sensoriais (REALINI e MARCOS, 2014). Alguns sistemas de embalagens ativas, já desenvolvidas que estão, atualmente, em uso pela indústria de alimentos, incluem embalagens de remoção de oxigênio e dióxido de carbono (JANJARASSKUL, TANANUWONG e KROCHTA, 2011; GOMES *et al.*, 2012), etileno (FLOROS *et al.*, 2000) e eliminação da umidade (LIM, 2011).

As embalagens ativas emergentes nos últimos anos são as embalagens incorporadas com agentes antimicrobianos e/ou antioxidantes (KECHICHIAN *et al.*, 2010; de CAMARGO ANDRADE-MOLINA *et al.*, 2013; BARBOSA-PEREIRA *et al.*, 2014; NORONHA *et al.*, 2014; REIS *et al.*, 2015). Filmes e coberturas antioxidantes podem retardar a oxidação lipídica, o desenvolvimento de sabores estranhos e perdas nutricionais, ao passo que os filmes e coberturas antimicrobianos podem prevenir a deterioração organoléptica da proliferação microbiana (MELLINAS *et al.*, 2016).

Em resumo, o principal objetivo do desenvolvimento de embalagem ativa é a concepção de embalagens funcionais, que contenham substâncias ativas que possam ser liberadas de uma maneira específica e controlada aos alimentos, para aumentar a conservação e segurança alimentar (AZEREDO, FARIA e AZEREDO, 2000).

A deterioração por microrganismos e a oxidação dos lipídios são as principais causas de deterioração dos alimentos. Portanto, controlar tais fatores se faz necessário para que os alimentos alcancem altos níveis de qualidade, com aumento da vida de prateleira e rentabilidade da indústria.

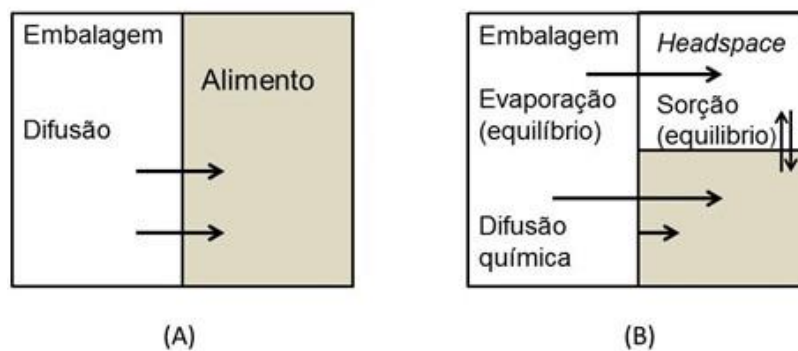
A aplicação de embalagens antimicrobianas está diretamente relacionada com a segurança alimentar, bem como a extensão da vida útil, para impedir o crescimento e desenvolvimento de microrganismos. O crescimento de microrganismos deteriorantes reduz a vida de prateleira e a qualidade dos alimentos, ao passo que, o crescimento de microrganismos patogênicos ocasiona potencial perigo para a saúde pública (HAN, 2014a). O uso de embalagens antimicrobianas tem como vantagem a incorporação do agente, diretamente, no alimento, e o fato de que menores teores de conservante entram em contato direto com o produto, que atende uma tendência atual do consumidor, que é a busca por alimentos livre de conservantes (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2004).

Em geral, as embalagens ativas antimicrobiana podem ser classificadas em duas categorias: as embalagens ativas não migratórias que contêm no seu material ou na sua superfície um composto ativo que atua como antimicrobiano quando os microrganismos

entram em contato com a superfície da embalagem; e as embalagens ativas de libertação ou com migração do composto ativo, onde este composto migra, parcial ou completamente, da embalagem para o alimento ou para o espaço ao redor do alimento (ocorre por difusão de uma fase para outra). Em ambos os casos, o contato entre o produto e o agente antimicrobiano é necessário (LIM, 2011).

Em sistemas sem a presença de espaço interno livre (*headspace*), a difusão entre o material da embalagem e o produto é o principal fenômeno envolvido (Figura 5A). Em sistemas contendo espaço interno dentro da embalagem, sem contato direto com o produto, normalmente, utilizados em embalagens flexíveis, copos e caixas, a evaporação ou distribuição equilibrada do composto antimicrobiano através do *headspace*, é considerada uma das partes principais do mecanismo de migração. Uma substância volátil pode ser usada nestes sistemas, para que possa migrar através do *headspace* até o produto (Figura 5B) (FERREIRA, 2012).

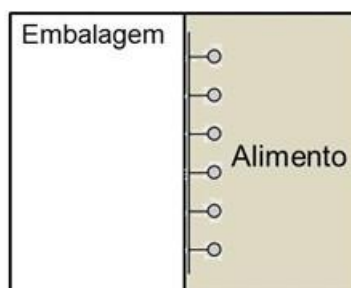
Figura 5 Sistemas de embalagem e o comportamento das substâncias antimicrobianas. (A) embalagem sem espaço interno livre – contato direto alimento/embalagem e (B) embalagem com espaço interno livre.



Fonte imagem: (Ferreira, 2012)

Além de difusão e sorção equilibrada, algumas embalagens antimicrobianas utilizam compostos ativos (antibióticos ou fungicidas) imobilizados na sua superfície. Nestes casos, ocorre inibição do crescimento microbiano pelo contato com a substância antimicrobiana imobilizada no material da embalagem sem transferência de massa (Figura 6).

Figura 6 Sistemas de embalagem: Composto, com ação antimicrobiana, imobilizado na superfície do filme.



Fonte da imagem (Ferreira, 2012)

Como mencionado anteriormente, a tecnologia de embalagens com atividade antimicrobiana baseia-se no fato de que, na maioria dos alimentos sólidos e semissólidos, o crescimento microbiano ocorre mais superficialmente, logo é desejável maior contato entre o alimento e o agente antimicrobiano. Vários compostos naturais e sintéticos são estudados e avaliam seu potencial antimicrobiano dentro deste conceito, como exemplos, os íons metálicos na forma de nanopartículas, ácidos orgânicos, bacteriocinas e fungicidas, como os benzoatos, sorbatos e óleos essenciais, além do uso de polímeros com atividades antimicrobianas naturais, como a quitosana e as poliamidas (MORAES *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, é crescente o interesse a respeito do uso e aplicação de nanoestruturas em embalagens ativas (MELO Jr. *et al.*, 2012). Sistemas com nanoestruturas podem apresentar função antimicrobiana, sendo, particularmente, eficazes devido à elevada área superficial por volume e maior reatividade dos agentes antimicrobianos em escala nanométrica. (Rhim, WANG e HONG, 2013).

Estudos têm demonstrado a atividade antimicrobiana ou inibidores de crescimento de nanopartículas ou nanocompósitos tanto isolados (CIOFFI *et al.*, 2005) ou aplicados a embalagens com ação antimicrobiana (RHIM, WANG e HONG, 2013). EMAMIFAR *et al.*, (2011) estudaram a adição de nanopartículas de prata (AgNPs) e óxido de zinco (ZnO) adicionadas na elaboração de embalagens de polietileno de baixa densidade (LDPE), que apresentou efeito inibidor no desenvolvimento de *Lactobacillus plantarum* durante o armazenamento de sucos de laranja. Outros autores estudaram a adição de AgNPs em filmes de celulose, utilizados para recobrir melão minimamente processado, que apresentaram efeito inibidor no desenvolvimento de microrganismos relacionados com a Deterioração dos melões, tanto mesófilos, psicrófilos e leveduras (FERNANDEZ, PICOUET e LLORET, 2010). Embalagens de polietileno (PE) adicionada de AgNPs, utilizados para embalar sucos de maçã

apresentaram efeito inibidor contra *Alicyclobacillus acidoterrestris* (DEL NOBILE *et al.*, 2004).

Os materiais nanoparticulados também podem ser incorporados em polímeros ou biopolímeros para melhorar suas propriedades mecânicas, de barreira e óticas. Estudos com óxido de zinco demonstram uma melhoria da resistência de filmes biodegradáveis, além de desempenhar efeito bloqueador de radiação UV (LLORENS *et al.*, 2012); bem como, melhoria das propriedades mecânicas e de barreira de filmes de gelatina incorporados com AgNPs (KANMANI e RHIM, 2014).

Além das nanopartículas metálicas, outros compostos que têm despertado interesse quanto a sua eficácia para segurança e preservação de alimentos são as plantas aromáticas e seus extratos, muito utilizados como agentes antimicrobianos. Tal atividade se deve a presença de seus óleos essenciais (OEs) e outros componentes de metabólicos secundários de plantas. Estes fitoquímicos são antimicrobianos de ocorrência natural e encontrados em muitas plantas, apresentam ampla variedade de aplicações através da redução do crescimento e sobrevivência de microrganismos (CALO *et al.*, 2015). Quimicamente, são constituídos de terpeno (mono-, sesqui- e diterpenos), álcoois, ácidos, ésteres, epóxidos, aldeídos, cetonas, aminas e sulfuretos, e podem ser divididos em dois grupos: (i) compostos de terpeno e (ii) compostos de aroma (BURT, 2004). Sua composição e concentração dependem de fatores como sua origem, planta ou parte da planta de onde foi extraído, como flores, folhas, caules, casca, frutas inteiras, pericarpo, semente ou raízes (CALO *et al.*, 2015).

Alguns estudos são encontrados na literatura e relatam a adição de óleos essenciais no desenvolvimento de embalagens com atividade antimicrobiana; como os filmes comestíveis de caseinato de sódio (SC) e caseinato de cálcio (CC) preparados com adição de *carvacrol*, o maior constituinte do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), os quais demonstraram efeito inibidor contra o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (ARRIETA *et al.*, 2014). Em outro trabalho, diferentes filmes elaborados a partir de farinha de amaranto, quitosana e amido de milho, demonstraram atividade antifúngica, pela inibição do crescimento dos fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium digitatum*, quando adicionados com óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), canela (*Cinnamomum verum*) e orégano mexicano (*Lippia berlandieri*). De acordo com estes autores, melhores resultados foram observados para os filmes de quitosana, devido ao fato da mesma apresentar, naturalmente, atividade antimicrobiana, e que filmes comestíveis de quitosana incorporados com óleo essencial pode melhorar a qualidade de alimentos através da ação dos compostos antimicrobianos presentes nos óleos essenciais (AVILA-SOSA *et al.*, 2012). Em coberturas

comestíveis elaborados com proteína de soja incorporados com óleos essenciais de orégano e tomilho aplicadas sobre carnes fresca armazenadas sob refrigeração (4 °C), EMIROĞLU *et al.*, (2010) observaram que os filmes incorporados com os óleos essenciais apresentaram atividade antimicrobiana frente a todos os microrganismos testados, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Lactobacillus plantarum*.

Além dos conservantes, outros agentes químicos têm sido incorporados às embalagens, para prolongar a vida de prateleira dos alimentos, como os antioxidantes. Esse sistema consiste na incorporação de substâncias antioxidantes em filmes plásticos, papéis ou sachês, de onde serão liberadas para proteger os alimentos da degradação oxidativa, para inibir as reações de oxidação ao interagirem com radicais livres e peróxidos (SOUZA *et al.*, 2011),

Filmes com ação antioxidante podem retardar ou diminuir o processo de oxidação de produtos com altos teores de gordura, e são de grande importância para a indústria, principalmente, dos ramos alimentício e farmacêutico. Tradicionalmente, as embalagens ativas antioxidantes existentes no mercado utilizam antioxidantes sintéticos e matrizes poliméricas não biodegradáveis em sua formulação. Como alternativa, os filmes biodegradáveis ativos antioxidantes têm ganhado cada vez mais espaço. No entanto, ao se fazer a incorporação de antioxidantes naturais a filmes biodegradáveis, ocorre, simultaneamente, alterações das propriedades mecânicas, térmicas e de barreira (SOUZA, Silva e DRUZIAN, 2012).

As estratégias de uma embalagem para proteger os alimentos contra a oxidação vão desde a retirada ou exclusão de oxigênio por eliminadores de oxigênio ou uma barreira extra a sua entrada; até o uso de antioxidantes que em contato com a superfície do alimento promove uma lenta libertação a partir do material de embalagem. Revestimentos comestíveis de proteção também podem ser usados como uma barreira de oxigênio ou meio de transferência de antioxidante (LEE, 2014).

Diferentes compostos podem ser adicionados na matriz polimérica de uma embalagem, para atribuir características ativas antioxidantes. Os compostos utilizados podem ser antioxidantes sintéticos como hidroxianisol butilado (BHA) a hidroxitolueno butilado (BHT), óleos essenciais de diferentes espécies, extratos de plantas ou compostos bioativos isolados de diferentes matrizes alimentícias (NORAJIT, KIM e RYU, 2010; PEREIRA De ABREU *et al.*, 2011; AMORATI, FOTI e VALGIMIGLI, 2013; Lee, 2014).

Ao elaborar filmes a base de ácido polilático (PLA), preparados com α -tocoferol, hidroxitolueno butilado (BHT) e polietileno glicol 400 (PEG 400), BYUNET *et al.* (2010),

além de avaliarem as propriedades físicas e de barreiras dos filmes, avaliaram a propriedade antioxidante das três formulações desenvolvidas: Filmes apenas de PLA; filme de PLA mais BHT e PEG (BP-PLA filmes) e por fim filmes de PLA com α -tocoferol, BHT e PEG (ABP-PLA filmes). Os autores observaram que o filme ABP-PLA apresentou maior atividade de inibição de radicais DPPH, 90 %, enquanto os filmes elaborados com PLA puro e filme BP-PLA apresentaram 0 e 14 %, respectivamente.

De acordo com MARTINS *et al.*, (2012), os sistemas de embalagem multifuncionais que contenham substâncias ativas têm um elevado potencial para aplicações em embalagens comerciais para alimentos. Os consumidores preferem alimentos com maior segurança; e este fato é particularmente relevante no caso de produtos frescos e minimamente processados. Além disso, o retardo da oxidação através da adição de antioxidantes naturais é altamente desejável. Antioxidantes naturais tais como vitamina E ou outros carotenoides e flavonoides isolados, podem auxiliar na redução dos riscos de doenças, tais como doenças cardiovasculares e são reconhecidos como seguros para alimentação humana. Estes autores desenvolveram coberturas de quitosana (1,5 % p/v) contendo α -tocoferol com 98% de pureza em diferentes concentrações (0.1 e 0.2 % p/v), e observaram que apesar da adição do antioxidante ter ocasionado alterações nas propriedades físicas dos filmes, como redução das propriedades mecânicas de tração à ruptura e elasticidade e aumento da opacidade; a capacidade antioxidante das coberturas à base de quitosana aumentou quando α -tocoferol estava presente na matriz das coberturas. Os resultados mostraram que α -tocoferol pode ser adicionado com sucesso em coberturas comestíveis, reforçando a qualidade e vida de prateleira final de produtos alimentares.

Em filmes elaborados a partir de amido de trigo e quitosana BONILLA *et al.*, (2013) adicionaram quatro ingredientes ativos (antioxidantes), os óleos essenciais de manjeriço e tomilho, ácido cítrico e α -tocoferol, todos na proporção de amido:antioxidante 1:0,1. Os autores observaram que a incorporação de antioxidantes ocasionou a diminuição das propriedades mecânicas. Apenas o ácido cítrico promoveu um aumento no módulo de elasticidade, mas diminuição na elasticidade do filme. As propriedades de barreira ao vapor de água dos filmes foram ligeiramente melhoradas quando adicionados de ácido cítrico e α -tocoferol, ao passo que as propriedades de barreira ao oxigênio foram, significativamente, melhoradas em todos os casos. A maior capacidade antioxidante foi observada para os filmes contendo α -tocoferol.

Antioxidantes isolados apresentam ótima atividade antioxidante quando adicionados em embalagens, além disso, devido à preocupação com a segurança alimentar da população,

tem crescido a busca por produtos naturais que possam servir como fontes de antioxidantes para serem utilizados em substituição aos antioxidantes sintéticos. A incorporação de antioxidantes em filmes e recobrimentos comestíveis auxiliam na prolongação da vida de prateleira dos alimentos e retarda o processo de oxidação desses produtos. As embalagens ativas tanto antimicrobianas como antioxidantes constituem uma importante ferramenta tecnológica para aumentar a vida de prateleira de alimentos acondicionados e retardar tanto deterioração antimicrobiana como químicas.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

Como citado anteriormente, as embalagens destinam-se, principalmente, à proteger e prolongar a vida útil dos alimentos. Dessa forma, é muito importante uma caracterização ampla dos filmes biodegradáveis uma vez que eles constituem um grande potencial na substituição de materiais não biodegradáveis em embalagens (DIAS *et al.*, 2011).

O uso de filmes para diferentes finalidades depende de suas características, como suas propriedades de barreira à umidade, gases e solutos, solubilidade em água, propriedades óticas, características mecânicas, propriedades térmicas e estruturais, características estas, que são influenciadas pelo tipo de polímero, pelo processo de obtenção dos filmes, modo de aplicação e dos diferentes aditivos utilizados para atribuir uma função ativa as embalagens.

Dessa forma é de extrema importância avaliar tais características nos filmes e coberturas desenvolvidos, afim de potencializar sua aplicação e seus possíveis efeitos sobre os alimentos.

3.5.1 Propriedades Mecânicas

Uma das principais características esperadas em uma embalagem obtida a partir de biopolímeros, é que estes materiais sejam resistentes à ruptura e abrasão, de forma a permitir que o alimento mantenha sua integridade e proteção durante o manuseio e transporte e ao mesmo tempo, mantenham sua flexibilidade para se adaptar a eventuais deformações do produto sem que ocorra dano mecânico (SENGUPTA e HAN, 2014). As propriedades mecânicas são características determinantes para a sua utilização como material de embalagem, devido ao manuseio a que estão sujeitos os produtos durante sua distribuição e comercialização (SOUZA, SILVA e DRUZIAN, 2012).

As propriedades mecânicas de filmes biodegradáveis dependem tanto da sua composição quanto das condições ambientais em que se encontra. Com o intuito de manter a integridade do produto durante manuseio e armazenamento, os materiais utilizados na fabricação de filmes devem apresentar adequadas propriedades mecânicas, tais como, módulo de elasticidade, resistência à tração e porcentagem de alongação (WIHODO e MORARU, 2013).

As limitações de uso de muitos biopolímeros para o desenvolvimento de embalagens se dá em função de suas propriedades mecânicas. O emprego do amido na elaboração de filmes apresenta como vantagem a biodegradabilidade, no entanto, suas propriedades são inferiores aos plásticos convencionais (FAKHOURI *et al.*, 2015). Neste sentido, uma limitação dos filmes de amido é que os mesmos apresentam menor flexibilidade, quando comparados aos filmes sintéticos, pois o amido gelatinizado apresenta fortes ligações polares que o torna quebradiço (MALI *et al.*, 2005).

Este problema pode ser parcialmente, solucionado pela incorporação de um agente plastificante, que atua entre as cadeias do polímero, para promover um enfraquecimento das forças intermoleculares e permitir que as mesmas aumentem sua mobilidade (Han, 2014b). No entanto, se por um lado a incorporação de plastificantes contribui para o aumento da flexibilidade, por outro diminui a resistência mecânica dos filmes, além de modificar, sensivelmente, outras propriedades, como a permeabilidade ao vapores de água e gases (DICK, M. *et al.*, 2015).

Dois métodos podem ser empregados para avaliação das propriedades mecânicas dos filmes, o teste de perfuração e o teste de tração. Nos testes de perfuração, uma sonda cilíndrica desce, perpendicularmente, à superfície do filme, que está fixada sobre um suporte, até que ocorra o rompimento da amostra para medir a força e deformação na ruptura através dos gráficos de força versus deslocamento. As propriedades de tração são as mais relatadas na literatura e expressam a resistência do material ao alongamento e ao rompimento, quando submetido à tração (MALI, GROSSMANN e YAMASHITA, 2010).

As metodologias de análise das propriedades mecânicas de filmes se baseiam, principalmente, na norma da ASTM (*American Society for Testing and Materials*) (ASTM D882-12), que se aplica à determinação das propriedades de tração de embalagens com espessura inferior a 1 mm (DICK, 2015a). Dentre as propriedades de tração mais estudadas estão a resistência máxima à tração, o alongamento na ruptura e o módulo de elasticidade ou de Young (MALI, GROSSMANN e YAMASHITA, 2010).

A resistência máxima à tração (comumente expressa em MPa) é a resistência oferecida pelo material no ponto da ruptura. O alongamento (comumente expresso em %) é a relação percentual entre o alongamento do corpo-de-prova no teste e seu comprimento inicial. O módulo de Young (comumente expresso em MPa) é a relação entre a resistência à tração e a deformação na região elástica, em que a resposta do corpo-de-prova ao alongamento é crescente e, linearmente, proporcional à tração imposta. O módulo de Young é um indicador da rigidez do filme, sendo que, quanto maior o módulo, mais rígido é o filme (SARANTÓPOULOS *et al.*, 2002).

A magnitude da tensão e da alongação está, altamente, associada à quantidade do plastificante presente no filme. Geralmente, o aumento da quantidade de plastificante resulta em filmes com menor resistência à tração e maior alongação. Filmes hidrofílicos absorvem a umidade mais rapidamente a níveis de umidade mais elevados, para aumentar assim, o efeito plastificante da água, que, posteriormente, reduz a resistência à tração e aumenta a elasticidade dos filmes (CAMPOS, 2014).

3.5.2 Propriedades de Barreira

Filmes e coberturas além da função de proteção dos alimentos contra danos físicos, devem também ser planejados com o intuito de otimizar as propriedades de barreira do alimento com o ambiente externo, e assim contribuir contra reações químicas, físicas, sensoriais e microbiológicas (LAHNKE, 2015).

Essas propriedades dependem da composição química e da estrutura dos polímeros; por exemplo, filmes feitos de polissacarídeos ou proteínas, usualmente, apresentam adequadas propriedades mecânicas e de barreira aos gases, mas podem ser, altamente, sensíveis à umidade e apresentar pobres propriedades de barreira ao vapor de água (ARAUJO-FARRO, 2008). Além disso, dependem das características do produto em que o filme é aplicado e das condições de armazenamento. As propriedades de barreira a gases como oxigênio, dióxido de carbono, etileno e voláteis são necessárias, a fim de, reduzir a taxa de respiração de produtos frescos e prevenir a perda de aromas e compostos flavorizantes para o ambiente (LIN e ZHAO, 2007).

Vários produtos são suscetíveis à deterioração devido ao ganho de umidade, como os alimentos desidratados, medicamentos em pó, misturas para sopas e sucos, os biscoitos, nozes e rações animais que perdem facilmente a crocância quando absorvem umidade. Já alimentos como carnes, queijos, produtos congelados, frutas e hortaliças, a perda de umidade tem que

ser evitada, pois provoca perda de peso, ressecamento, alterações de cor e de textura (DA CRUZ, 2013).

O processo de permeação aos gases e vapores de água por meio dos filmes, ocorre através dos espaços intermoleculares da matriz polimérica, e considera-se que acontece em diferentes etapas, primeiramente, a sorção e solubilização do permeante na superfície do material, seguindo de uma difusão do permeante através do material devido à ação de gradiente de concentração, e por fim, a dessorção e evaporação do permeante na outra face do material. Um filme que apresenta ausência de rachaduras ou orifícios, o principal caminho para os gases e vapores de água é pela difusão molecular, que compreende a abertura de espaço vazio entre os segmentos das cadeias dos polímeros, devido às oscilações dos segmentos, seguido do deslocamento do permeante dentro do espaço vazio (MALI, GROSSMANN e YAMASHITA, 2010).

A barreira a gases é avaliada em termos de taxa de permeabilidade a gases, ou seja, pela quantidade de gás que passa através de uma unidade de área superficial do material de embalagem por unidade de tempo, à determinada temperatura e sob certo gradiente de pressão parcial do gás teste e à determinada umidade relativa (Da CRUZ, 2013).

A permeabilidade ao vapor de água é a medida da facilidade com que um material pode ser penetrado pelo vapor de água. A Norma ASTM E96-05 define permeabilidade como a taxa de transmissão de vapor de água através da unidade de área do material plano, a uma determinada espessura, induzida pela diferença de pressão de vapor entre duas superfícies específicas, sob condições de temperatura definidas. É um método gravimétrico que envolve a vedação do filme a ser testado em uma cápsula, parcialmente, cheia de água ou solução saturada de sal (método da água) ou dessecante (método do dessecante), o que deixa um espaço de ar entre o filme e a solução de água, sal saturado ou dessecante. Em seguida, a cápsula é colocada em um ambiente com temperatura e umidade relativa controlada e a mudança de peso com o tempo, deve ser acompanhada para determinar o estado de fluxo estável de água para o filme. O fluxo é dividido pela diferença de pressão parcial sobre o filme durante o teste e multiplicado pela sua espessura para calcular os valores de PVA (permeabilidade de vapor de água) do filme (ASTM, 2005).

O conhecimento da permeabilidade ao vapor de água é imprescindível para a aplicação dos filmes, não sendo uma propriedade restritiva. Um material muito permeável, como é o caso dos filmes de amido, poderá ser indicado para embalagem de vegetais frescos, enquanto que um filme pouco permeável poderá ser indicado para produtos desidratados, por exemplo (DHALL, 2013).

Exceto para os materiais à base de lipídeos, a permeabilidade ao vapor de água da maior parte dos filmes elaborados com biopolímeros é, geralmente, mais elevada do que a dos filmes plásticos comuns. Todas as propriedades de barreira dos filmes e coberturas são afetadas, significativamente, pela composição da película e pelas condições ambientais (umidade relativa e temperatura). A permeabilidade ao oxigênio também é muito sensível à umidade relativa do ambiente; em condições elevadas de umidade relativa, a permeabilidade ao oxigênio aumenta, substancialmente; portanto, é muito importante manter o ambiente com baixa umidade para maximizar a eficácia de filmes e coberturas como barreiras de gás (HAN, 2014b).

3.5.3 Propriedades Ópticas

As propriedades ópticas dos filmes e coberturas são essenciais para definir a capacidade de sua aplicação em alimentos, uma vez que esta propriedade pode prejudicar o aspecto dos produtos revestidos, um importante fator de qualidade (BARBA De LA ROSA *et al.*, 2009; PEREDA, AMICA e MARCOVICH, 2012).

A embalagem é, frequentemente, a única forma de exposição do produto ao consumidor antes de sua compra. Dessa forma, os materiais escolhidos para sua confecção, desempenham um papel fundamental no *marketing* das mercadorias. As propriedades óticas de filmes estão relacionadas à opacidade (transparência), cor e brilho. A cor e o brilho de uma embalagem estão, geralmente, relacionados à imagem do produto. A opacidade desempenha também um papel muito importante, uma vez que determinados produtos, principalmente, alimentícios estão suscetíveis à fotodegradação ou fotoxidação, o que faz da embalagem uma importante ferramenta de barreira à ação da radiação ultravioleta (SOUSA, 2012).

A cor é um importante parâmetro para caracterização dos filmes, pois está relacionada com a matéria prima utilizada na elaboração dos mesmos, como por exemplo, filmes a base de farinhas apresentam uma tendência à cor amarelada (PELLISSARI *et al.*, 2013), enquanto filmes à base de gelatina que são, praticamente, incolores (SOBRAL *et al.*, 2001). No caso dos filmes, a cor pode ser determinada pelo método HunterLab (HUNTERLAB, 1997), através do uso de colorímetros, pela escala CIELab com os parâmetros L^* representando a luminosidade, a^* as coordenadas vermelho/verde (+a indica vermelho e -a indica verde) e b^* as coordenadas amarelo/azul (+b indica amarelo e -b indica azul).

Um objeto é dito transparente quando a luz incidente o atravessa com um mínimo de absorção ou reflexão. Por sua vez, um objeto opaco, absorve e/ou reflete toda luz nele

incidente, sem que ocorra alguma transmissão de luz. Para uma boa apresentação visual do produto, é desejável que as embalagens apresentem elevado brilho e alta transparência. No entanto, algumas vezes a proteção contra a incidência de luz se faz necessária (transparência baixa ou nula), como no acondicionamento de produtos sensíveis a reações de deterioração catalisadas pela luz (DICK, 2015b). Dessa forma, filmes ou coberturas mais opacas ou que contenham na sua composição ingredientes que absorvam luz no espectro UV (200 a 400 nm) ou visível (400 a 800 nm), como compostos antioxidantes, são uma alternativa, a fim de, prevenir essas reações (SILVA-WEISS *et al.*, 2013).

3.5.4 Propriedades Estruturais

A estrutura e microestrutura dos filmes e coberturas após secagem é influenciada diretamente pelo arranjo estrutural dos diferentes componentes utilizados na sua formulação inicial, além dos processos utilizados na sua elaboração (PENG, YIN e LI, 2013).

Entre as técnicas mais comuns para avaliar as propriedades estruturas de filmes e cobertura estão à Microscopia de Luz, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Microscopia de Força Atômica, a Difração de Raios X, Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Análise Termomecânica (TMA), Análise Dinâmico-Mecânica (DMA) e Espectroscopiade Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) (GARCÍA *et al.*, 2009; HAN, 2014a).

A técnica mais empregada na caracterização de materiais é a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), devido às várias características desta técnica, que permite o estudo de estruturas superficiais ou internas. As imagens têm alta profundidade de foco, que significa a obtenção de diferentes relevos da superfície (SOUSA, 2012). A MEV utiliza elétrons ao invés da luz para formar uma imagem. Este método possui muitas vantagens em relação à microscopia de luz, tais como resolução mais elevada, fácil de controlar e possibilidade de utilização de diferentes magnificações. A MEV tem sido utilizada em diversos estudos para observar microestrutura de polímeros, distribuição do material na matriz e separação de fases (CAMPOS, 2014).

3.5.5 Estabilidade Térmica

A análise de estabilidade térmica é definida como grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em

função da temperatura e/ou tempo, enquanto essa substância é submetida a um programa controlado de temperatura (SILVA, PAOLA e MATOS, 2007).

Destaca-se entre as mais conhecidas a Colorimetria Exploratória Diferencial (DSC), uma técnica termoanalítica nas quais as variações de entalpia da amostra são monitoradas em relação a um material inerte enquanto ambas são submetidas a um programa controlado de temperatura (FERRER *et al.*, 2015); e a Análise Termogravimétrica (TGA) a qual foi utilizada neste trabalho.

A análise Termogravimetria (TGA) baseia-se na variação de massa de uma amostra, resultante de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação) em função da temperatura. Em uma curva TGA, observam-se inflexões devido ao processo de degradação térmica do material, que depende de sua natureza química (CAMPOS, 2014). A taxa de aquecimento é, geralmente, escolhida em função da resolução desejada no experimento ou da produtividade de cada situação específica. É comum realizá-la a partir da temperatura ambiente até alcançar em torno de 600-650 °C (SCHMIDT, GIACOMELLI e SOLDI, 2005). A representação dos seus resultados pode ser feita na forma de gráfico, para relacionar a perda de massa (%) pela temperatura (°C). A correspondente derivada do gráfico obtido auxilia na identificação das temperaturas de degradação (T_d) e perda de massa (Δw) referente a cada estágio de perda de massa observado.

Para filmes ou coberturas de biopolímeros, é comum observar a ocorrência de três estágios de perda de massa, como relatado por alguns autores para filmes de proteínas de soja, amido de milho (SOARES, SCREMIN e SOLDI, 2005) e de gelatina de pele de peixe (TONGNUANCHAN *et al.*, 2015). O primeiro estágio é relacionado com a perda de água livre; o segundo é associado com a perda de glicerol ou outro agente plastificante, componente de menor peso molecular e água ligada; enquanto no terceiro estágio ocorre a perda de compostos de maior peso molecular.

CAPITULO 4
MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos referentes aos artigos 1, 2 e 3 foram realizados no Laboratório de Compostos Bioativos, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As análises de microscopia eletrônica realizadas juntos ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) – UFRGS e a análise térmica no Laboratório de Altas Pressões e Materiais Avançados (LAPMA) - UFRGS.

Os experimentos referentes ao artigo 4 foi realizado juntos ao Departamento de Ciências Agrárias, de Alimentos e Agro-Ambiental da Universidade de Pisa – Itália, com supervisão da professora Dr^a Annamaria Ranieri durante a realização do doutorado sanduíche no período de junho de 2014 a fevereiro de 2015.

4.1 PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

4.1.1 Nanopartículas de Ouro (AuNPs)

A dispersão aquosa de nanopartículas de ouro foi obtida através da parceria existe com o Laboratório de Sólidos e Superfícies Pertencentes ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Utilizando-se como estabilizante um silsesquioxano iônico divalente contendo grupo orgânico o 1,4-diazoniabicyclo [2.2.2] octano e como contra-íon o cloreto, sintetizado tal como descrito por ARENAS *et al.*, (2008). Para a preparação de nanopartículas de ouro, uma solução aquosa (30 mL) contendo 600 mg de silsesquioxano iônico foi misturado com 7,5 mL de solução de ácido cloroáurico ($5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ HAuCl}_4$). A esta mistura foi adicionado, sob agitação, 30 mL de solução de borohidreto de sódio $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, recentemente preparada; esse reagente é também conhecido como tetraidroborato de sódio (NaBH_4). A dispersão coloidal aquosa formada, de nanopartículas de ouro estabilizadas por meio do silsesquioxano iônica foi designado por AuNPs. Para comparação com a dispersão de AuNPs, uma solução de referência foi preparada, sem adição de metal (HAuCl_4) e designada como branco.

4.1.2 Nanocápsulas de Bixina

As nanocápsulas de bixina utilizadas neste trabalho foram preparadas pela técnica de Deposição de Polímero Pré-Formado, de acordo com o método descrito no trabalho de

mestrado de LOBATO *et al.*, (2013), que foi desenvolvido junto ao Laboratório de Composto Bioativos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS. O padrão de bixina (pureza de 98,7 %) foi extraído de sementes de urucum (*Bixaorellana*) como descrito por LOBATO, (2013). Os reagentes poly- ϵ -caprolactone (PCL) e sorbitanomonostearato (Span 60) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) o triglicéridecapríco/caprílico (CCT) e o polissorbato 80 (Tween 80) da Delaware (Porto Alegre, Brasil).

Para obtenção das nanocápsulas pesou-se 0,4 mg do padrão de bixina em um béquer de vidro e adicionou-se 60 mL de acetona e 7,5 mL de etanol e esta mistura foi colocada em banho de ultrassom por 10 minutos ao abrigo da luz. Paralelamente, outra solução foi preparada composta de 250 mg do polímero poly- ϵ -caprolactone (PCL), 400 μ L do triglicéridecapríco/caprílico (capric/caprylic triglycerides - CCT) e 95 mg de sorbitanomonostearato (Span 60). Ambas as soluções foram então misturadas e permaneceram sob agitação mecânica por 10 minutos a 40 °C, sendo esta mistura denominada de fase orgânica. Esta fase orgânica foi adicionada a uma fase aquosa composta de 130 mL de água milli-Q e 195 mg de Tween 80 e a mistura foi realizada lentamente e sob agitação constante. A dispersão foi concentrada em rota evaporador até volume final de 25 mL. A concentração de bixina utilizado neste trabalho foi de $16,92 \pm 0,16$ mg mL⁻¹; concentração ótima relatada por LOBATO *et al.*, (2013) para assegurar a estabilidade das nanocápsulas.

4.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMIDO E FARINHA DE QUINOA

4.2.1 Obtenção do Amido de Quinoa

O amido de quinoa utilizado neste experimento foi extraído de grãos de quinoa (*Chenopodium quinoa* W) provenientes da Bolívia adquiridos no comércio de Porto Alegre (RS). A extração foi realizada de acordo com metodologia descrita por ARAUJO-FARRO *et al.*, (2010), onde, inicialmente, os grãos de quinoa foram lavados com água corrente, com a finalidade de remover as saponinas; após lavagem, foram imersos em água destilada na proporção de 1:2 (quinoa:água) e mantidas em refrigeração por aproximadamente 8 horas, com a finalidade de intumescer o grânulo de amido. A suspensão de quinoa e água foram trituradas em liquidificador doméstico (ARNO Mod.wwB3 400W, Brasil), e a pasta resultante foi peneirada (80, 150 mesh) e lavada com água destilada. O material que passou através da peneira foi centrifugado (1000 G / 15 min / 4 °C) (HITACHI, CR 21GIII, Ibaraki, Japão) e o sobrenadante foi removido. Este procedimento foi realizado por mais três vezes. Com a

finalidade de solubilizar as proteínas, a pasta de amido foi ressuspensa em solução de NaOH 0,20 % (p/p) e o pH ajustado para 10,5, suavemente, agitada durante 5 min; novamente, centrifugado e o sobrenadante descartado. Após este processo a pasta foi ressuspensa em água destilada e o pH neutralizado com solução de HCl 1 M. Para remover ao máximo todo resíduo de proteína e sais formados pela neutralização. O amido foi, novamente, ressuspensa em água destilada, centrifugado e o sobrenadante descartado; este procedimento foi repetido por mais cinco vezes. O amido purificado foi congelado (-80 °C), liofilizado e armazenado sob refrigeração para posterior caracterização e utilização no preparo dos filmes.

4.2.2 Obtenção da Farinha de Quinoa

Para obtenção da farinha de quinoa (*Chenopodium quinoa* W), foram utilizados os mesmos grãos obtidos no comércio de Porto Alegre (RS) e provenientes da Bolívia. Após lavagem dos grãos em água corrente para remoção das saponinas, os mesmos foram secos em estufa com circulação de ar forçada (DeLeo B5AFD, Brasil) a 40 °C por 24 h. A farinha foi produzida por moagem dos grãos em moinho de bancada (Arbel, modelo MGR90, Brasil). A farinha resultante foi peneirada em peneiras metálicas com abertura de 150 mesh; o material que passou pela peneira foi embalado a vácuo e armazenado para posterior caracterização e preparo dos filmes.

4.2.3 Caracterização do Amido e Farinha de Quinoa

A caracterização do amido e da farinha de quinoa foi realizada de acordo com os métodos da AOAC (2005). O teor de umidade foi analisado pelo método gravimétrico, através de pesagem da amostra antes e após secagem em estufa (modelo TE-394/2, Tecnal, Brasil) a 105 °C por 24 h. O teor de proteínas foi determinado pelo método de Kjeldahl ($N \times 6,25$ %). Um extrator Soxhlet (modelo 2055, FossSoxtec, Denmark) foi utilizado para analisar o teor de lipídeos e o teor de cinzas foi determinado em mufla (modelo 312.6SO ML1729, Elektro ThermLinn, Alemanha) a 550 °C. As fibras totais foram determinadas através do Kit enzimático gravimétrico da Aldrich (Kit Total DietaryFiber, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). O teor de carboidratos foi calculado por diferença, ou seja, subtraindo-se a partir de 100 a soma dos valores de umidade, proteína, lipídeos, cinzas e fibras alimentares. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em gramas por 100 g em base seca (BS).

4.3 ELABORAÇÃO DOS FILMES

4.3.1 Filmes de Amido Quinoa contendo nanopartículas de ouro

Os filmes de amido de quinoa foram produzidos através da técnica *casting* como descrito por FAKHOURI *et al.*,(2013). A solução filmogênica foi preparada com uma suspensão de 4 % (p/p) de amido (4 g / 100 g de solução filmogênica). A dispersão foi aquecida em banho-maria (DeLeo B450) até 82 °C durante 30 minutos, com agitação constante por meio de um agitador mecânico para gelatinização total do amido. Após a gelatinização 1 % (p/p) de glicerol foi adicionado à solução filmogênica e agitado por mais 5 minutos. A partir desta formulação padrão, 5 formulações de filmes foram preparadas. O filme padrão (formulação padrão), filmes contendo a dispersão de nanopartículas de ouro (AuNPs) nas concentrações de 5 % (v/v) (AuNPs5) e 2,5 % (v/v) (AuNPs2,5) e filmes controle contendo a solução de referência, sem adição de metal (HAuCl₄) nas concentrações de 5 % (v/v) (C5) e 2,5 % (v/v) (C2,5). As soluções filmogênicas foram então espalhadas sobre placas de acrílico na quantidade de 0,24 g cm⁻². Os filmes foram secos numa estufa com circulação forçada de ar (DeLeo, modelo B5AFD, Brasil) a 35 °C durante 16 h.

4.3.2 Filmes de Farinha de Quinoa Contendo Óleos Essências

Os filmes de farinha de quinoa contendo óleos essenciais foram preparados pelo método de *casting*. A solução filmogênica foi preparada com uma suspensão de 6 % de farinha de quinoa (6 g de farinha /100 g de solução de formação de película). A suspensão foi homogeneizada durante 30 minutos a 50 °C em banho-maria (DeLeo, B450, Brasil) para solubilização das proteínas (Figura 7); em seguida foi aquecido até temperatura até 82° C com agitação leve durante 30 minutos para gelatinização do amido. A solução filmogênica foi resfriada até 40 °C; e foram adicionados lentamente sob agitação em homogeneizador (Ultra Turrax T25 DS1, dispersor S25N, IKA®, Alemanha) o plastificante (glicerol, 1 % p/p solução filmogênica) e óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) (selecionados de acordo com o teste preliminar) nas concentrações de 0% (controle), 0,5%, 1 % e 2 % (p/p). Em seguida, 0,24 g cm⁻² da solução filmogênica foi vertida, uniformemente, sobre placas de acrílico e secas em estufa com circulação forçada de ar (DeLeo B5AFD, Brasil) a 35° C durante 16 h.

Figura 7 Suspensão de farinha de quinoa em banho-maria para solubilização das proteínas e posterior gelatinização do amido



4.3.3 Filmes de Amido com Nanocápsulas de Bixina

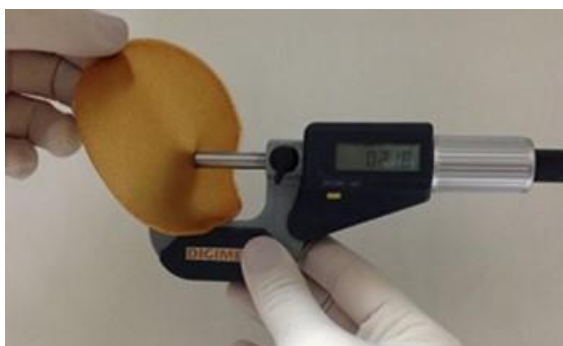
Os filmes de amido contendo nanocápsulas de bixina foram elaborados com amido de mandioca (Yoki Alimentos S/A, Brasil) e produzidos através da técnica de *casting* como descrito por FAKHOURI *et al.*, (2013). A solução filmogênica foi preparada com uma suspensão de 4 % (p / p) de amido (4 g/100 g de solução filmogênica). A dispersão foi aquecida em banho-maria (DeLeo B450) até 82 °C durante 30 minutos, com agitação constante por meio de um agitador mecânico para gelatinização total do amido. Após a gelatinização, o glicerol foi adicionado à solução filmogênica na concentração de 0,25 g/g de amido e agitado por mais 5 minutos. A esta solução filmogênica padrão, diferentes concentrações da solução contendo nanocápsulas de bixina foram adicionadas levando em consideração a quantidade total de amido; obtendo assim os filmes B2%, (0,5 g/g), B5% (1,25 g/g), B8% (2 g/g) e B10% (2,5 g/g). As soluções filmogênicas foram vertidas, uniformemente, sobre placas de acrílico (0,24 g cm⁻²) e secas em estufa com circulação de ar forçado (DeLeo, B5AFD, Brsil) a 35 °C durante 16 horas.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

4.4.1 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada com um micrômetro digital (modelo IP40, Digimess, Brasil) com escala de 0-25 mm e precisão de 0,001mm (Figura 8). Os valores representam a média de três filmes e cinco medidas feitas, aleatoriamente, ao longo de cada filme avaliada.

Figura 8 Análise de espessura efetuada em micrômetro digital



4.4.2 Umidade

O conteúdo de umidade foi determinado de acordo com a AOAC (2005), através de método gravimétrico. Discos com 2 cm de diâmetro foram cortados e pesados em recipientes metálicos previamente tarados. Foi utilizada estufa com circulação e renovação de ar (modelo TE-394/2, Tecnal, Brasil) a 105 °C, as capsulas foram matinas na estufa até peso constante (base seca) por 24 horas.

4.4.3. Solubilidade

A solubilidade em água dos filmes foi realizada em triplicata, após a avaliação da umidade, visto que para sua determinação as amostras devem estar secas. No mesmo recipiente metálico, contendo os discos de filmes com 2 cm de diâmetro, foram adicionadas de 30 mL de água destilada (Figura 9), e agitadas, lentamente, por 24 horas e a 25 °C em banho-maria com agitação horizontal (modelo NT145, Novatecnica, Brasil). Após este período, a água do recipiente foi retirada e filtrada, a fim de, averiguar a presença de

fragmentos de filme solúveis em água. O filtro utilizado foi pesado antes e depois de secagem (105 °C por 24 horas), e a diferença de peso foi utilizada no cálculo da solubilidade. Os recipientes com as amostras sem água foram, novamente, submetidos à secagem a 105 °C por 24 h, sendo pesados antes e após a desidratação do filme para determinar a massa da matéria seca que não se dissolveu em água. A solubilidade foi calculada usando a Eq. (1).

$$S\% = 100[(w_i - w_f) / w_i] \quad (1)$$

Onde w_i é o peso seco inicial da amostra (g) e w_f é o peso seco final da amostra (g) após ter permanecido 24 h sob agitação nas capsulas com 30 mL de água destilada.

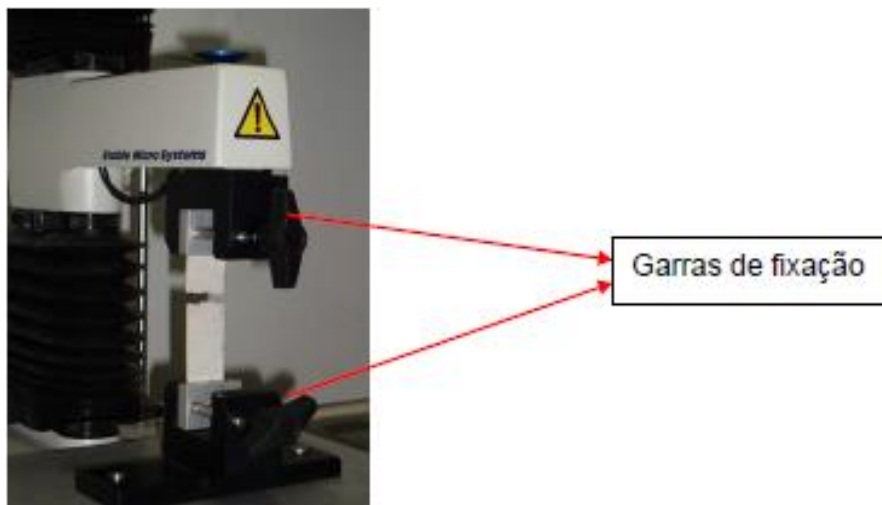
Figura 9 Análise de solubilidade dos filmes em água



4.4.4 Propriedades Mecânicas

A resistência à tração, a porcentagem de alongação na ruptura e o Módulo de Young foram determinadas em texturômetro (Figura 10) TA-XT2 (Stable Micro Systems, Reino Unido), com operação de acordo com o método padrão ASTM D882-12, a 25 °C, com separação inicial das garras de 50 mm e velocidade do probe de 0.8 mm s⁻¹. Os filmes foram recortados em retângulos com o auxílio de estilete (100 mm × 25 mm) e dez tiras de cada amostra foram analisadas (ASTM, 20012).

Figura 10 Texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems, Reino Unido).



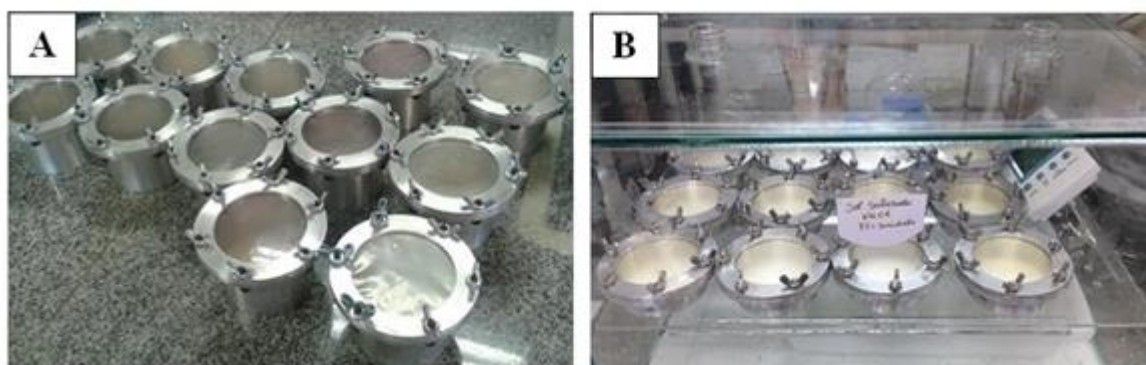
4.4.5 Permeabilidade ao vapor de água

A avaliação da permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes foi baseada no método padrão ASTM E96-05, descrito por (MEI *et al.*, 2013), com algumas modificações. Os filmes foram fixados em células de permeação de alumínio (diâmetro interno: 63 milímetros; altura: 25 mm) com CaCl_2 anidro granular (Figura 11A) e mantidos em cuba de vidro (Figura 11B). A temperatura foi mantida a 25 °C, a fim de, alcançar gradiente de umidade relativa de 0/75 (0 % na parte interior as células e 75 % na região interior a cuba), mantido por uma solução saturada de cloreto de sódio. O ganho de massa das células foi acompanhado por gravimetria a intervalos de 2 h, 4 h, 8 h, e 24 h, onde cada célula foi pesada em balança analítica (modelo AY, Shimadzu, Japão). A PVA foi calculada usando a Eq. (2).

$$PVA = w \cdot L / A \cdot t \cdot \Delta p \quad (2)$$

Onde: w é a massa de água permeada através do filme (g), L é a espessura do filme (pode ser utilizada em mm ou m), A é a área de permeação (m^2), t é o tempo de permeação (pode ser usado em dias / horas / segundos), e Δp é a diferença de pressão de vapor entre os dois lados do filme (Pa ou KPa).

Figura 11 Células de permeação de alumínio (A) e cuba de vidro de vidro contendo solução saturada de NaCl (UR 75 %)

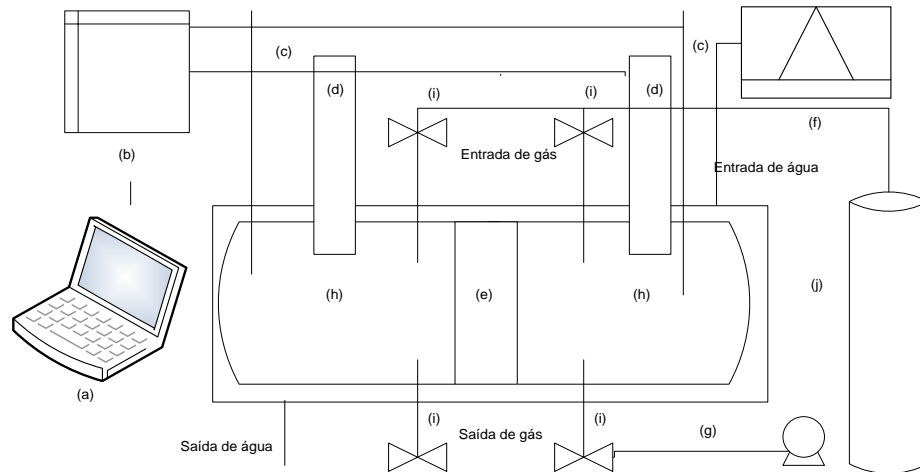


4.4.6 Permeabilidade a Gás

A medida de permeabilidade a gases foi realizada apenas para os filmes de amido de quinoa contendo a solução de nanopartículas de ouro (AuNPs), no Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. O dispositivo montado para medir a permeabilidade dos filmes foi desenvolvido pelo próprio laboratório no trabalho de mestrado de TOSATI (2013), de acordo com as normas da Sociedade Americana de Testes e Materiais (*American Society for Testing and Materials - ASTM D1434* (ASTM, 2009) que estima de transferência de gás de filme em estado estacionário. A Figura 12 mostra o dispositivo montado para medir permeabilidade de filmes. O sistema é totalmente de aço inox, o controle do gás é realizado por quatro válvulas tipo agulha (Swagelok tube fitting) e a temperatura monitorada por termopares tipo “J” colocados em ambos os compartimentos. A transmissão de dados de pressão é informada por um transdutor de pressão piezoresistivo em uma câmara, tipo WTP 4010- Industrial, (Wärmer), com precisão de 0,1 % e faixa de medida de 1 a 3 bar, e em outra câmara um transdutor de pressão digital (Velki), com precisão de 0,01% e faixa de medida de 0 a 6 bar. O sistema é encamisado para o controle da temperatura com um banho termostático. Internamente, há duas placas porosas para suporte da membrana com tamanho de poros entre 5 a 10 μm , e dois anéis de borracha para fazer a vedação. As duas câmaras têm as mesmas dimensões com um volume total de cada compartimento é de 6,57 cm^3 , e uma área de transferência de 6,88 cm^2 . Os termopares e transdutor da Wärmer são ligados em um sistema de aquisição de dados, (Agilent Technologies 34972), que fornece a temperatura em graus Celsius e a pressão em voltagem, onde a conversão de voltagem é 2,5V correspondentes à 1bar. O transdutor da marca Velki tem um programa Control Center Series (CCS30) que

apresenta o resultado na escala de pressão desejável. A célula possui entrada para os gases utilizados no presente estudo: oxigênio (99 %) e gás carbônico (99,9 %).

Figura 12 Desenho do aparato montado para medir a permeabilidade de gás de filmes: (a) computador; (b) aquisição de dados; (c) termopares; (d) transdutor de pressão; (e) filme e suporte para o filme. (f) banho termostático; (g) bomba á vácuo; (h) compartimentos.



A amostra foi selada entre as duas câmaras com dois anéis de borracha para evitar o vazamento para o meio externo. De um lado contém o gás específico a uma maior pressão e do outro lado, menor pressão. Após a selagem do filme (e) entre os compartimentos com o auxílio das placas porosas, as válvulas (i) eram abertas por 1 minuto para fazer a limpeza do sistema. Logo após deixou-se os dois compartimentos (h) à pressão atmosférica, e em um dos lados do compartimento era retirado o gás com uma bomba a vácuo (g) e no outro deixado com fluxo contínuo para manter a pressão constante. A permeação do gás no lado de baixa pressão é indicada com o aumento da pressão através do transdutor (d). Essa medida fornece um resultado estimado do gás puro através do filme (e). O coeficiente de permeabilidade foi obtido a partir de um balanço de massa de O_2 e CO_2 , na câmara inferior a pressão medida pelo transdutor de pressão e utilizando a Eq. (3).

$$P_{2(n+1)} = P_1 - (P_1 - P_{2i}) \exp\left(-\frac{A \cdot R \cdot T \cdot t \cdot P_e}{V \cdot l}\right) \quad (3)$$

Onde: A é a área permeável (m^2), V é o volume da câmara (metros cúbicos), t é o tempo (s), R a constante dos gases ($m^3 Pa K^{-1} mol^{-1}$), T a temperatura do gás dentro a câmara (K), L a espessura do filme (μm), P_e é a permeabilidade ($mol \mu m^2 s^{-1} Pa^{-1}$), $p_2 (n + 1)$ a pressão no tempo (Pa), P_1 é a pressão de fluxo constante (Pa) e P_{2i} é a pressão na câmara de

pressão inferior (Pa). Para fazer o ajuste da permeabilidade foi desenvolvida uma rotina no software Matlab (R2011b).

4.4.7 Propriedades Ópticas

4.4.7.1 Cor

A cor dos filmes foi determinada através de colorímetro (modelo CR-300, MinoltaCo. Ltd, Japão) (Figura 13), operando à luz do dia com D65. Os parâmetros de cor $CIEL^*a^*b^*$ foram utilizados, onde L^* é a luminosidade, com variação de 0 (preto) a 100 (branco); a^* , do verde (-) ao vermelho (+); e b^* , do azul (-) ao amarelo (+). A diferença de cor em comparação ao padrão foi calculada com a Eq. (4).

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

Onde: ΔL^* , Δa^* Δb^* representam as diferenças entre os parâmetros de cor do filme e um disco branco padrão ($L_0^* = 97.5$, $a_0^* = 0.13$ and $b_0^* = 1.7$).

Figura 13 Colorímetro (modelo CR-300, Minolta Co. Ltd, Japão)



4.4.7.2 Opacidade

A Opacidade foi determinada pela medida da absorbância dos filmes em espectrofotômetro (modelo UV-1800, Shimadzu, Japão) (Figura 14). Para uma visão geral do comportamento dos filmes, os mesmos foram submetidos a uma varredura nos comprimentos de onda entre 200 nm (região UV) e 700 nm (região visível). Os filmes foram cortados em um retângulo (4 cm × 1 cm), alojados diretamente na célula de teste do equipamento e uma célula vazia foi utilizada como referência e branco.

A opacidade dos filmes foi calculada dividindo-se os valores da absorbância (nm) pela espessura da película (mm). Para isso, dois comprimentos de onda devem ser selecionados, a fim de avaliar a absorção de luz dos filmes tanto na região UV (280 a 350 nm) como na região visível (500 a 700 nm). Os resultados foram obtidos em $A \text{ mm}^{-1}$.

Figura 14 Espectrofotômetro (modelo UV-1800, Shimadzu, Japão)



4.4.8 Estabilidade Térmica

Amostras de filme foram submetidas a um analisador termogravimétrico (modelo TGA-50, Shimadzu, Japão) (Figura 15) a fim de avaliar sua estabilidade térmica. Para isso, pequenas quantidades da amostra foram colocadas no dispositivo apropriado dentro do equipamento e pesadas, periodicamente, durante o intervalo da análise para avaliar a taxa de perda de peso que acompanhou o avanço da temperatura. O equipamento operou a uma taxa de $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, desde temperatura ambiente até atingir $600 \text{ }^\circ\text{C}$. Nitrogênio foi usado como gás de purga.

Ao final, a perda de peso foi calculada pela porcentagem (%) em relação ao peso inicial das amostras e um gráfico de temperatura ($^\circ\text{C}$) por perda de peso (%) foi plotado (TONGNUANCHAN *et al.*, 2015).

Figura 15 Analisador termogravimétrico



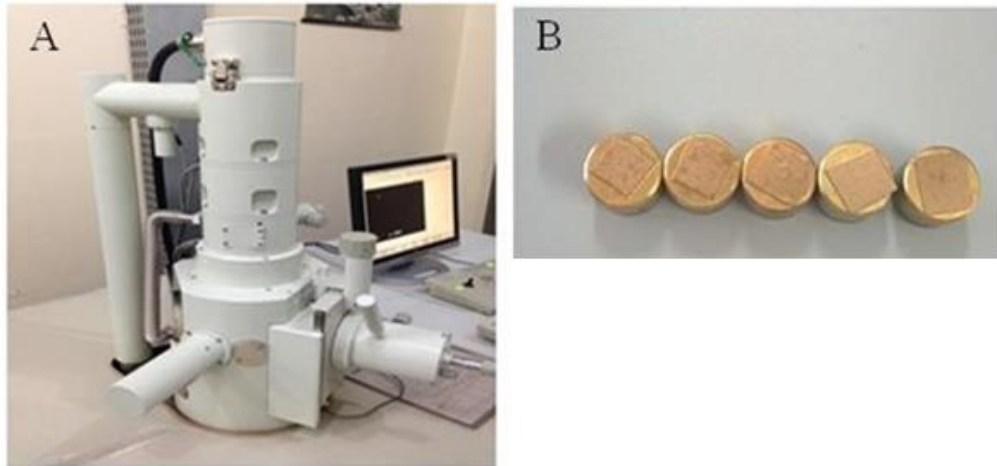
4.4.9 Propriedade Estrutural

A caracterização das propriedades estruturais dos filmes foi realizada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), junto ao Centro de Microscopia Eletrônica (CEM) da UFRGS.

4.4.9.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (JSM 6060, JEOL, Japão) (Figura 16A), onde uma pequena quantidade da amostra desejada foi fixada em *stubs* de alumínio com o auxílio de fita dupla-face (Figura 16B) e o conjunto foi recoberto por uma fina camada de ouro (metalização). As amostras foram analisadas em voltagem de 5 kV com magnitudes entre 500x a 1000x.

Figura 16 Microscópio eletrônico de varredura (A) e *stubs* de alumínio com os filmes metalizados com ouro (B).



4.4.9.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As imagens da Microscopia Eletrônica de Transmissão foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão (JEM-1220, JEOL, Japão) (Figura17), operado a uma voltagem de aceleração de 80 kV. Os biofilmes foram cortados em pequenos pedaços e colocados em almofariz com N₂ líquido. Após a evaporação do líquido de N₂ os biofilmes foram triturados e dispersos em 10 mL de isopropanol em ultrassom durante 60 minutos. Duas gotas desta mistura foram colocadas sobre uma grelha de cobre revestida de carbono e posteriormente secas em temperatura ambiente.

Figura 17 Microscópio eletrônico de transmissão (JEM-1220, JEOL, Japão)



4.4.10 Atividade Antimicrobiana

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados no Laboratório de Enzimologia, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) - UFRGS.

4.4.10.1 Atividade antimicrobiana por contato

A atividade antimicrobiana os filmes de amido de quinoa com nanopartículas de ouro (AuNPs) e filmes controle foi realizada contra *Escherichia coli* (ATCC 25972) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 1901), de acordo com metodologia descrita por (LIAO *et al.*, 2010) com algumas modificações. Os microrganismos *E.coli* e *S.aureus* foram inoculadas em caldo triptona de soja (TSB, HiMedia, Índia) e incubadas a 37 °C durante 24 h até a fase de crescimento exponencial ser atingida. Após este período, 2 mL de cada estirpe bacteriana foi adicionada em eppendorfe centrifugada sob 3000g durante 15 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células bacterianas ressuspensas em solução salina (0,9 %) e os inócuos foram ajustados para 1×10^6 unidades formadora de colônias (UFC). O crescimento dos microrganismos foi monitorado por densidade óptica (DO_{600nm}) e por contagens de células viáveis. Os filmes foram cortados em pequenos pedaços (20 x 10 mm) e acomodados na parede interna de tubos eppendorf; em seguida, 500 µL das suspensões bacterianas foram adicionadas, separadamente, aos tubos contendo aos filmes com AuNPs e filmes controle. O material foi a incubação a temperatura ambiente (25 °C) durante 24 horas com agitação suave em agitador rotativo de cilindros (Mod: NI 1152, Nova Instruments, São Paulo, Brasil) (Figura 18). Após este período, 100µL das suspensões bacterianas foram transferidas, separadamente, para tubos contendo solução salina esterilizada para diluições seriada. Então, 10 µL de cada diluição foram espalhadas, uniformemente, sobre ágar triptona de soja (TSA, Hi Media, Índia). As placas foram incubadas a 37 °C durante 10 horas. As UFC sem cada uma das placas foram contadas e os resultados comparados. Cada teste foi executado em duplicata e o efeito antibacteriano em cada grupo foi calculado como porcentagem de inibição e calculado conforme Eq. (5):

$$\% \text{ inibição} = \frac{(UFC \text{ padrão} - UFC \text{ teste})}{UFC \text{ padrão}} \times 100 \quad (5)$$

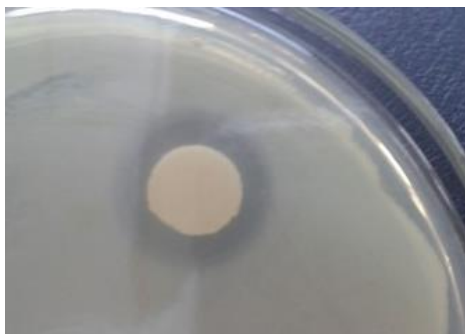
Onde: *UFC padrão* é o número de colônias que cresceram nos tubos contendo filmes elaborados apenas com amido de quinoa (filme padrão); *UFC teste* é o número de colônias que se desenvolveram nos filmes ativos contendo AuNP e dos filmes controle.

Figura 18 Agitador rotativo de cilindros

4.4.10.2 Atividade Antimicrobiana por difusão em ágar

A análise da atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em ágar também conhecido por método de halo de inibição, foi realizada de acordo com metodologia proposta por JOUKI *et al.*, (2014), contra cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25972) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 1901); para os filmes de farinha de quinoa contendo óleos essenciais. Cepas de *E. coli* e *S. aureus* foram inoculadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI, Hi Media, Índia) e incubadas a 37 °C durante 24 h. Após este período 100 µL das suspensões bacterianas foram transferidas, separadamente, para tubos contendo solução salina esterilizada para diluições seriada e contagem de UFC mL⁻¹ e outro 100 µL da suspensão foram espalhados na superfície de placas contendo ágar triptona de soja (TSA, Hi Media, India) com auxílio de alça de drigalski. Os filmes elaborados com farinha de quinoa e com os óleos essenciais foram cortados em círculos com 10 mm de diâmetro e acomodados na superfície do ágar; incubados a 37° C por 24h. Após tempo de incubação o diâmetro da zona de inibição em torno dos discos de película com a superfície do ágar (Figura 19) foi medido, com auxílio de um paquímetro e a área total calculada. A área da zona inteira foi calculada por subtração da área do disco do filme e esta diferença foi relatada como a zona de inibição em mm². Observou-se também a atividade antimicrobiana por inibição de contato, ou seja, mesmo sem a presença de uma zona de inibição clara, se a película inibiu o crescimento microbiano na superfície de contato com o disco de película de ágar.

Figura 19 Halo de inibição formado pelo filme com a superfície do ágar



4.4.11 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante dos filmes foi medida pelo método de oxidação lipídica como descrito por IAHNKE *et al.*, (2015). Para isso, os filmes foram cortados em retângulos de 10 × 5 cm, dobrados e selados (Modelo F 200 Flash, Fastvac, São Paulo, Brasil), em ambas as extremidades. A parte superior foi mantida aberta até que 7 g de óleo de girassol sem antioxidantes artificiais foram adicionados (Figura 20). Como controle o óleo de girassol foi embalado em garrafas de plástico fechadas (PLA) chamado de controle fechado e colocado em placas de Petri de vidro abertas (VID), chamado de controle aberto. As amostras e os controles foram mantidos por 13 dias a temperatura de 35 ± 2 °C, 75 % UR e expostos à luz fluorescente com uma intensidade de 900-1000 lux (Luxometer, modelo MS6610, V & R Instrument, Sahngai, China). Amostras de óleo foram coletadas após 3, 6, 9, e 13 dias de experimento para determinar o índice de peróxidos (IP) de acordo com a AOCS (1993). Os resultados foram expressos em miliequivalentes de oxigênio por quilograma de óleo (mEq.kg^{-1}) e comparados com o padrão de *Codex Alimentarius*, que estabelece valor inferior a 10 mEq kg^{-1} para amostras de óleo frescas.

Figura 20 Óleo de girassol embalado em filmes biodegradáveis



4.5 ELABORAÇÃO E APLICAÇÃO DAS COBERTURAS

Para elaboração da cobertura utilizou como matéria prima, quitosana (Galeno SRL, Carmignano, Prato, Itália), ácido láctico e polissorbato 20 (Tween 20, Sigma Aldrich, Itália); a mesma foi aplicada sobre tomates (*Solanum lycopersicum* L., cv *Sir Elyan*), provenientes da região de Poggiomarino, província de Nápoles, Itália.

4.5.1 Cobertura de Quitosana

Para o preparo da cobertura de quitosana, uma solução de ácido láctico 1 % (v/v) foi preparada e aquecida a 45 °C; a quitosana na concentração de 1,5 % (p/v) foi pesada, separadamente, e adicionada lentamente sob agitação magnética constante até sua completa dissolução (Figura 20). Após dissolução adicionou-se 0,1 % (v/v) de polissorbato 20 (Tween 20) e o pH da solução foi ajustado para 5,0 com NaOH 0,1M. A cobertura foi resfriada a 35 °C para sua aplicação.

Figura 21 Elaboração da cobertura de quitosana



4.5.2 Aplicação da cobertura de quitosana

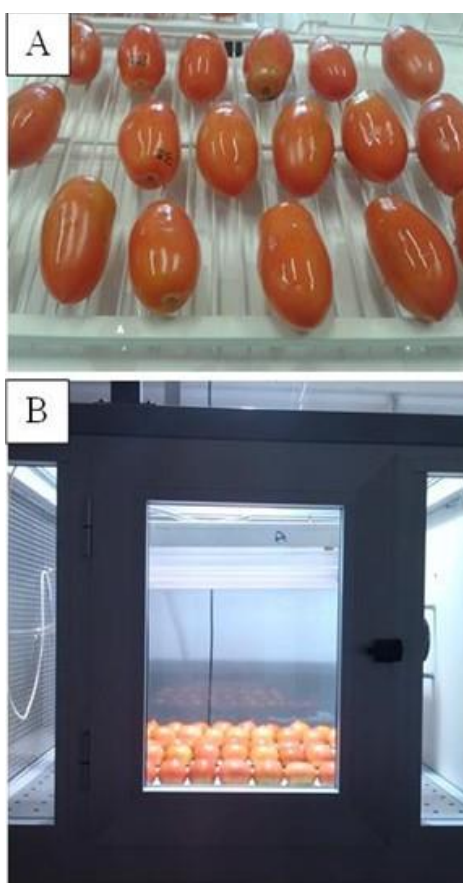
Após recepção dos tomates, os mesmos foram higienizados e secos, identificados, numericamente, e pesados com a finalidade de acompanhar a perda de peso. Os tomates foram imersos na solução da cobertura de quitosana durante 1 min, removidos e acomodados

sobre grades para secagem em temperatura ambiente (Figura 21A). Os frutos controle foram imersos em água destilada pelo mesmo tempo. Após secagem da cobertura, todos os frutos controle e revestidos foram armazenados em câmaras climatizadas (UR 85%) a 20 °C (Figura 21B).

Cinco frutos por tratamento foram coletados em diferentes tempos, 0 (T0), 4 (T1), 7 (T2), 11 (T3) e 14 (T4) dias, para determinação dos parâmetros de qualidade (perda de peso, textura, sólidos solúveis e acidez total titulável), taxa respiratória, polifenóis totais e flavonoides totais por espectrofotometria e perfil de carotenoides e flavonoides por HPLC.

As análises dos parâmetros de qualidade, taxa respiratória (CO₂) e emissão de etileno foram realizadas no dia de cada amostragem, para polifenóis, flavonoides totais e perfil de carotenoides e flavonoides as amostras foram liofilizadas e armazenadas (-80 °C).

Figura 22 Secagem dos frutos de tomate após aplicação da cobertura de quitosana (A) e câmaras climatizadas (UR 85% a 20 °C) (B).



4.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DAS FRUTAS

Em cada tempo de amostragem foram realizadas as medidas perda de peso, textura, sólidos solúveis totais e acidez total titulável. Para as análises de polifenóis e flavonoides totais por espectrofotometria e perfil de carotenoides e flavonoides por HPLC, as amostras foram congeladas com nitrogênio, liofilizadas e armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) para análises posteriores.

4.6.1 Perda de Peso

A perda de peso foi determinada por gravimetria com auxílio de balança analítica (AY 220, Shimadzu). A perda de peso, ao longo do período de armazenamento foi calculada pela Eq. (6).

$$\% \text{ perda de peso} = (w_i - w_f / w_i) \times 100 \quad (6)$$

Onde: w_i peso inicial dos frutos; e w_f peso final no dia de cada amostragem.

4.6.2 Textura

A textura dos frutos foi medida por penetrômetro digital com uma sonda de 8 mm (Modelo 53205; TR, Forlì, Itália), na zona equatorial em lados opostos de cada fruto, após a remoção de um pequeno disco de pele. Os valores foram expressos em newtons (N).

4.6.3 Sólidos Solúveis Totais

O teor de Sólidos Solúveis Totais (SST) foi medido em um refratômetro digital (Digital Brix Refractometer DBR 35) e expresso como porcentagem, de sólidos solúveis (%). A medição foi realizada no suco extraído dos frutos após sua trituração.

4.6.4 Acidez Total Titulável

Para a análise da Acidez Total Titulável (ATT), 10 mL de suco do fruto foram diluídos em 50 mL de água destilada e titulados com solução de NaOH (0,1 mol L⁻¹). A neutralização dos ácidos foi acompanhada pela viragem de pH (pH 8,2) utilizando um titulador automático

(Modelo T80/20; Schott, Mainz, Alemanha) (Figuras 24). Os resultados foram expressos como porcentagem de cítrico ácido (%).

Figura 23 Titulador automático e pHmetro para acompanhar viragem de pH (A) e processo de titulação (B)



4.6.5 Emissão de Etileno e Taxa Respiratória (CO₂)

A taxa respiratória (produção de CO₂) e de emissão de etileno, foram realizadas apenas para os frutos de tomates revestidos com as coberturas de quitosana, de acordo com o método descrito por PACIFICI *et al.*, (2013). Frutas saudáveis foram incubadas, individualmente, em frascos selados (1,2 L) à temperatura ambiente (22 °C) durante 30 min (Figuras 24). Decorrido o tempo, amostras foram retiradas com auxílio de uma seringa hipodérmica (2 mL) e em seguida injetadas em cromatógrafo gasoso (HP5890; Hewlett-Packard, Menlo Park, CA, EUA) equipado com um detector de ionização de chama (FID) e um detector de condutibilidade térmica (TCD), respectivamente, para etileno e CO₂, e coluna de aço inoxidável (150 × 0,4 cm de diâmetro interno, embalado com Hysep T; Agilent Technologies, Milão, Itália). A temperatura de coluna e do detector foi ajustada para 70 °C e 350 °C, respectivamente. Utilizou-se azoto como gás transportador com um fluxo de 30 mL min⁻¹ para etileno e 45 mL min⁻¹ para CO₂. A quantificação foi realizada contra um padrão externo e os resultados foram expressos numa base de peso fresco.

Figura 24 Frutos colocados em jarros herméticos para avaliação da evolução de gás carbônico e etileno



4.6.6 Extração e Quantificação de Flavonoides por HPLC

Os extratos foram realizados em triplicata a partir das amostras liofilizadas e congeladas. Aproximadamente, 0,5 g das amostras foram pesadas diretamente, em tubos de vidro com tampa e extraídos com 45 mL de uma mistura de metanol:água (80:20, v/v) e 0,1 % (p/v) de BHT (hidroxitoluenobutilado, Cario Erba, Rodano, MI, Itália) como antioxidante. A mistura foi colocada em banho de ultrassom durante 30 min e, em seguida, extraiu-se por mais 30 minutos em agitador magnético. Após este período, os tubos foram centrifugados (14000g / 15 min) a 4 °C e o sobrenadante foi recolhido e armazenado sob refrigeração. O procedimento de extração foi repetido por mais duas vezes. Os extratos obtidos foram reduzidos a 8 mL por evaporador rotatório e filtradas em filtro de 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Alemanha).

A separação foi realizada por um HPLC P4000 Spectra System, equipado com detector de arranjo de diodos UV 6000 LP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) utilizando uma coluna CL-18 RP Phenomenex Prodigy (5 µm de tamanho de partícula, 250 x 4,6 mm, Phenomenex Italia, Castel Maggiore, Itália). Os compostos fenólicos e flavonoides foram eluídos com fluxo de 1 mL/min utilizando; ácido fórmico a 5 % em água como solvente A e ácido fórmico a 5% em metanol como solvente B, de acordo com o seguinte gradiente: 0 min: 82 % de A, 18 % de B; 20 min: 76 % de A, 24 % B; 30 min: 58 % de A, 42 % B; 40 min: 39 % de A, 61 % de B, seguido de 5 min de reequilíbrio no estado inicial, antes da injeção seguinte.

O detector foi fixado em 340 nm. Os seguintes compostos foram quantificados: quercetina, rutina, campferol e os ácidos clorogênico, caféico e ferrúlico, utilizando curvas padrão de padrões comerciais (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO).

4.6.7 Extração e Quantificação de Carotenoides

Os carotenoides foram extraídos conforme metodologia descrita por (HEREDIA *et al.*, 2010). Inicialmente, para obtenção dos extratos, 0,5 g das amostras liofilizadas foram pesadas em tubos de vidros com tampo. Em seguida 6 mL da solução de extração compostas de metanol:acetona:hexano (1:1:1, v/v/v) foram adicionadas aos tubos. Os tubos foram acondicionados em banho de gelo com agitação magnética durante 30 min em local escuro.

Após os 30 minutos de agitação, adicionou-se aos tubos 2 mL de água milliQ, para permitir a separação de fases hidrofílicas e hidrofóbicas os tubos foram agitados por um minuto em agitador vortex; posteriormente, as amostras foram centrifugadas (5 min / 6.000 g). A fase de hexano superior (não polar) contendo os carotenoides foi recolhida em tubos de vidro graduado; e procedimento de extração repetido até que a descoloração total do sedimento. Os extratos combinados foram concentrados sob vácuo, o volume ajustado para 3 mL e em seguida filtrados através de filtros de 0,2 µm (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Alemanha) e, imediatamente, submetido a análise por HPLC.

A separação foi efetuada à temperatura ambiente por um HPLC P4000 Spectra System, equipado com detector de arranjo de diodos UV 6000 LP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) utilizando uma coluna CL-18 RP Phenomenex Prodigy (5 µm de tamanho de partícula, 250 x 4,6 mm, Phenomenex Itália, Castel Maggiore, Itália) (Figuras 26). Os pigmentos foram eluídos a um fluxo de 1 mLmin⁻¹, utilizando acetonitrila como solvente A e uma mistura de metanol / hexano / diclorometano (1:1:1 v/v) como solvente B, de acordo com o seguinte gradiente: 0 min: 82 % de A, 18 % de B; 20 min: 76 % de A, 24 % B; 30 min: 58 % de A, 42 % B; 40 min: 39 % de A, 61 % de B. A coluna foi deixada a reequilibrar em 82 % de solvente A durante 5 minutos antes da injeção seguinte. Os pigmentos foram detectados pela sua absorbância a 445 nm. A luteína, licopeno e β-caroteno foram quantificados usando curvas padrão de padrões comerciais (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO).

Figura 25 HPLC com detector de arranjo de diodos UV 6000 LP e coluna CL-18 RP



4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando ANOVA e teste de comparação de médias de Tukey ao nível de 5% de significância, através do programa Statistica 12.0 (Statsoft, São Paulo, Brasil).

CAPITULO 5
ARTIGOS CIENTÍFICOS

Neste capítulo serão apresentados os trabalhos referentes à Tese de Doutorado; foram escritos quatro artigos científicos, dos quais dois deles já foram publicados e os demais formatados para submissão.

Artigo 1 *Development of active biofilms of quinoa (Chenopodium quinoa W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity”*

Publicado na revista: *Food Chemistry*, vol.173, p.755–762, 2015.

doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.068;

Artigo 2 *Physical and Antimicrobial Properties of Quinoa Flour-Based Films Incorporated With Essential Oil*

Publicado na revista: *Applied Polymer Science*, vol.43311

doi: 10.1002/app.43311.

Artigo 3 *Synthesis of biodegradable films with antioxidant properties based on cassava starch containing bixin nanocapsules*

Formatado para submissão na revista: *Journal of Food Science and Technology*

Artigo 4 *Chitosan edible coating in delaying post-harvest ripening of tomato fruit*

Formatado para submissão na revista: *Postharvest Biology and Technology*.

ARTIGO 1 Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* w.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity

Abstract

Active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa*, W.) starch were prepared by incorporating gold nanoparticles stabilized by an ionic silsesquioxane that contains the 1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane chloride group. The biofilms were characterized and their antimicrobial activity was evaluated against *E. coli* and *S. aureus*. The presence of gold nanoparticles produces an improvement in the mechanical, optical and morphological properties, maintaining the thermal and barrier properties unchanged when compared to the standard biofilm. The active biofilms exhibited strong antibacterial activity against food-borne pathogens with inhibition percentages of 99% against *E. coli* and 98% against *S. aureus*. These quinoa starch biofilms containing gold nanoparticles are very promising to be used as active food packaging for the maintenance of food safety and extension of the shelf life of packaged foods.

Keywords: nanocomposite, antibacterial, food packaging, metal nanoparticles, quinoa starch.

1. Introduction

Interest in the maintenance and/or improvement of the quality of packaged products and the reduction of waste packaging has encouraged the exploration of new packaging materials, such as biodegradable films formulated with raw materials derived from renewable sources, called biofilms.

In recent years, many researchers focused on the production of edible films based on biopolymers, such as polysaccharides and proteins (Andreuccetti, Carvalho, Galicia-García, Martínez-Bustos, & Grosso, 2011; Kanmani&Rhim, 2014; Mei, Yuan, Wu, & Li, 2013; Nascimento, Calado, &Carvalho, 2012; Souza, Benze, Ferrão, Ditchfield, Coelho, &Tadini, 2012; Souza, Goto, Mainardi, Coelho, &Tadini, 2013). Starch, a renewable biopolymer consisting of amylose and amylopectin, is the most commonly used agricultural raw material for edible film manufacturing because it is inexpensive, relatively easy to handle, totally biodegradable, and widely available in nature from various sources, such as cereals, roots,

tubers (Nascimento et al., 2012), and more recently rediscovered pseudocereals, such as amaranth and quinoa (Araujo-Farro, Podadera, Sobral, & Menegalli, 2010).

The quinoa seed (*Chenopodium quinoa*, W) is a grain typically found in the South American Andean highlands. It is composed of significant amounts of starch (up to 80%), has an amylose content of 10 to 21 % (depending on the variety), and a small starch granule size (~1 μm), which are characteristics that allow its easier dispersion and thus make this starch a promising material for film (Araujo-Farro et al., 2010). This starch may be able to form transparent biodegradable edible films without any prior chemical treatment.

In order to maintain the quality of foods, it is necessary to select the correct materials and appropriate technologies for production of the packaging. Thus, current trends include the development of packaging that interacts with food. Many of these biofilms may be incorporated with different compounds aiming at providing specific properties; as a result, the resulting biofilms are called active biofilms or active packaging. The promising biofilms include biofilms with antimicrobial activity (Kechichian, Ditchfield, Veiga-Santos, & Tadini, 2010).

Nanocomposites with antimicrobial function are highly useful for the minimization of the growth of contaminant microorganisms during the processing or storage of food and thereby the extension of shelf life and improvement of food safety (Rhim, Wang, & Hong, 2013). One of the most widely studied nanocomposites used in antimicrobial food packaging is based on the incorporation of silver nanoparticles (AgNPs) into biofilms (Incoronato, Buonocore, Conte, Lavorgna, & Nobile, 2010; Llorens, Lloret, Picouet, Trbojevich, & Fernandez, 2012; Rhim et al., 2013; Yoksan & Chirachanchai, 2010). Other metallic nanocomposites, such as zinc oxide (Emamifar, Kadivar, Shahedi, & Soleimani-Zad, 2011), titanium oxide (Bodaghi et al., 2013), and copper (Cioffi et al., 2005), have also been incorporated in biofilms. However, as far as we know, the development of starch biofilms incorporated with gold nanoparticles as antimicrobial agent has not been previously described. The proposal for synthesis of gold nanoparticles in the present work is based on the reduction of gold salts in solution containing the ionic silsesquioxane as stabilizer. This stabilizer is essential for the nanoparticle synthesis additionally it contains quaternary ammonium groups that promote water solubility and are known for their inhibitory and antimicrobial effect making this system very promising in the preparation of bioactive films.

The mechanical properties of the films are also very important because these allow the handling, storage, and transport of the food without damage. It was reported that the incorporation of metal nanoparticles can affect the mechanical properties of the biofilms,

however a more precise approach of this influence is necessary. This evaluation is of highest importance, since fragile packages may be inappropriate for good food storage (Yoksan&Chirachanchai, 2010).

In this context, this work aims at developing a biodegradable biofilm of quinoa starch, with active packaging by the addition of gold nanoparticles (AuNPs) stabilized with an ionic silsesquioxane containing the organic group 1,4-diazoniabicyclo [2.2.2] octane chloride, and evaluating their physical, mechanical and microbiological properties.

2. Materials and Methods

2.1 Quinoa Starch Production

Quinoa starch was extracted from quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* W), acquired in the local market and was originally from Bolivia, glycerol (Merck), using the methodology developed by Araujo-Farro et al., (2010). The seeds were immersed in distilled water at a ratio of 1:2 and refrigerated for 8 h. The softened grain suspension was milled in a kitchen blender (ARNO Mod.wwB3 400W, Brazil), and the resulting suspension was removed by sieves (80, 150 *mesh*) and washed with distilled water. After, the material was centrifuged (1000 g / 15 min / 4 °C) (HITACHI High-Speed Refrigerated CR 21GIII, Ibaraki, Japan), and the supernatant was removed; this procedure was repeated three times. The starch was suspended in aqueous 0.20% (w/w) NaOH solution at an alkaline pH of 10.5, gently stirred for 5 min to solubilize the proteins, and centrifuged. The starch was redispersed in deionized water and neutralized by the addition of HCL 1 mol L⁻¹. Afterwards, the starch was centrifuged and redispersed in water 5 times to remove residual protein and salt. The purified starch was then frozen, lyophilized, and stored refrigerated until use.

2.2 Proximate Analysis of the Quinoa Starch

The contents of protein, ash, ether extractable lipids, total fiber, and water were determined using the standard AOAC methods AOAC (1995). The total protein content was determined by the Kjeldahl method using a correction factor of 6.25. The lipid content was determined using a Soxhlet extractor (Foss Soxtec, model 2055, Denmark). The ash content was determined in a muffle furnace (ElektroTherm Linn, 312.6 SO LM 1729, Germany) set to 550 °C. The moisture content was determined by maintaining the sample at 105 °C (Oven

DeLeo, model 48 TLK, Brazil) for approximately 4 h, and the measurement was determined through the weight difference. The carbohydrate content was calculated by subtracting from 100 the sum of the percentages of water, protein, lipid, ash and dietary fiber. All of the analyses were performed in triplicate. The results are expressed as grams per 100 g of dry matter (DM).

2.3 Obtaining a Gold Nanoparticle Dispersion

The aqueous gold nanoparticles dispersion was obtained using as stabilizer a ionic silsesquioxane containing the divalent 1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane chloride group, synthesized as described by Arenas et al., (2008), in laboratory of solid and surfaces belonging to the Chemical Institute of Federal University of Rio Grande do Sul. For the preparation of gold nanoparticles, aqueous solution (30 mL) containing 600 mg of ionic silsesquioxane was mixed with 7.5 mL of 5×10^{-3} mol L⁻¹ HAuCl₄. To this mixture, it was added 30 mL of 0.02 mol L⁻¹ NaBH₄ freshly prepared, always under stirring. The aqueous colloidal dispersion of gold nanoparticles, stabilized by ionic silsesquioxane was designated by AuNPs. For comparison with AuNPs dispersion, a reference solution, without metal addition, was also prepared, and it was designated as blank.

2.4 Preparation of Starch Quinoa Biofilms

The biofilms were produced through the casting technique (Fakhouri et al., 2013). The film-forming solution was prepared with a suspension of 4 % starch from quinoa (4 g / 100 g of total film solution). The dispersion of quinoa starch was gelatinized at 82 °C for 30 min with constant stirring in a water bath (DeLeo B450). Glycerol was then added to a concentration of 1 %, and the resulting mixture was considered the standard formulation. Five types of biofilms were produced: standard film (film with starch only), biofilms containing 5% (v/v) of gold nanoparticles dispersion (AuNPs5) and 2.5% (v/v) of gold nanoparticles dispersion (AuNPs2.5), and two control biofilms containing 5% (v/v) (C5) and 2.5% (v/v) (C2.5) of the blank solution. An amount of 0.24 g cm⁻² of the film-forming solution was then poured evenly onto acrylic plates. The biofilms were dried in an oven with forced air circulation (DeLeo, model B5AFD, Brazil) at 35 °C for 16 h.

2.5 Characterization of Quinoa Starch Biofilms

The quinoa starch biofilms were characterized by the determination of their mechanical properties, solubility, optical properties (color and opacity), gas permeability, and water vapor permeability, morphology and thermal stability. The biofilms were conditioned in desiccators under 58 % RH at 25 °C for 48 h before being subjected to analyses (Pelissari, Andrade-Mahecha, Sobral, & Menegalli, 2013).

2.5.1 Mechanical properties

The biofilms were cut into strips (100 mm - 25 mm), and their thickness was measured using a digital micrometer (DIGIMESS Precision 0.001 mm, resolution / 0 mm ~ 25 mm, Brazil) at five random positions in each strip. The tensile strength (TS) [MPa] and percent elongation at break (E) [%] were evaluated through a tensile test performed on a texture analyzer (TA.XT2i e Stable Micro Systems, UK) with a load cell of 5 kg using the A/TGT self-tightening roller grips fixture, according to ASTM D882-012. Ten strips were cut, and each one was mounted between the grips of the equipment for testing; the initial distance between the grips and the test speed were set to 50 mm and 0.8 mm s⁻¹, respectively (Souza et al., 2013).

2.5.2 Water vapor permeability (WVP)

The WVP was determined gravimetrically according to the method described by (Mei et al., 2013) with some modifications. The samples were placed in permeation cells (inner diameter = 63 mm, height = 25 mm) filled with granular anhydrous calcium chloride and hermetically sealed. The permeation cells were placed in a glass chamber with a saturated sodium chloride solution to obtain RH gradients of 0 / 75 % at 25 °C. The mass gain was determined by weighing the cell permeation on an analytical balance (AY 220, Shimadzu) at intervals of 1 h during the first 24 h period and of 12 h after 24 h. The water vapor permeability of the samples was determined in triplicate using Eq. 1:

$$\text{Eq (1): } WVP = w \cdot L / A \cdot t \cdot \Delta p$$

Where: w is the weight of the water that permeated through the film (g), L is the thickness of the film (m), A is the permeation area (m²), t is the time of permeation (h), and Δp is the water vapor pressure difference between the two sides of the film (Pa).

2.5.3 Solubility

The solubility was calculated as the percentage of dry matter in the film solubilized after immersion for 24 h in water at 25 °C. Discs of the film (2 cm in diameter) were cut, weighed, immersed in 30 mL of distilled water, and slowly and periodically agitated. The amounts of dry matter in the initial and final samples were determined by drying the samples at 105 °C for 24 h. The solubility was calculated using Eq. (2) (Pelissari et al., 2013).

$$\text{Eq. (2): } S\% = 100[(w_i - w_f)/w_i]$$

Where: w_i is the initial dry weight of the sample (g), and w_f is the final dry weight of the sample (g).

2.5.4 Optical properties (color and opacity)

The opacity was determined by measuring the film absorbance at 210 and 500 nm using a UV spectrophotometer (Shimadzu UV-1800). The biofilms were cut into a rectangle and directly placed in a spectrophotometer test cell. An empty test cell was used as the reference. The opacity of the biofilms was calculated by dividing the values of the absorbance (nm) by the thickness of the biofilm (mm) (Wang, Dong, Men, Tong, & Zhou, 2013).

The color of the biofilms was determined with a colorimeter (Hunter Lab system, model Miniscan XE, USA) operated with D65 (daylight) and using the CIELab color parameters. The parameters L^* (luminosity), a^* (red-green), and b^* (yellow-blue) were determined. A white disk ($L_0^* = 97.5$; $a_0^* = 0.13$ and $b_0^* = 1.7$) was used as the standard. The color difference (ΔE) compared with a white standard was calculated using Eq. (3) (Rotta et al., 2009).

$$\text{Eq. (3): } \Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Where: $\Delta L^* = L^* - L_0^*$, $\Delta a^* = a^* - a_0^*$, $\Delta b^* = b^* - b_0^*$, where L_0^* , a_0^* , and b_0^* are the color values of the standards, and L^* , a^* , and b^* are the biofilm color values.

2.5.5 Gas permeability

The experimental setup used to measure the film permeability was designed and built in the lab scale. The apparatus is stainless and composed of a cylinder, manual on/off valves, micrometric valves, and two closed chambers, and the temperature and measured pressure are controlled by transducers. The measurements were performed using the method of the American Society for Testing and Materials (ASTM D1434). The sample was mounted in a

gas transmission cell to form a sealed semi-barrier between the two chambers. One chamber contains the test gas at a specific high pressure, and the other chamber, which is maintained at a lower pressure, receives the permeating gas. Either of the following procedures was used: (1) the lower pressure chamber was initially evacuated, and the transmission of the gas through the film was indicated by an increase in the pressure; or (2) the high pressure chamber was maintained near atmospheric pressure, and the transmission of the gas through the film was indicated by a change the pressure. The coefficient of permeability was obtained from a mass balance for O₂ and CO₂, in chamber the lower pressure measured by pressure transducer and using Eq. (4).

$$\text{Eq. (4):} \quad P_{2(n+1)} = P_1 - (P_1 - P_{2i}) \exp\left(-\frac{A.R.T.t.P_e}{V.l}\right)$$

Where: A is the permeable area (m²), V is the chamber volume (m³), t is the time (s), R is the gas constant (m³ Pa K⁻¹ mol⁻¹), T is the gas temperature inside the chamber (K), l is the film thickness (μm), P_e is the permeability (mol μm m⁻² s⁻¹ Pa⁻¹), $P_{2(n+1)}$ is the pressure at time (Pa), P_1 is the pressure under constant flux (Pa), and P_{2i} is the pressure in the lower-pressure chamber (Pa). The routine program used the software Matlab (R2012a).

2.5.6 Scanning electron microscopy (SEM)

SEM images were obtained for standard film, AuNPs5 and AuNPs2.5. The biofilms were cut and pasted in a double sided conducting tape on an aluminum support and coated with a thin film of platinum using a Balted SCD 050 Sputter Coater apparatus (Scotia, New York, USA). The images were obtained using a scanning electron microscope, model JSM 5800 LV, JEOL (Tokyo, Japan), connected to a secondary electron detector with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). The micrograph was obtained with a magnification of 1000× operating at an accelerating voltage of 5 kV. Several images were taken from various parts of the solid phase, to assure the reproducibility of final image taken as representative of the whole sample.

2.5.7 Transmission electron microscopy (TEM)

TEM images of AuNPs5 and AuNPs2.5 were recorded using a JEOL JEM-1220 microscope, operated at an acceleration voltage of 80 kV. The biofilms were cut into small pieces and placed in a vessel containing liquid N₂. After evaporation of the liquid N₂ the biofilms were crushed, dispersed into isopropanol, using ultrasound for 60min., and two drops

of this mixture were used to place onto a carbon-coated Cu grid, followed by drying at ambient conditions.

2.5.8 Thermogravimetric analysis

The thermogravimetric analysis of the biofilms was performed under argon flow on a Shimadzu Instrument model TGA-50 2, with a heating rate of 10 °C min⁻¹, from room temperature up to 600 °C.

2.6 Antimicrobial Activity

The antimicrobial activity of the biofilms with metal nanoparticles was tested against the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* (ATCC 25972) and Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 1901) according to the methodology proposed by Liao, Anchun, Zhu, & Quan, (2010) with some modifications. Firstly, the microorganism were inoculated in TSA broth, and incubated at 37 °C / 24 h, until the exponential growth phase was reached. After centrifuged and resuspended in saline solution (0.9 %). For the assay, the antimicrobial activity of each bacterial the inoculum density was then adjusted to 1 x 10⁶ colony-forming units (CFUs mL⁻¹) in saline solution (0.9 %). The growth was monitored at 1 h intervals by O.D.600 nm and by viable cell counts. The biofilms were cut into squares of 20mm² and accommodated in eppendorf tubes. Then, 500 µL of the bacterial suspensions was applied to the biofilms with gold nanoparticles and to the control biofilm. After incubation for 24 h with gentle agitation, an aliquot of 100µL the bacterial suspensions were transferred separately into tubes containing sterilized saline solution to obtain serial dilutions of the suspensions, and the resulting mixtures were vigorously mixed. Then, 10 µL of the bacterial solutions from the mixtures were spread evenly on TSA (trypticase soy agar) medium agar plates. The plates were incubated at 37 °C in an aerobic Petri dish for 10 h. The viable cells on each of the plates were counted by quantifying the CFUs, and the resulting counts were compared. Each test was performed in duplicate. The antibacterial effect in each group was calculated as the percentage of inhibition, which was calculated using Eq. (5).

$$\text{Eq. (5):} \quad \% \text{ inhibition} = \frac{(\text{CFU standart} - \text{CFU experimental group})}{\text{CFU standart}} \times 100$$

2.7 Statistical Analysis

The results were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test at a significance level of 0.05 using the Statistica 10.0 software (STATSOFT Inc.).

3. Results and Discussion

3.1 Composition of Quinoa Starch

The extraction of starch using the proposed methodology yielded a material containing, approximately 11.39 ± 0.04 % moisture, and other constituents on a dry basis (db), 3.0 ± 0.03 % total fiber, 0.20 ± 0.001 % total ash, 0.02 ± 0.001 % total lipids, 1.3 ± 0.001 % total proteins and 95,5 % of carbohydrate.

3.2 AuNPs Aqueous Dispersion

Metal nanoparticles are thermodynamically unstable in solution and have a tendency to coalesce via particle-particle interactions during the preparation process, which demands the use of a stabilizer to avoid this interaction (de Menezes et al., 2012). The nanoparticles used in this study were stabilized with an ionic silsesquioxane containing the organic group 1,4-diazoniabicyclo [2.2.2] octane chloride bonded in a bridged way. This stabilizer is a silica based hybrid polymer that presents appreciable water-solubility and, in previous reports, it showed ability to stabilize gold nanoparticles (Nunes, Gushikem, Landers, Dupont, Costa, & Benvenuti, 2012). The concentration of ionic silsesquioxane was $15.6 \times 10^{-6} \text{ mol mL}^{-1}$, and the concentration of gold was $18.5 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$, in the form of nanoparticles. The AuNPs dispersion presents reddish color and a UV-Vis absorption spectrum is showed in Fig. 4 of Supplementary Material, showing a band with a maximum at 517 nm. The TEM image of nanoparticles dispersion is also showed in the Supplementary material Fig. 3. The nanoparticles presented spherical form and the average diameter of AuNPs, determined by Transmission Electron Microscopy (TEM), using Quantikov software, was of 5.5 nm with a standard deviation of 1.4 nm.

3.3 Biofilm Characterization

The Table 1 shows physical properties of the standard biofilm, control biofilms and biofilms containing gold nanoparticles (AuNPs2.5 and AuNPs5). It is possible to observe that thickness of all developed biofilms, was not significantly different ($p < 0.05$), ranging from 79.3 ± 5 to $86.7 \pm 1.5 \mu\text{m}$.

3.3.1. Mechanical properties

The mechanical properties of standard biofilm, control biofilms and biofilms containing gold nanoparticles are presented on Table 1. It is possible to observe that the developed biofilms show a significant increase ($p > 0.05$) in the tensile strength in relation to the standard biofilm, with control biofilms showing higher values than the biofilms containing AuNPs.

Table 1 Thickness, tensile strength (TS), elongation at break (E), water vapour permeability (WVP), and solubility of standard biofilm, control biofilms, and biofilms containing gold nanoparticles

	Thickness (μm)	(TS) [MPa]	(E) [%]	WVP ($\text{g mm/m}^2 \text{ h kPa}$)	Solubility (%)
Standard	86.7 ± 1.5^a	7.6 ± 0.6^d	5.2 ± 0.6^a	0.393 ± 0.054^a	21.51 ± 0.59^a
C5	88.3 ± 6.1^a	22.2 ± 1.1^a	2.7 ± 0.3^b	0.375 ± 0.040^a	8.22 ± 0.39^d
C2.5	85.3 ± 2.3^a	15.7 ± 0.9^b	2.7 ± 0.2^b	0.314 ± 0.083^a	14.76 ± 0.31^c
AuNPs5	80.3 ± 3.2^a	9.9 ± 0.7^c	3.0 ± 0.6^b	0.338 ± 0.015^a	18.75 ± 0.43^b
AuNPs2.5	79.3 ± 5.8^a	11.0 ± 0.9^c	3.1 ± 0.4^b	0.321 ± 0.058^a	17.90 ± 0.83^b

The results are represented as the means \pm standard deviation of the three repetitions for thickness, WVP and solubility and ten for TS e E. Values with the same superscript in the same column are not significantly different ($p < 0.05$), for the standard biofilm, control biofilms with concentrations of stabilizer 2.5 % (C2.5) and 5 % (C5), and biofilms containing gold nanoparticles with concentrations of 2.5 % (AuNPs2.5) and 5 % (AuNPs5).

The higher values for TS in the control biofilms can be attributed to the presence of the silsesquioxane polymer chain that are dispersed in the filmogenic solution and during the drying process of the biofilm they become randomly entangled with the quinoa starch chains, thus increasing the mechanical resistance of the biofilms. This effect has been very explored

in polymeric materials where silica based moieties were used as reinforcing fillers (Xiong, Tang, Tang, and Zou, 2008). It was observed a decrease in the TS for the biofilms containing gold nanoparticles, AuNPs2.5 and AuNPs5. This decrease was interpreted by taking into account that, in the presence of gold nanoparticles, the silsesquioxane polymer acts as stabilizer of the nanoparticles, being partially consumed in this task and consequently decreasing its availability in the initial filmogenic solution to perform the entanglement with the starch chains. No significant difference was observed ($p > 0.05$) between the AuNPs5 (9.9 ± 0.7 MPa) and AuNPs2.5 (11.0 ± 0.9 MPa) biofilms.

It was reported by Kanmani and Rhim, (2014) that the mechanical properties of gelatin biofilms containing silver nanoparticles resulted in a significant reduction ($p < 0.05$) in the TS from 35.0 ± 4.7 MPa for the biofilm standard to 26.9 ± 3.8 MPa. According to these authors, this change may be due to a reduction in the protein-protein interactions in the biofilms containing the nanoparticles. On the other hand, an inverse effect was reported when silver nanoparticles were incorporated into biofilms based on starch and chitosan ($p < 0.05$) in the TS from 66.8 ± 3.3 MPa for the standard biofilm to 74.6 ± 5.6 MPa for the biofilms containing the silver nanoparticles (Yoksan & Chirachanchai, 2010).

Therefore, the TS of the biofilms seem to depend on the polymer used in the filmogenic solution, on the stabilizers used for the metal nanoparticles and also on their relative concentration. The highest value of TS was obtained for the C5 biofilms (22.2 ± 1.1 MPa), and these values are comparable to those reported for other plastic biofilms in the literature, such as high-density polyethylene (HDPE - 22 to 23 MPa), low-density polyethylene (LDPE - 19 to 44 MPa), polypropylene (PP - 31 to 38 MPa), and polylactic acid biofilms (PLA - 47.6 to 53.1 MPa) (Rhim et al., 2013).

The assessment of the elongation percent E (%) (Table 1) revealed that all of the prepared formulations showed a significant decrease in this value when compared with the standard biofilm (5.2 ± 0.6 %); however, the values obtained for these prepared formulations did not differ significantly ($p > 0.05$), varying from 2.7 to 3.1 ± 0.6 %.

3.3.2 Water vapor permeability (WVP)

The standard biofilm formulated with quinoa starch showed a WVP of 0.393 ± 0.054 g mm m⁻² h⁻¹ kPa⁻¹ (Table 1), which is higher than that obtained by Araujo-Farro et al., (2010) for biofilms based on quinoa starch (0.204 ± 0.12 g mm m⁻² h⁻¹ kPa⁻¹). However, the value obtained in the present study was similar to values obtained by other authors for biofilms

produced with cassava starch: $0.307 \pm 0.00012 \text{ g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ (Nascimento et al., 2012) and $0.283 \pm 0.013 \text{ g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ (Souza et al., 2012).

The comparison of the WVP values of standard biofilms with those of biofilms with AuNPs and control biofilms revealed no significant differences ($p > 0.05$), demonstrating that the presence of silsesquioxane and AuNPs do not interfere with the WVP of the biofilms. On the other hand, it was reported a significant difference in the WVP between agar standard biofilm ($1.97 \pm 0.31 \times 10^{-9} \text{ g m m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) and the formulation obtained with the addition of silver nanoparticles ($1.47 \pm 0.01 \times 10^{-9} \text{ g m m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) (Rhim et al., 2013). Similar results were found by Kanmani and Rhim, (2014), where the control gelatin biofilm showed WVP of $3.02 \pm 0.14 \times 10^{-9} \text{ g m m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, and, after the addition of silver nanoparticles, there was a slight decrease to $2.97 \pm 0.01 \times 10^{-9} \text{ g m m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$.

The WVP values are essential for defining the possible packaging applications of biofilms. A material that is very permeable to water vapor may be suitable for the packaging of fresh products, whereas a slightly permeable biofilm may be useful for the packaging of dehydrated products (Sobral and Ocuno, 2000). In their attempt to develop biofilms composed of starch with different concentrations of potassium sorbate for the conservation of fresh pasta, Andrade-Molina et al., (2013) obtained WVP values varying from $6 \times 10^{-6} \text{ g m}^{-1} \text{ Pa}^{-1} \text{ day}^{-1}$ to $14 \times 10^{-6} \text{ g m}^{-1} \text{ Pa}^{-1} \text{ day}^{-1}$, which are similar to the average value obtained in this work after the appropriate unit conversion $8 \pm 0.3 \times 10^{-6} \text{ g m}^{-1} \text{ Pa}^{-1} \text{ day}^{-1}$.

3.3.3 Solubility

The biofilms produced with the dispersion containing the nanoparticles and the control biofilms exhibited a decrease in solubility compared with that of the standard biofilm ($21.51 \pm 0.59 \%$) (Table 1). Lower solubility values were obtained for biofilms C5 ($8.22 \pm 0.39 \%$) and C2.5 ($14.76 \pm 0.31 \%$). This behavior may be related to the highest TS values found for these formulations. It is possible that the entanglement between silsesquioxane and quinoa starch chains, which helped to improve the mechanical properties, resulted also in a decrease in the biofilm solubility.

The comparison of the solubility of biofilms composed of flour and starch from different botanical sources with the addition of different compounds is a challenge because the solubility is related to many factors, including the type of material used to form the polymer matrix, the type of interaction that occurs in the matrix, the plasticizer used, and the process conditions (Pelissari et al., 2013).

3.3.4 Optical properties (color and opacity)

The comparison of the optical properties of biofilms (Table 2) revealed that the main difference is that the biofilms prepared with AuNPs showed higher values of ΔE , 25.92 ± 1.33 and 13.01 ± 0.48 for AuNPs5 and AuNPs2.5, respectively, which are significantly different ($p < 0.05$) from those obtained for the standard and control biofilms. No differences were observed between the standard and control biofilms. Higher values of ΔE indicate biofilms with higher color intensity (Rotta et al., 2009). The ΔE value obtained for standard biofilm (5.35 ± 0.08) was higher than the ΔE value obtained by Araujo-Farro et al., (2010) for a biofilm composed of starch quinoa (1.33 ± 0.03). Rhim et al., (2013) developed biofilms of agar with silver nanoparticles and obtained a standard biofilm with ΔE value of 6.42 ± 0.49 , similar to the values obtained in the present work. These authors observed a significant increase ($p < 0.05$) in ΔE with the increase in the concentration of silver nanoparticles. The AuNPs5 and AuNPs2.5 biofilms also showed higher values of the parameter a^* (Table 2), indicating that they have a more reddish color compared with the standard and control biofilms.

Table 2 Optical properties of color and opacity of standard biofilms, control biofilms, and biofilms containing gold nanoparticles

	Color Parameters				Opacity ($A\text{ mm}^{-1}$)	
	L*	a*	b*	ΔE^*	210 nm	500 nm
Standard	96.09 ± 0.20^a	4.93 ± 0.05^c	-0.65 ± 0.21^a	5.35 ± 0.08^c	35.75 ± 1.99^d	1.86 ± 0.16^{abc}
C5	96.08 ± 0.10^a	4.95 ± 0.04^c	-0.48 ± 0.16^a	5.37 ± 0.07^c	36.93 ± 1.64^d	1.48 ± 0.05^{bc}
C2.5	96.26 ± 0.14^a	4.97 ± 0.02^c	-0.57 ± 0.10^a	5.43 ± 0.03^c	40.71 ± 1.63^c	1.43 ± 0.10^c
AuNPs5	92.23 ± 0.29^c	9.29 ± 0.40^a	-0.95 ± 0.09^a	25.92 ± 1.33^a	57.13 ± 1.04^a	2.44 ± 0.19^a
AuNPs2.5	93.99 ± 0.34^b	7.43 ± 0.18^b	-0.62 ± 0.09^a	13.01 ± 0.48^b	46.72 ± 0.52^b	2.14 ± 0.16^{ab}

The results are represented as the means \pm standard deviation. Values with the same letter are not significantly different ($p > 0.05$), for the standard biofilm, control biofilms with concentrations of stabilizer 2.5 % (C2.5) and 5 % (C5), and biofilms containing gold nanoparticles with concentrations of 2.5 % (AuNPs2.5) and 5 % (AuNPs5).

The UV-Vis absorption spectrum (400 -700 nm) of AuNPs5, AuNPs2.5 and showed absorption bands with maximum near 520 nm for AuNPs5 and AuNPs2.5, similar to the maximum obtained for aqueous dispersion precursor (Section 3.2). These values are typical of gold nanoparticles with diameter lower than 10 nm (de Menezes et al., 2012). The

characteristic color of these gold nanoparticles is due to collective oscillation of the electrons known as the localized surface plasmon resonance absorption (Willems and Duyn, 2007).

In the analysis of opacity (Table 2), high absorbance values indicate less transparency and a high degree of opacity. The evaluation of the opacity in the visible region (500 nm) revealed that, in a general way, all of the tested biofilms showed low absorbance values, indicating their high transparency and low opacity. However, the AuNPs5 and AuNPs2.5 biofilms exhibited slightly higher absorbance values, $2.44 \pm 0.19 \text{ A mm}^{-1}$ and $2.14 \pm 0.16 \text{ A mm}^{-1}$, respectively, demonstrating that the increase in the concentration of AuNPs leads to an increase in opacity. Wang et al., (2013) developed biofilms of chitosan using polyphenols as antioxidants and noted an increase in opacity with increasing concentrations of the antioxidants. These authors obtained values for the absorbance at 600 nm ranging from 0.489 ± 0.045 (standard biofilm) to 2.898 ± 0.158 for the maximum concentration of the antioxidant. In their evaluation of the opacity of biofilms composed of gelatin with different concentrations of silver nanoparticles through the analysis of the reading transmittance at 660 nm, Kanmani and Rhim, (2014) observed a similar effect: an increase in the concentration of silver nanoparticles caused a reduction in the transparency of the biofilm from $89.1 \pm 0.0\%$ for the standard biofilm to $49.6 \pm 0.1\%$ for the biofilm with the maximum concentration of silver nanoparticles.

As shown on the Table 2, the UV band at 210 nm exhibited higher absorbance values for biofilms containing gold nanoparticles, AuNPs5 and AuNPs2.5 when compared to the standard and control biofilms ($p < 0.05$). This result indicates that the biofilms containing the AuNPs are able to protect against UV radiation, which can accelerate the oxidation process of lipids.

3.3.5 Gas permeability

The gas permeabilities of the biofilms developed in this work were less than $50 \text{ cm}^3/\text{dia m}^2 \text{ atm}$ for CO_2 and less than $30 \text{ cm}^3/\text{day m}^2 \text{ atm}$ for O_2 , which is the minimum detection limit of the equipment used to quantify the permeation of gases. The quinoa starch biofilms developed by Araujo-Farro et al., (2010) exhibited an oxygen permeability value of $4.36 \text{ cm}^3/\text{day m}^2 \text{ atm}$, after the appropriate unit conversions. The presence of metal nanoparticles or nanocomposites in biofilms can lead to a greater reduction in permeability because such elements can be considered an extra barrier to the permeation of gases and thereby offer a delay in oxygen transport due to an increased tortuosity in the oxygen pathway. Biofilms with low oxygen permeability are very useful for food preservation

because oxygen can trigger or accelerate oxidation and facilitate the growth of aerobic microorganisms, thereby lowering food quality and shortening the shelf life. Strategies leading to an increase in the gas barrier properties include the use of active oxygen scavengers in the packaging sachets, labels, or the polymer layers and the use of passivenanocomposites (Llorens et al., 2012).

3.3.6 Morphological properties

The scanning electron microscopy (SEM) results (Fig. 1) show that, in the studied magnification (1.000×), the biofilms containing gold nanoparticles with concentration of 5 % - AuNPs5 (a), concentration of 2.5 % - AuNPs2.5 (b), standard biofilm (c) and the control films made with stabilizer only (Fig 5 of Supplementary Material) present compact and uniform structure without the presence of cracks or blistering. These results show that the addition of the gold nanoparticles and the stabilizer did not alter the morphological structure of the quinoa starch biofilms as far as we could observe by SEM at the magnification used. Similar structure was observed by Araujo-Farro et al., (2010) for quinoa starch biofilm. According to these authors, compact and uniform structure indicates a good interaction between the amylose, amylopectin, glycerol, and water in the biofilm.

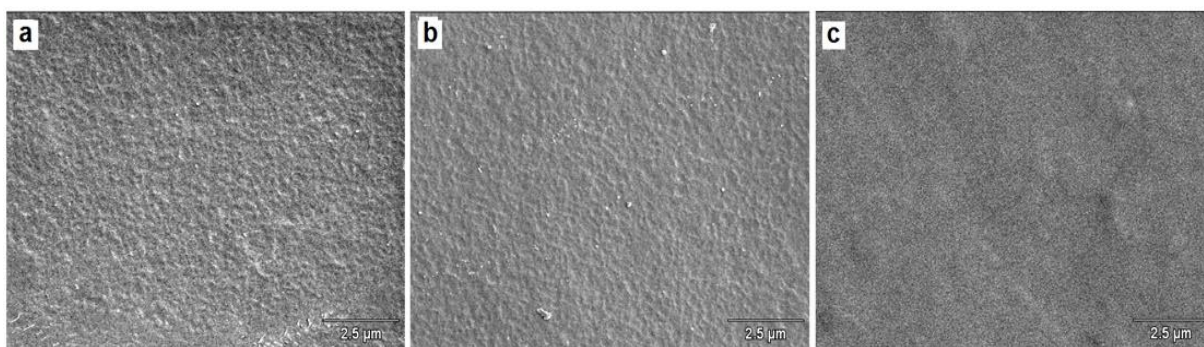


Fig. 1. Scanning Electron Microscopy (SEM) images of the biofilms containing gold nanoparticles with concentrations of 5 % - AuNPs5 (a), 2.5 % - AuNPs2.5 (b) and standard biofilm (c).

The Fig. 2 shows transmission electron microscopy (TEM) images obtained with magnification of 200.000×, for AuNPs5 and AuNPs2.5 biofilms. The gold nanoparticles exhibit contrast that allows their visualization. It is possible to observe that they are smaller than 10 nm and well dispersed, according to UV-Vis spectra.

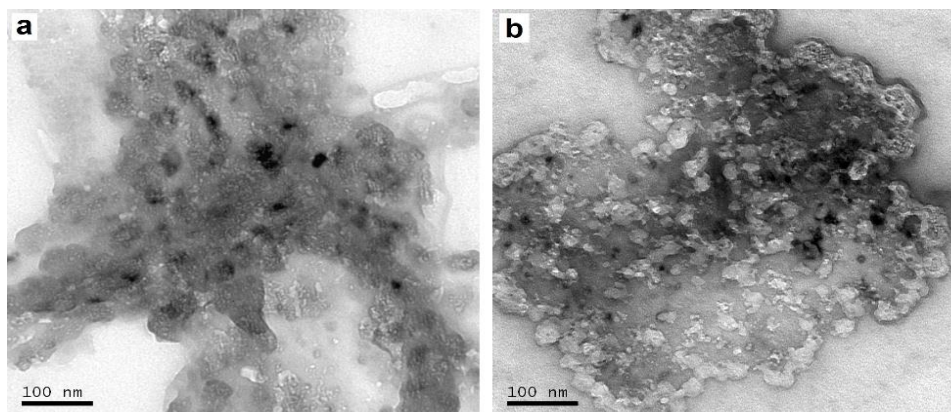


Fig. 2 Transmission Electron Microscopy (TEM) images of the biofilms containing gold nanoparticles with concentrations of 5 % - AuNPs5 (a) and 2.5 % - AuNPs2.5 (b).

3.3.7 Thermal stability

The biofilms were submitted to thermogravimetric analysis. The obtained curves are presented in the Fig. 3. It can be seen a weight loss from room temperature to 150 °C, which is assigned to the water desorption. The estimated water amount was near 10 %. The major weight loss occurs between 250 and 350 °C, for all samples, and it is ascribed to the organic phase desorption. Therefore, all biofilms show high thermal stability, at least, up to 270 °C. Similar results were obtained for gelatin biofilms containing silver nanoparticles (Kanmani and Rhim, 2014). It is also possible to observe that the residual weight was higher for the AuNPs2.5 and AuNPs5, since they should present silica inorganic moiety due to the residue of silsesquioxane decomposition.

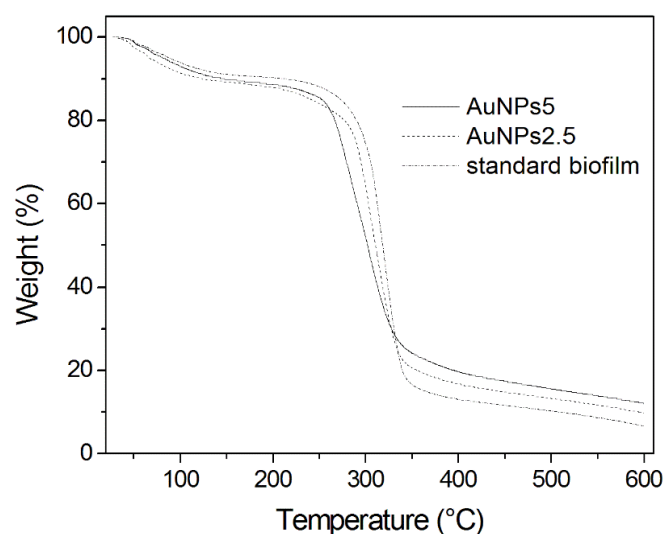


Fig. 3 Thermogravimetric Analysis (TGA) analyses of standard biofilms and biofilms containing gold nanoparticles with concentrations of 2.5 % (AuNPs2.5) and 5 % (AuNPs5).

3.4 Antimicrobial Activity

The antimicrobial activity of the biofilms is presented in Table 3. It was evaluated against the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 1901) and the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* (ATCC 25972). With the exception of the control biofilm that showed no antimicrobial activity and was considered as standard, all of the biofilms tested in the present study showed an inhibitory effect against the tested bacteria; however, higher rates of inhibition were observed with the biofilms containing the gold nanoparticles (AuNPs5 and AuNPs2.5), which exhibited inhibition rates of 99 % for *E. coli* and 98 % for *S. aureus*.

The analysis of the inhibition of the growth of *S. aureus* by the different biofilms revealed that the biofilms containing gold nanoparticles (AuNPs5 and AuNPs2.5) exert an inhibitory superior effect of approximately 30 % compared with that obtained for control biofilms, C2.5 and C5. This finding demonstrates the efficiency of the microbial inhibition of the biofilms containing gold nanoparticles against this Gram-positive microorganism. However, for the inhibition grown for *E. coli* (Gram-negative), the differences are not too pronounced (Table 3). Therefore, the control biofilms presented an appreciable anti-microbial activity without the presence of gold nanoparticles. This activity was attributed to the stabilizer structure that contains quaternary ammonium groups, which the activity was already reported by Schneid et al., (2014). Despite the low difference in the microbial inhibition between biofilms containing gold nanoparticles and the control biofilms, it is worth noting that the concentration of nanoparticles in the biofilms was lower than 0.06 % (w/w), demonstrating that low concentrations of gold nanoparticles have antimicrobial activity, particularly against *S. aureus*.

Table 3 Antimicrobial activity of biofilms containing gold nanoparticles and control biofilms against *E. coli* and *S. aureus*. The antimicrobial activity is represented by the percent growth inhibition.

	<i>S. aureus</i> (%)	<i>E. coli</i> (%)
Standard	0	0
AuNPs5	98	99
AuNPs2.5	98	99
C5	71	93
C2.5	70	96

Percentage inhibition of microbial for the standard biofilm, control biofilms with concentrations of stabilizer 2.5 % (C2.5) and 5 % (C5), and biofilms containing gold nanoparticles with concentrations of 2.5 % (AuNPs2.5) and 5 % (AuNPs5).

4. Conclusions

In the present work, active biofilms of quinoa starch, containing gold nanoparticles stabilized by an ionic silsesquioxane, were successfully obtained. The addition of gold nanoparticles dispersion to biofilms of quinoa starch was proven to be promising because it resulted in enhancements in the tensile strength, possibly due to the presence of the silicon based polymer stabilizer of gold nanoparticles. An increase in UV radiation absorption and a decrease in the solubility, which provides improved protection to packaged food and enlarging the possibilities of applications. The thermal stability of all biofilms is very impressive, near 270 °C. Additionally, the biofilms containing gold nanoparticles showed positive results concerning the antimicrobial activity, demonstrating their effectiveness in the inhibition of the growth of pathogens, particularly *S. aureus*. Therefore, such biofilms may be used as an active packaging system for food that would prolong the shelf life and maintain the quality of the packaged food during storage and distribution.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Pictures of the biofilms are presented in Figure 1, where it is possible to observe that the biofilms present integrity, and uniformity on the surface and in the color (Figure 1b) indicating that the gold nanoparticles was well distributed.

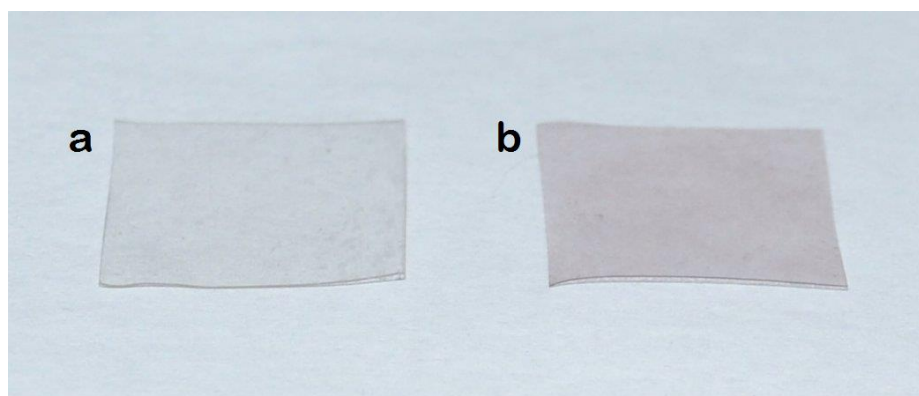


Fig. 1 Pictures of the biofilms

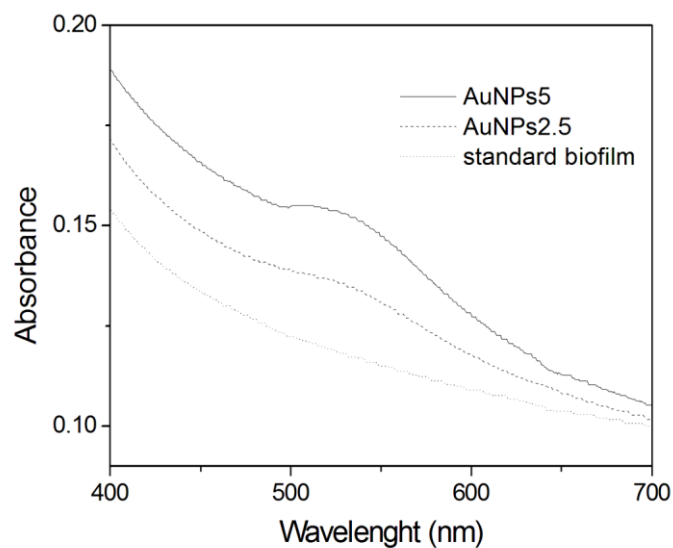


Fig. 2. UV-Vis absorption spectra of standard biofilms and biofilms containing gold nanoparticles with concentrations of 2.5 % (AuNPs2.5) and 5 % (AuNPs5).

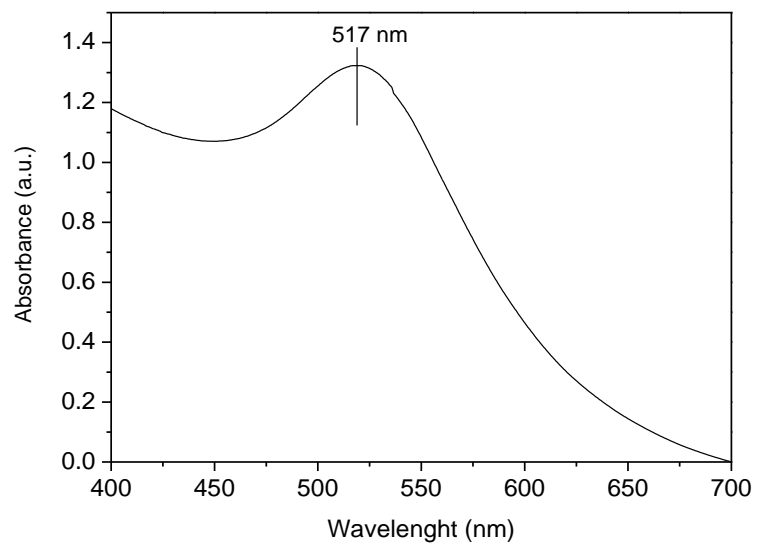


Fig. 3 UV-Vis spectrum of gold nanoparticle dispersion

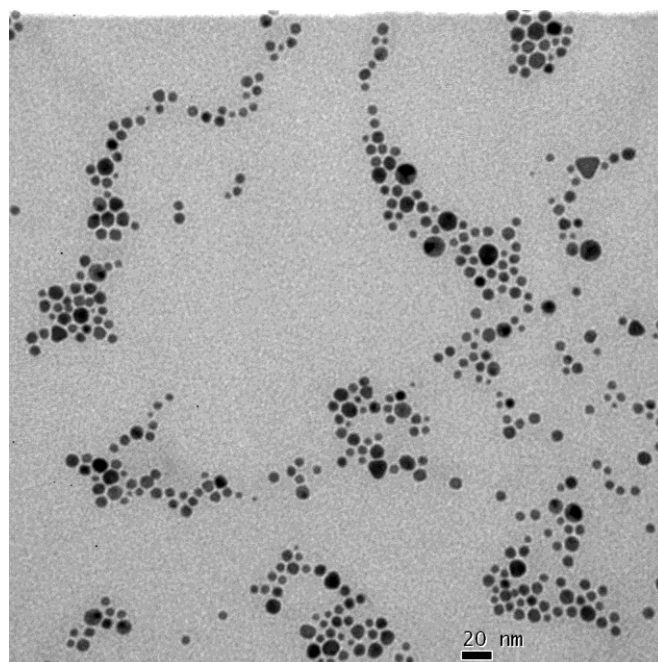


Fig. 4. TEM images of the gold nanoparticles dispersion with gold concentration of $18.5 \times 10^{-6} \text{ g m L}^{-1}$.

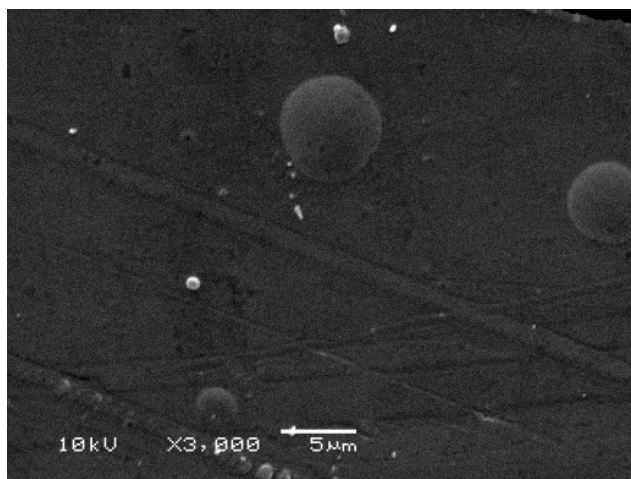


Fig 5. SEM images of the blank biofilms that is films with stabilizer only, without gold nanoparticles

References

- Ahmadi, R., Kalbasi-Ashtari, A., Oromiehie, A., Yarmand, M.-S., & Jahandideh, F. (2012). Development and characterization of a novel biodegradable edible film obtained from psyllium seed (*Plantago ovata* Forsk). *Journal of Food Engineering*, *109*(4), 745-751.
- Andreuccetti, C., Carvalho, R. A., Galicia-García, T., Martínez-Bustos, F., & Grosso, C. R. F. (2011). Effect of surfactants on the functional properties of gelatin-based edible films. *Journal of Food Engineering*, *103*(2), 129-136.
- Araujo-Farro, P. C., Podadera, G., Sobral, P. J. A., & Menegalli, F. C. (2010). Development of films based on quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willdenow) starch. *Carbohydrate Polymers*, *81*(4), 839-848.
- Arenas, L. T., Pinheiro, A. C., Ferreira, J. D., Livotto, P. R., Pereira, V. P., Gallas, M. R., Gushikem, Y., Costa, T. M. H., & Benvenuti, E. V. (2008). Anisotropic self-organization of hybrid silica based xerogels containing bridge positively charged 1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane chloride group. *Journal of Colloid and Interface Science* *318*, 96-102.
- ASTM. (2012). Designation D882-12: Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In *Annual book of ASTM standards*. Philadelphia: American Society 56 for Testing and Materials.
- Bodaghi, H., Mostofi, Y., Oromiehie, A., Zamani, Z., Ghanbarzadeh, B., Costa, C., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2013). Evaluation of the photocatalytic antimicrobial effects of a

- TiO₂ nanocomposite food packaging film by in vitro and in vivo tests. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 702-706.
- Cioffi, N., Torsi, L., Ditaranto, N., Tantillo, G., Ghibelli, L., Sabbatini, L., Bleve-Zacheo, T., D'Alessio, M., Zambonin, P. G., & Traversa, E. (2005). Copper Nanoparticle/Polymer Composites with Antifungal and Bacteriostatic Properties. *Chemistry of Materials*, 17(21), 5255-5262.
- Andrade-Molina, T. P., Shirai, M. A., Grossmann, M. V. E., & Yamashita, F. (2013). Active biodegradable packaging for fresh pasta. *LWT - Food Science and Technology*, 54(1), 25-29.
- Duncan, T. V. (2011). Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363(1), 1-24.
- Emamifar, A., Kadivar, M., Shahedi, M., & Soleimani-Zad, S. (2011). Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange juice. *Food Control*, 22(3-4), 408-413.
- Fakhouri, F. M., Costa, D., Yamashita, F., Martelli, S. M., Jesus, R. C., Alganer, K., Collares-Queiroz, F. P., & Innocentini-Mei, L. H. (2013). Comparative study of processing methods for starch/gelatin films. *Carbohydrate Polymers*, 95(2), 681-689.
- Incoronato, A. L., Buonocore, G. G., Conte, A., Lavorgna, M., & Nobile, M. A. (2010). Active systems based on silver-montmorillonite nanoparticles embedded into bio-based polymer matrices for packaging applications. *Journal of food protection*, 73(12), 2256-2262.
- Kanmani, P., & Rhim, J.-W. (2014). Physicochemical properties of gelatin/silver nanoparticle antimicrobial composite films. *Food Chemistry*, 148(0), 162-169.
- Kechichian, V., Ditchfield, C., Veiga-Santos, P., & Tadini, C. C. (2010). Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. *LWT - Food Science and Technology*, 43(7), 1088-1094.
- Liao, J., Anchun, M., Zhu, Z., & Quan, Y. (2010). Antibacterial titanium plate deposited by silver nanoparticles exhibits cell compatibility. *International journal of nanomedicine*, 5, 337-342.
- Llorens, A., Lloret, E., Picouet, P. A., Trbojevich, R., & Fernandez, A. (2012). Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 24(1), 19-29.

- Mei, J., Yuan, Y., Wu, Y., & Li, Y. (2013). Characterization of edible starch–chitosan film and its application in the storage of Mongolian cheese. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57(0), 17-21.
- de Menezes, E., Nunes, M. R., Arenas, L. T., Dias, S. L. P., Garcia, I. S., Gushikem, Y., Costa, T. M. H., & Benvenuti, E. V. (2012). Gold nanoparticle/charged silsesquioxane films immobilized onto Al/SiO₂ surface applied on the electrooxidation of nitrite. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 16(12), 3703-3713.
- Nascimento, T. A., Calado, V., & Carvalho, C. W. P. (2012). Development and characterization of flexible film based on starch and passion fruit mesocarp flour with nanoparticles. *Food Research International*, 49(1), 588-595.
- Nunes, M. R., Gushikem, Y., Landers, R., Dupont, J., Costa, T. M. H., & Benvenuti, E. V. (2012). Charged silsesquioxane used as a vehicle for gold nanoparticles to perform the synthesis of catalyst xerogels. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 63(2), 258-265.
- Pelissari, F. M., Andrade-Mahecha, M. M., Sobral, P. J. d. A., & Menegalli, F. C. (2013). Comparative study on the properties of flour and starch films of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). *Food Hydrocolloids*, 30(2), 681-690.
- Rhim, J. W., Wang, L. F., & Hong, S. I. (2013). Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 327-335.
- Rotta, J., Ozório, R. Á., Kehrwald, A. M., de Oliveira Barra, G. M., de Melo Castanho Amboni, R. D., & Barreto, P. L. M. (2009). Parameters of color, transparency, water solubility, wettability and surface free energy of chitosan/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. *Materials Science and Engineering: C*, 29(2), 619-623.
- Schneid A. C., Roesch, E. W., Sperb, F., Matte, U., da Silveira, N. P., Costa, T. M. H., Benvenuti, E. V. & de Menezes E. W. (2014). Silver nanoparticle–ionic silsesquioxane: a new system proposed as an antibacterial agent. *Journal of Materials Chemistry B* 2, 1079-1086.
- Sobral, P. J. d. A., & Ocuno, D. (2000). Water Vapor Permeability of Myofibrillar Protein Based Biofilms *Brazilian Journal of Food Technology*, 3, 5.
- Souza, A. C., Benze, R., Ferrão, E. S., Ditchfield, C., Coelho, A. C. V., & Tadini, C. C. (2012). Cassava starch biodegradable films: Influence of glycerol and clay nanoparticles

- content on tensile and barrier properties and glass transition temperature. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 110-117.
- Souza, A. C., Goto, G. E. O., Mainardi, J. A., Coelho, A. C. V., & Tadini, C. C. (2013). Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: Antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. *LWT - Food Science and Technology*, 54(2), 346-352.
- Taglietti, A., Diaz Fernandez, Y. A., Amato, E., Cucca, L., Dacarro, G., Grisoli, P., Necchi, V., Pallavicini, P., Pasotti, L., & Patrini, M. (2012). Antibacterial Activity of Glutathione-Coated Silver Nanoparticles against Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *Langmuir*, 28(21), 8140-8148.
- Wang, L., Dong, Y., Men, H., Tong, J., & Zhou, J. (2013). Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 35-41.
- Xiong, H., Tang, S., Tang, H., & Zou, P. (2008). The structure and properties of a starch-based biodegradable film. *Carbohydrate Polymers*, 71(2), 263-268.
- Yoksan, R., & Chirachanchai, S. (2010). Silver nanoparticle-loaded chitosan–starch based films: Fabrication and evaluation of tensile, barrier and antimicrobial properties. *Materials Science and Engineering: C*, 30(6), 891-897.

ARTIGO 2 Physical and Antimicrobial Properties of Quinoa Flour-Based Films Incorporated with Essential Oil

Abstract

Films of quinoa flour (*Chenopodium quinoa*, W) incorporated with oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils (EOs) at 0.5 %, 1 % and 2 % p/p were prepared to examine their physical and mechanical properties and antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The type of EO was not significant for the physical and barrier parameters of the films. The increase in the EOs concentration led to an increase in the elongation at break, but decrease in the tensile strength, Young's modulus, solubility and water vapor permeability. Films containing 1 % and 2 % EOs exhibited an inhibitory effect on the growth of *S. aureus* and *E. coli*. However, *S. aureus* was more sensitive to both EOs and the oregano was more efficient in the inactivation to both microorganisms. The incorporation of EOs as natural antibacterial agents may lead to their potential application as active packaging materials to increase food safety.

Keywords: essential oils, food preservation, edible film, natural antimicrobials

INTRODUCTION

The majority of packaging used by industry comes from non-degradable polymers, the increase in waste and the difficulty in recycling most of the available synthetic packaging, has led to increased research into the development of new biodegradable materials that are suitable for packaging.¹⁻³ The use of agricultural biopolymers for the development of edible and/or biodegradable films could be an alternative that could create new markets.⁴

Proteins and polysaccharides are well known for being good film formers. Protein films are characterized by good mechanical properties, although they are usually quite permeable to water and gases.⁵ Starch is the most widely employed polysaccharide for film production because it is naturally abundant and inexpensive. Starch films present good mechanical properties, but their sensitivity to moisture is a major drawback.^{6,7} To overcome this problem, researchers have turned to natural mixtures of starch, protein, lipids, and fibers, which can be obtained in the form of flour from raw plant materials, such as cereals and legumes.^{3,7-9} Several authors have reported the potential application of flours from whole

materials, such as amaranth,^{5,8,10,11} soy,^{2,12} wheat,^{13,14} rice,^{7,15} and achira flour,³ for film production.

The quinoa seed (*Chenopodium quinoa*, W) is a small grain (~3 mm diameter) found typically in the South American Andean highlands, and it is composed of significant amounts of starch (~80%), which has an amylose content of 10-21 % (depending on the variety).^{16,17} Quinoa is described as a seed with a high protein content of 12 to 23 % (depending on the variety) and a highly recommendable amino acid balance for human consumption.¹⁸ Moreover, quinoa presents a balanced content of lipids and fiber, making this grain highly promising for the development of biodegradable edible films for applications in the food industry.

In addition to the significant use of non-biodegradable packaging, another problem confronting the food industry is food spoilage, which is caused by microbial contamination. Studies have demonstrated that antimicrobial agents could be effective for reducing the levels of foodborne organisms when incorporated into packaging films.¹⁹ Packaging that contain biodegradable polymers have the possibility of being carriers of different additives, such as antimicrobial, antioxidant, nutraceuticals and flavorings agents.²⁰ The use of biodegradable edible films containing antimicrobials has been demonstrated as a useful stress factor tool to protect foodstuff against spoilage flora and to decrease the risk of pathogen growth.²¹

Essential oils (EOs) from many aromatic spices (oregano, thyme, salvia, parsley, clove, coriander, garlic and onion) have natural antimicrobial and antioxidant properties that could potentially extend the shelf life of food.^{19,20,22-25} However, the effect of these active components on the structure and functionality of the films should be evaluated.²⁶ Therefore, the combination of production technologies for biodegradable packaging with active antibacterial technologies may be a good alternative to lengthen the shelf life and improve the quality and safety of food.²⁴

The aim of this work is to develop and characterize biodegradable/edible quinoa flour films and to analyze the effect of essential oil incorporation on the mechanical, optical, and barrier properties and on the antimicrobial activity.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The films were formulated with flour Quinoa (*Chenopodium quinoa* W), which was acquired in the local market and was originally from Bolivia, glycerol (MERCK®) as plasticizer and essential oils of were rosemary (*Rosmarinus officinalis*), cloves (*Eugenia caryophyllata*), oregano (*Origanum vulgare*. L), sage (*Salvia officinalis*) and thyme (*Thymus vulgaris* L) that were acquired from Verbhena® from Rio Grande do Sul, Brazil.

Quinoa Flour Production and Proximate Composition

The grains were first washed at least four times in an excess of deionized water to remove the saponins that cover the quinoa seeds, which are totally soluble in water.¹⁶ Afterward, the grains were dried in an oven with forced air circulation (DeLeo B5AFD, Brazil) at 40 °C for 24 h. The quinoa flour was produced by grinding the seeds using a benchtop mill (Arbel, model MGR90, Brazil). The resulting flour was sifted on 150 mesh sieves and used for the preparation of the films. The protein, ash, lipid, total fiber, and water contents were determined using standard AOAC methods (AOAC, 1995). The carbohydrate content was determined by the difference. The moisture content was determined by desiccation of the sample in an oven at 105 °C (DeLeo, model TLK 48, Porto Alegre, Brazil). All of the analyses were performed in triplicate, and the results are expressed as grams per 100 g of flour in dry matter (DM).

Selection of Essential Oils

The selection of essential oils (EOs) to be used in the films was determined by preliminary tests. The tested EOs were rosemary (*Rosmarinus officinalis*), cloves (*Eugenia caryophyllata*), oregano (*Origanum vulgare*. L), sage (*Salvia officinalis*) and thyme (*Thymus vulgaris* L). Antimicrobial activity of the oils was tested by the filter paper disc diffusion method,²³ culture of *Staphylococcus aureus* (ATCC 1901) with 10⁶ CFU ml⁻¹ was spread on Trypticase Soy Agar (TSA, HiMedia, India) (0.1 mL/plate). One sterile 10 mm diameter filter paper disc was placed in the center of inoculated plate and 10 µl of EOs was carefully

pipetted onto it. All of the plates were incubated at 37 °C for 24 h, and the results were visually observed for the zone of inhibition.

Film Preparation

The films were prepared using the casting method. The film-forming solution was prepared with a suspension of 6 % quinoa flour (6 g / 100 g of film-forming solution), and then it was homogenized for 30 min. at 50 °C to solubilize the protein. The solution was then heated to the processing temperature of 82 °C with gentle stirring for 30 min in a water bath for gelatinization of starch. The film-forming solution was cooled to 40 °C, and the plasticizer (1 % w/w film solution) and essential oils (selected according to preliminary test) in concentrations of 0 % (control), 0.5 %, 1 % and 2 % (w/w), was added stirred for 5 min in homogenizer (Ultra Turrax T25 DS1, disperser S25N - 25G, IKA® Germany / Deutschland). Then, 0.24 g cm⁻² of the film-forming solution was poured evenly onto acrylic plates. The films were dried in an oven with forced air circulation (DeLeo B5AFD, Brazil) at 35 °C for 16 h.

Film Characterization

The thickness of the films was measured with a digital micrometer (DIGIMESS Precision: 0.001 mm, resolution: 0 mm ~ 25 mm, Brazil). To determine the mechanical properties, solubility and water vapor permeability, the film samples were pre-conditioned at 25 °C and 58 % relative humidity.¹

Mechanical properties

The films were cut into strips (80 mm x 25 mm), and the thickness was measured using a micrometer (Precision: 0.001 mm, resolution: 0 mm - 25 mm) at five random positions on each strip. The tensile strength (TS) [MPa], percent elongation at break (EB) [%] and Young's modulus (YM) [MPa] were evaluated using a tensile test performed on a texture analyzer (TA.XT2i e Stable Micro Systems, UK) with a load cell of 5 kg and using an A/TGT self-tightening roller grip fixture, according to ASTM D882-12.²⁹ Ten strips were cut, and each one was mounted between the grips of the equipment for testing. The initial distance between the grips and the set test speed were 50 mm and 0.8 mm s⁻¹, respectively.

Water Solubility

The moisture content (MC) of films was determined by oven-drying at 105 ± 2 °C for 24 h, and it is expressed as the percentage of the initial film weight lost during drying. The solubility was calculated as the percentage of dry matter in the film that was solubilized after immersion in water. Film discs (2 cm in diameter) were cut and weighed in metal capsules, and then added to 30 mL of distilled water, and placed in shaking water bath (Mark DGM, São Paulo, Brazil) and slowly and periodically agitated in speed 1 (30 cycles per minute), for 24 hours at 25 °C. The amounts of the dry matter in the initial and final samples were determined by drying the samples at 105 °C for 24 h. The solubility was calculated using Eq. (1).¹

$$\text{Eq. (1):} \quad S\% = 100[w_i - w_f/w_i]$$

Where: w_i is the initial dry weight of the sample (g) and w_f is the final dry weight of the sample (g).

Water vapor permeability (WVP)

The samples were placed in permeation cells (inner diameter: 63 mm, height: 25 mm), filled with granular anhydrous calcium chloride and hermetically sealed. The permeation cells were placed in a glass chamber with a saturated sodium chloride solution, providing RH gradients of 0 to 75 % at 25 °C. The mass gain was monitored for 24 hours by weighing the permeation cell on an analytical balance (AY 220, Shimadzu). The water vapor permeability of the samples was determined in triplicate using Eq. (2).²⁷

$$\text{Eq. (2):} \quad WVP = w \cdot L/A \cdot t \cdot \Delta p$$

where w is the weight of the water that permeated through the film (g), L is the thickness of the film (m), A is the permeation area (m²), t is the time of permeation (s), and Δp the water vapor pressure difference between the two sides of the film (3167,46 Pa at 25 °C). The WVP is expressed in $\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$

Optical Properties (color and opacity)

The opacity was determined by measuring the film absorbance at 210 nm (UV region UV) and 500 nm (visible region) using a UV spectrophotometer (Shimadzu UV-1800). The films were cut into a rectangle and directly placed in a spectrophotometer test cell. An empty test cell was used as the reference. The opacity of the films was calculated by dividing the values of the absorbance (nm) by the thickness of the film (mm).²⁸

The color change of the films was determined by the color difference (ΔE) with a colorimeter (Hunter Lab system, model Miniscan XE, USA) operated with D65 (daylight) and using the CIELab color parameters. The parameters L^* (luminosity), a^* (red-green), and b^* (yellow-blue) were determined. A white disk ($L0^* = 97.5$; $a0^* = 0.13$ and $b0^* = 1.7$) was used as the standard. The ΔE was calculated using Eq. (3).²⁹

$$\text{Eq. (3):} \quad \Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Where: $\Delta L^* = L^* - L0^*$, $\Delta a^* = a^* - a0^*$, $\Delta b^* = b^* - b0^*$ in which $L0^*$, $a0^*$, and $b0^*$ are the color values of the standards and L^* , a^* , and b^* are the film color values.

Morphological Properties

The morphological properties of the films containing the oregano and thyme essential oils were studied using scanning electron microscopy (SEM). The images were obtained using a scanning electron microscope JSM 5800 LV, JEOL (Tokyo, Japan), connected to a secondary electron detector for energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). The films were cut and pasted onto double-sided conducting tape on an aluminum support and coated with a thin film of platinum using a Balted SCD 050 Sputter Coater (Scotia, New York, USA). The micrographs were obtained with a magnification of 550 \times at an accelerating voltage of 5 kV. Several images were taken from different points on the surface of the film to ensure that the final image was representative of the entire sample.

Thermal Stability

The thermal stability of the films was studied using thermogravimetric analysis. This was performed under argon flow on a Shimadzu Instrument, model TGA-502, with a heating rate of 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ from room temperature up to 600 $^{\circ}\text{C}$.

Antimicrobial Activity

Antimicrobial activity tests of the films was performed using the agar diffusion method.²⁰ Strains of *Escherichia coli* (ATCC 25972) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 1901) were inoculated in Brain Heart Infusion (BHI, HiMedia, India) and incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 12 h. The films were cut into a disc form of 10 mm diameter and were placed on Trypticase Soy Agar (TSA, HiMedia, India) plates that were previously seeded with 0.1 mL of inoculum containing indicator microorganisms in the range of 10⁶ CFU.ml⁻¹. The plates

were incubated at 37 °C for 24 h. The diameter of the inhibition zone surrounding the film discs with the agar surface were measured, with digital micrometer (DIGIMESS Precision: 0.001 mm, resolution: 0 mm ~ 25 mm, Brazil), and the total area was calculated. The entire zone area was calculated by subtracting from the film disk area, and this difference was reported as the zone of inhibition in mm². We also observed the antimicrobial activity by contact inhibition, i.e., even without the presence of a clear zone inhibition, if the film inhibited microbial growth on the surface contact of film disk with the agar.

Statistical Analysis

The results were evaluated using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test at a significance level of 0.05 using the Statistica 12.0 software (STATSOFT Inc., São Paulo, Brazil).

RESULTS AND DISCUSSION

Proximate Analysis of Quinoa Flour

The quinoa flour obtained in this work had a moisture content of 11 ± 0.1 %, and the proximate analysis for the dry basis found 13.0 ± 0.1 % of protein, 6.0 ± 1.5 % of total lipids, 3 ± 0.1 % of ash, 6.1 ± 0.3 % of total fiber and 71 ± 1 % of carbohydrates. These values were similar to other studies in the literature reporting the proximate analysis of grain quinoa.^{18,30-32}

Selection of Essential Oils

In Fig. 1, the zone of inhibition from the preliminary tests of antimicrobial activity of the EOs is observable. The oils that showed visually larger inhibition zones to the growth of *S. aureus* (ATCC 1901) included oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.), these added in the formulations. Oregano and thyme EOs are known for their antimicrobial activity in vitro due to the presence of carvacrol (traces to 80 % in oregano and 2 to 11% in thyme) and thymol (traces to 64 % in oregano and 10 to 64 % in thyme).³³ Several studies have shown that certain essential oils (EOs) have strong antimicrobial properties; therefore, they could be used in food production as a possible alternative to

synthetic preservative additives to limit the growth of food pathogens and increasing the shelf life of some food.³³⁻³⁵

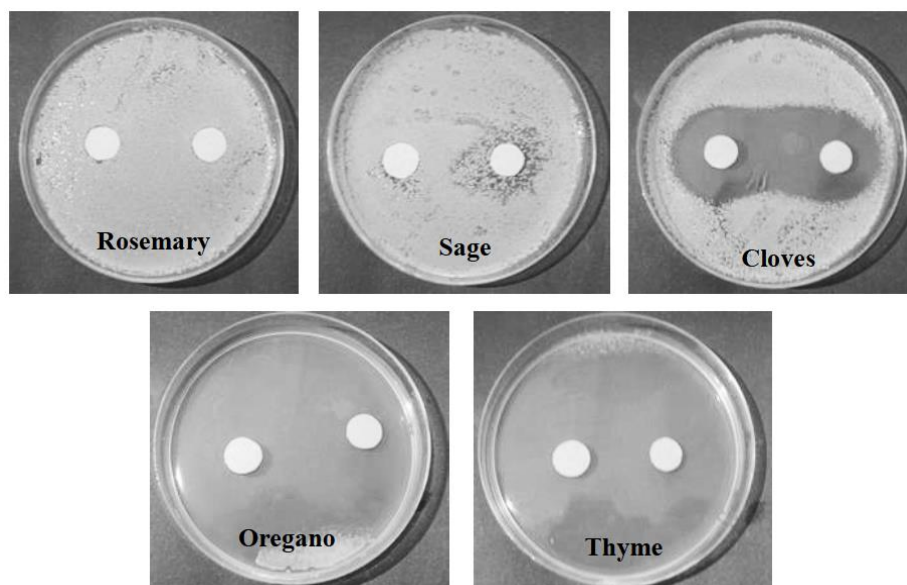


Fig. 1 Images of zones of inhibition of essential oils of rosemary (*rosmarinus officinalis*), cloves (*Eugenia caryophyllata*), sage (*Salvia officinalis*), oregano (*Origanum vulgare*. L) and thyme (*Thymus vulgaris* L) against *Staphylococcus aureus*.

Mechanical Properties

Regarding the thickness, independent of the type of essential oil and concentration used, we did not observe a statistically significant difference ($p > 0.05$), with thickness ranging from $181 \pm 16 \mu\text{m}$ to $209 \pm 10 \mu\text{m}$. The mechanical properties of the tensile strength, TS (MPa), elongation at break, EB (%) and Young's modulus, YM (MPa), of the quinoa flour films containing the EOs are provided in Table 1.

The tensile strength (TS) is a measurement of the maximum strength of the film under an applied tensile stress. Our analysis of the films revealed that the addition of the EOs, including increasing their concentration, produced a significant reduction ($p < 0.05$) in the TS compared with the film produced only with quinoa flour (0 % EO). The values reduced from $3.5 \pm 0.2 \text{ MPa}$ to $1.2 \pm 0.2 \text{ MPa}$ for the film with the EO of oregano and to $1.8 \pm 0.1 \text{ MPa}$ for the film with the EO of thyme. The reverse effect was observed for the elongation at break (EB), which increased significantly ($p < 0.05$) with an increase in EO concentration from $14.3 \pm 0.9 \%$ for the film formulated only with quinoa flour to $37.3 \pm 3.1 \%$ and $20.1 \pm 0.3 \%$ for the films with 2% of oregano and thyme EOs, respectively. For the Young's modulus (YM),

we observed that the addition of the EO led to a significant reduction ($p < 0.05$) in the values. The results indicated that the addition of the EOs in the films led to a significant decrease in strength and rigidity of the films; however, the EOs significantly increased the elasticity.

According to Sanchez-Gonzalez et al.³⁶ the oil incorporation in the film results in discontinuities in the polymer matrix of the dried film, which results in a decrease in the mechanical properties of the TS and EB. The same authors observed that the addition of tea tree essential oil (TTO) in films based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) results in a significant decrease in the TS and elastic modulus of the films. A similar effect was observed by Pranoto et al.,²⁴ in which the incorporation of garlic oil in chitosan edible film significantly reduced the TS from 37.03 ± 1.29 MPa (control) to 28.97 ± 1.92 (400 μl / g of chitosan).

Another group,³⁷ developed gelatin-based edible films that were incorporated with olive oil and observed an increase in the tensile strength (TS) from 6.10 (control) to 6.7 MPa with a final value of 10.9 MPa (emulsified films). According to the authors, the inclusion of oil favored protein–protein interactions, and as a consequence, the obtained films exhibited higher TS values in comparison with those films without the oil. Jouki et al.,²⁰ developed films of quince seed mucilage (QSM) containing oregano essential oil (OEO), observed that the TS and YM of the films decreased significantly ($p < 0.05$) after addition of the EO from 21.14 to 13.28 MPa and 79.29 to 66.13 MPa for the TS and YM, respectively. This was accompanied by a significant increase ($p < 0.05$) in the EB from 29.02 % to 34.67 % with an increase in the oil concentration of up to 2.0 % (w/w). The EO is liquid at room temperature, and it is present in the film in the form of oil droplets that can easily be deformed, enhancing the film's extensibility. Thus, the OE can act as a plasticizer to reduce the TS and increasing the EB of the films.

Table 1 Properties mechanical of tensile strength (TS), elongation at break (EB) and modulo de Young (YM), of films prepared quinoa flour with and without essential oils (EOs)

	TS [MPa]		EB [%]		YM [MPa]	
	Oregano	Thyme	Oregano	Thyme	Oregano	Thyme
0%	3.5 ± 0.2^a	3.5 ± 0.2^a	14.3 ± 0.9^c	14.3 ± 0.9^c	128.3 ± 10.3^a	128.3 ± 10.3^a
0.5%	3.0 ± 0.2^b	2.8 ± 0.1^b	19.2 ± 1.8^b	16.6 ± 1.3^b	115.2 ± 6.9^b	101.3 ± 3.5^b
1%	2.7 ± 0.3^b	2.8 ± 0.2^b	19.7 ± 0.9^b	19.2 ± 1.2^a	82.3 ± 7.6^c	88.4 ± 7.0^b
2%	1.2 ± 0.2^c	1.8 ± 0.1^c	27.3 ± 3.1^a	20.1 ± 0.3^a	51.9 ± 4.2^d	54.2 ± 3.6^c

The results are represented as the means \pm standard deviation of the ten repetitions. Values with the same lowercase letter in the column show significant similarity ($p > 0.05$) according

to Tukey's test, for films containing essential oils of oregano or thyme in different concentrations.

Water Solubility and Water Vapor Permeability (WVP)

The moisture content (MC) and water solubility of the quinoa flour films are shown in Table 2. Biodegradable packaging should maintain moisture levels within the packaged product. Therefore, knowledge of the solubility and MC of the film is highly important for food packaging applications. The MC values of the films significantly decreased ($p < 0.05$) with the presence of the EO; however, the increase in the concentration of the OEs was not significant ($p > 0.05$) for MC.

The solubility of a film is an important property for edible films, and the water insolubility or resistance is usually required for a potentially commercial film.³⁷ The solubility of the quinoa flour film (43.1 ± 1.5 %) showed a significant reduction ($p < 0.05$) when compared with films incorporated with the EO of oregano (36.5 ± 0.3 %) and thyme (37.0 ± 0.4 %) at higher concentrations. According to Jiménez et al.,³⁸ this effect is a consequence of the increase in the film's hydrophobicity due to the incorporation of the oil. Ma et al.,³⁷ developed gelatin-based edible films incorporated with olive oil and observed that the solubility significantly decreased ($p < 0.05$) from 44.67 % (control) to 27 – 33 % (emulsified films). A similar effect was observed by Tapia-Blacido et al.,⁴ in their study of the interactions of the lipid fraction with the properties of amaranth flour films. The authors observed that the presence of lipid in the flour films increased their hydrophobicity and decreased their solubility from 42.2 ± 1.8 % (flour) to 39.9 ± 2.5 %.

Table 2 Moisture content (MC) and solubility (S) of the films of quinoa flour incorporated with essential oils (EOs).

	MC [%]		S [%]	
	Oregano	Thyme	Oregano	Thyme
0%	18.70 ± 0.9^a	18.70 ± 0.9^a	43.1 ± 1.5^a	43.1 ± 1.5^a
0.5%	16.3 ± 0.8^b	16.1 ± 0.4^b	41.2 ± 0.4^b	42.1 ± 0.6^{ab}
1%	15.8 ± 0.6^b	15.5 ± 0.2^b	38.4 ± 0.1^{bc}	39.2 ± 0.2^{bc}
2%	14.7 ± 0.2^b	14.5 ± 0.4^b	36.5 ± 0.3^c	37.0 ± 0.4^c

The results are represented as the means \pm standard deviation of three repetitions. Values with the same lowercase letter in the column show significant similarity ($p > 0.05$) according to

Tukey's test, for films containing essential oils of oregano or thyme in different concentrations.

The Fig. 2 shows that an increase in EO concentration results in a significant reduction ($p < 0.05$) in the WVP from $1.48 \pm 0.07 \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ for the film produced only with quinoa flour (0 % EO) to $1.05 \pm 0.04 \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ and $1.11 \pm 0.08 \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ for films with 2 % oregano or thyme EOs, respectively. Ma et al.,³⁷ developed gelatin-based edible films that were incorporated with olive oil and observed a significant reduction in the WVP with an increased concentration of olive oil from $5.610 \pm 0.068 \times 10^{-10} (\text{g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1})$ to $4.194 \pm 0.044 \times 10^{-10} (\text{g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1})$ (emulsified films). According to these authors, the olive oil incorporation in the gelatin matrix improved the water barrier ability of the films for any given oil to protein ratio. Pereda et al. (2012)³⁹ reported that the WVP is a crucial property for films intended for use as edible food coatings because most natural biopolymers are very susceptible to water absorption. The same authors investigated the effect of the addition of olive oil in edible chitosan films, and they found that the WVP through the films decreased as the oil concentration increased with values on the order of $10^{-9} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, which may be quite high for preventing migration of moisture from the fruit, e.g., to the environment during freezing and thawing.

Due to the hydrophobic nature of the oils, their incorporation in the quinoa flour films improved the solubility and water barrier ability. A primary function of food packaging is to avoid or to decrease moisture transfer between the food and the atmosphere or between two components in a heterogeneous food product.

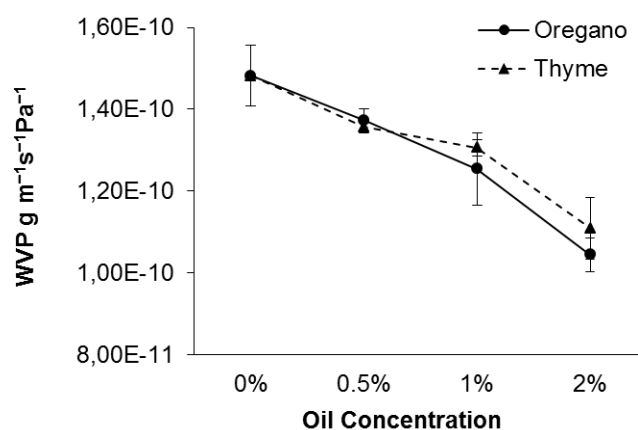


Fig. 2 Water vapor permeability (WVP) of the films of quinoa flour incorporated with essential oils (EOs).

Optical Properties (color and opacity)

The optical properties of the films are relevant properties because they have a direct impact on the film appearance and application.³⁶ Table 3 shows the values for the color parameters (a^* , b^* , and L) of the quinoa flour containing the EO. The color parameter, L , provides a measure of the lightness, and the color values range from 0 to 100 with 0 designating a perfect black and 100 designating pure white. With regard to the color difference of the films (ΔE), higher values of ΔE indicate films with a more significant color intensity.

The addition of the EO into the films did not modify significantly ($p > 0.05$) the ΔE , demonstrating that for the tested concentrations the oregano and thyme oils did not significantly change the color parameters in our quinoa flour films. The parameter, CIE Lab b^* , indicates that the quinoa flour films exhibit a strong tendency to a yellowish color, and the parameter, a^* , is negative for both films, indicating a tendency toward the characteristic tones of the color green. Flour films exhibit a tendency toward a yellowish color,¹ this result indicated that the yellowish color of the flour films would be related to the presence of proteins in their composition.⁴

Table 3 Color parameters of films of quinoa flour incorporated with essential oils.

	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
Oregano				
0%	89.3 ± 1.1^a	-0.3 ± 0.0^a	22.6 ± 0.2^a	1398.8 ± 41.1^a
0.5%	89.4 ± 1.1^a	-0.3 ± 0.1^a	22.8 ± 0.3^a	1351.2 ± 86.7^a
1%	89.8 ± 0.1^a	-0.3 ± 0.1^a	22.5 ± 0.1^a	1499.2 ± 52.4^a
2%	89.6 ± 0.4^a	-0.4 ± 0.0^a	23.0 ± 0.2^a	1606.8 ± 98.2^a
Thyme				
0%	89.3 ± 1.1^a	-0.3 ± 0.0^a	22.7 ± 0.2^a	1448.1 ± 41.4^a
0.5%	89.8 ± 0.2^a	-0.3 ± 0.1^a	22.8 ± 0.1^a	1499.2 ± 90.5^a
1%	88.1 ± 1.3^a	-0.3 ± 0.1^a	22.8 ± 0.1^a	1499.2 ± 51.4^a
2%	89.8 ± 0.4^a	-0.3 ± 0.0^a	22.9 ± 0.1^a	1559.0 ± 52.8^a

The data are presented as the means plus or minus the standard deviations of three repetitions. Means in the same column followed by different letters were significantly different ($p < 0.05$) according to Tukey's test for films containing essential oils of oregano or thyme in different concentrations.

The analysis of the opacity ($A \text{ mm}^{-1}$) at different wavelengths (nm) for the quinoa flour films and films containing the essential oils (EOs) related to the absorption of UV and visible light in the range of 280 to 700 nm are presented in Table 4. High absorbance values indicate films with less transparency or a higher degree of opacity. In the UV region, independent of the concentration, the addition of an EO did not significantly ($p > 0.05$) change the opacity. The films exhibited excellent barrier properties to light in the UV range (280 to 350 nm). These results indicate that the films had a protective ability against UV radiation because of their UV-barrier capabilities, which suggests their potential preventive effect on product oxidation due to UV light.

Table 4 Opacity ($A \text{ mm}^{-1}$) of quinoa flour films and films containing essential oils at different wavelengths (nm)

	280 nm	350 nm	500 nm	600 nm	700 nm
Oregano					
0%	23.8 ± 1.2^a	15.1 ± 1.2^a	4.6 ± 0.3^b	3.8 ± 0.2^b	3.4 ± 0.3^b
0.5%	18.6 ± 0.5^a	15.0 ± 0.6^a	4.7 ± 0.1^b	4.1 ± 0.1^b	3.8 ± 0.1^b
1%	22.3 ± 1.8^a	15.8 ± 0.8^a	5.1 ± 0.4^b	4.3 ± 0.4^b	3.9 ± 0.4^b
2%	22.5 ± 1.9^a	17.6 ± 1.5^a	6.8 ± 0.3^a	6.1 ± 0.3^a	5.8 ± 0.3^a
Thyme					
0%	23.3 ± 1.2^a	15.1 ± 1.2^a	4.6 ± 0.3^b	3.8 ± 0.2^b	3.4 ± 0.4^b
0.5%	20.3 ± 1.6^a	15.2 ± 0.4^a	4.7 ± 0.4^{ab}	3.9 ± 0.3^b	3.4 ± 0.2^b
1%	19.5 ± 0.9^a	15.2 ± 0.5^a	5.0 ± 0.2^{ab}	$4.2 \pm 0.3^a^b$	3.8 ± 0.3^{ab}
2%	21.6 ± 1.1^a	16.5 ± 0.6^a	5.6 ± 0.2^a	4.8 ± 0.2^a	4.5 ± 0.2^a

The data are presented as the means (in triplicate) plus or minus the standard deviations. Means in the same column followed by different letters were significantly different ($p < 0.05$) according to Tukey's test.

The evaluation of the opacity in the visible region (500 to 700 nm) revealed that all of the tested films generally showed low absorbance values, indicating their high transparency and low opacity. However, with an increase in essential oil concentration, we observed a significant increase ($p < 0.05$) in the light absorption of the films, consequently leading to a reduction in the transparency of the films. According to Pereda et al.,³⁹ oil droplets that are dispersed in the carbohydrate matrix affect the transparency by preventing light transmission through the resulting film. The same authors added olive oil in chitosan films (5 %, 10 % and

15 % olive oil / chitosan, wt. %), and they observed an increase in the film opacity as the concentration of lipids increased. To evaluate the opacity of gelatin-based edible films incorporated with olive oil, Ma et al.,³⁷ observed that the addition of olive oil (5, 10, 15 and 20 % olive oil / protein weight ratios) produced a significant increase ($p < 0.05$) in the opacity of films from $0.58 A_{600} \text{ mm}^{-1}$ for the control film to values between $3.28 A_{600} \text{ mm}^{-1}$ and $6.50 A_{600} \text{ mm}^{-1}$.

Morphological Properties

The scanning electron microscopy (SEM) images for the quinoa flour-based films and quinoa flour-based films containing the EOs are shown in Fig. 3. The results show that for the studied magnification (550 \times) the quinoa flour-based films (without EOs), presented a compact structure without the presence of cracks or blistering, with small irregularities. However, with an increase in the EO concentration, an increase in the irregularities of the film surface was observable that were possibly caused by the increased lipid droplet concentration that was dispersed in the matrix of the film.

For the films with 2 % of the EOs of oregano or thyme, we observed a dispersal of the lipid droplets in the emulsion that were continuously distributed throughout the polymer network after the film formed. This dispersal and the higher lipid concentration on the surface of the film may explain the greater opacity of the film with higher levels of EO because, according to Pereda et al.,³⁹ the lipid droplets cause a greater dispersion of light on the surface of the film, leading to an increase in opacity.

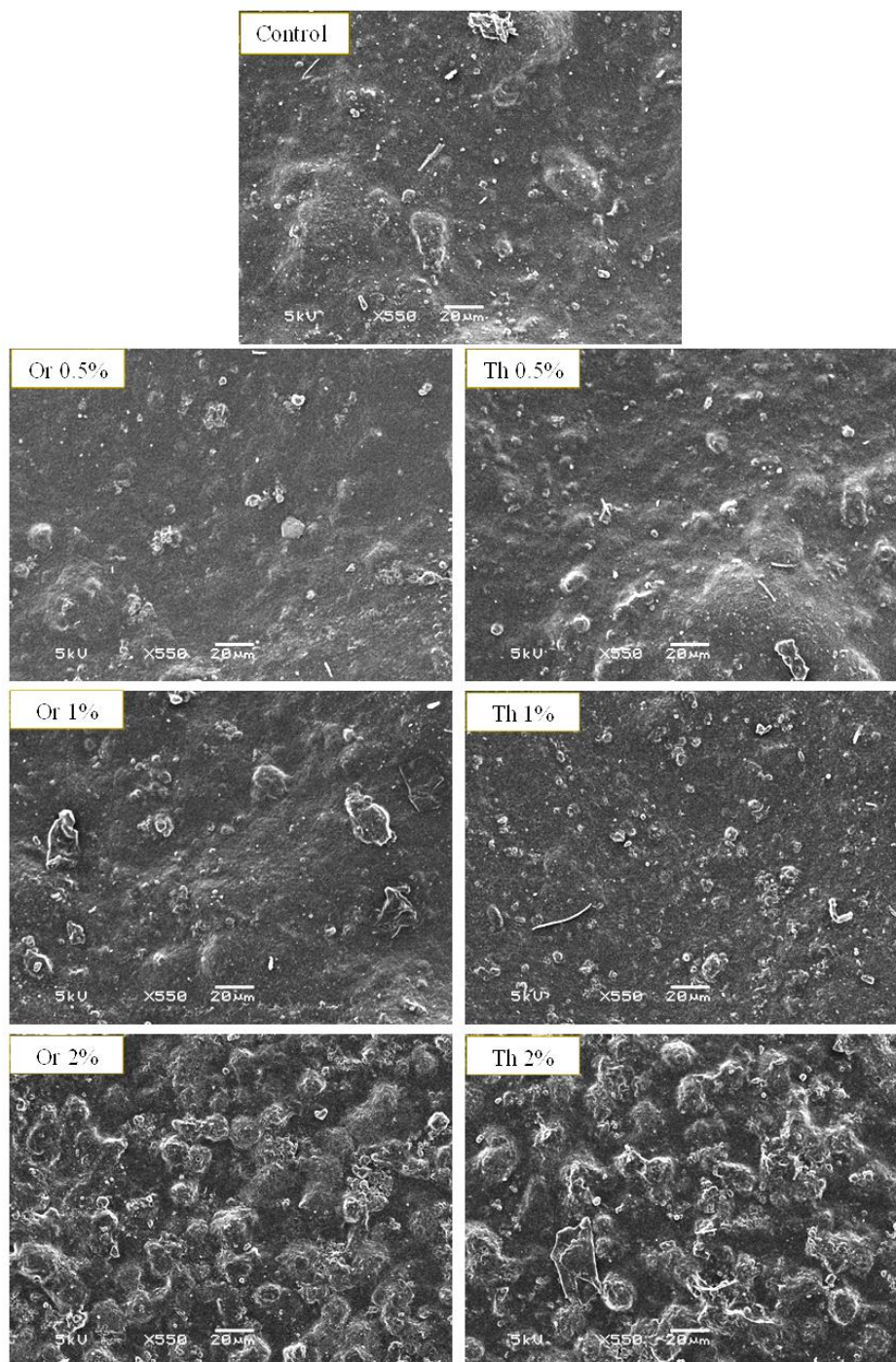


Fig. 3 Scanning Electron Microscopy (SEM), images of film surface without essential oil (control) and with essential oil of oregano at concentration of 0.5% (OR 0.5%), 1% (OR 1%), 2% (OR 2%) and oil of thyme at concentration of 0.5 (Th0.5%), 1% (Th 1%), 2% (Th 2%).

Thermal Stability

TGA thermogram showing thermal degradation behavior of the films with or without EOs are shown in Fig. 4. It can be seen that the addition of EOs, does not affect the thermal stability of the films, exhibiting three main stages of weight loss (Δw).

The first weight loss ($\Delta w_1 = 10\text{--}15\%$), observed between room temperature and $180\text{ }^\circ\text{C}$, is generally due to the evaporation of residual water. The estimated amount of water desorbed was nearly 10 to 15 %, these values are similar to those seen in Table 2 for moisture content (MC). The weight loss ($\Delta w_2 = 18\text{--}20\%$) in the second stage, which corresponds to the degradation of lower molecular weight fractions or structurally bound water in the film network, occurred at the range $180\text{--}250\text{ }^\circ\text{C}$. For the third stage, the major weight loss (Δw_3 of $21\text{--}33\%$) occurred between 250 and $350\text{ }^\circ\text{C}$ for all of the samples, which is ascribed to the organic phase decomposition. Therefore, all films exhibit high thermal stability at least up to $250\text{ }^\circ\text{C}$. It was not possible to observe a larger residual weight with the gradual increase in EOs concentration or between the different oils that were tested.

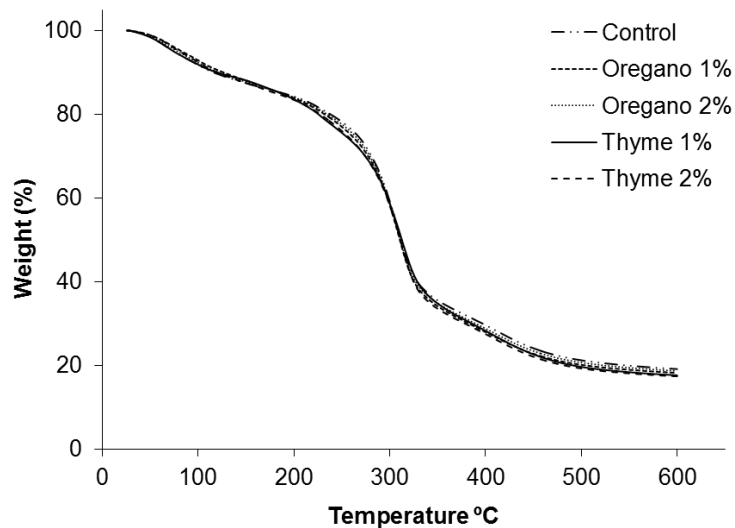


Fig. 4 Thermogravimetric Analysis (TGA) analyses of control films and films containing essential oil of de oregano (1% and 2%) and thyme (1% and 2%).

Antimicrobial Activity

The antibacterial activities (inhibitory zone and contact inhibition) of the quinoa flour films incorporated with oregano and thyme EOs against *E. coli* Gram (-) and *S. aureus* Gram

(+) bacteria are shown in Table 5. The inhibitory zone is based on the measurement of the clear zone that was caused by growth inhibition produced by a film disk (10 mm) that contained the antimicrobial agent when placed in direct contact with a bacterial culture. When antimicrobial agents are incorporated into food packaging films, these materials diffuse through the agar gel and result in a clear zone around the cut films.⁴⁰

As shown in Table 5, an increase of the zone inhibition of the tested microorganisms occurred with an increase in both EOs concentrations. Nonetheless, in lowest concentration tested (0.5 %) for both EOs did not produce a zone of inhibition against *E. coli* (Gram -) growth, there was only contact inhibition. However, the same concentration produced a small zone of inhibition against *S. aureus* (Gram +), as well as contact inhibition.

This behavior was observed for other concentrations, independent of the EO, in which larger zones of inhibition were observed for *S. aureus* (Gram +). These results are in accordance with other authors who reported that Gram-positive microorganisms are more sensitive to essential oils than Gram-negative bacteria. This behavior may be related to the presence of an additional external membrane surrounding the cell wall in Gram-negative bacteria, which may restrict the diffusion of hydrophobic compounds through its lipopolysaccharide covering.^{19,33}

In Table 5, we show that, with the same concentrations and independent of the microorganisms, the EO of oregano had the highest inhibition zones in comparison with thyme. These results are probably related to the composition of the EOs used. Thymol and carvacrol are the main antimicrobial constituents of thyme (*Thymus vulgaris*) and oregano (*Origanum vulgare*). They represent the monoterpenes with the highest bactericidal power, which are present in the composition of many EOs, due to their phenolic nature.⁴¹ As previously mentioned, these are compounds found in higher quantities in the EOs of oregano when compared with thyme. Pesavento et al.,³⁴ analyzed the chemical composition (%) of OEs and found concentrations for carvacrol and thymol that are approximately 71.8 % and 1.6 % (v/v), respectively, for oregano (*Origanum vulgare*) and concentrations of approximately 0.40 % and 43.1 % (v/v), respectively, for thyme (*Thymus vulgaris*).

The inhibition zone values obtained in this work are similar to those obtained in the literature for the same oils that are incorporated in films with different matrices. Seydim and Sarikus,²² found a zone of inhibition against *S. aureus* (ATCC 43300) that was 33.65 mm² for whey protein isolate films containing 2 % oregano EO, and they did not observe a zone of inhibition for the same films with 1 % oregano EO. Other authors⁴⁰ reported that in chitosan-based films that contained thyme EO, large inhibition zones were present against *S. aureus*

(PTCC 143) that were 109.03 mm² (films containing 1 % EO) and 61.43 mm² (films containing 0.5 % EO). Jouki et al.,⁴² observed inhibition zones against *S. aureus* (ATCC 25923) that were 74.56 mm² for quince seed mucilage film that was incorporated with 1 % thyme EO. Another group of researchers,¹⁹ developed a soy protein-based edible film that was incorporated with oregano and thyme essential oil (2 %) for use against *S. aureus*. They observed inhibition zones that were 42 mm² and 41 mm², respectively. Pelissari et al.,¹ reported inhibition zones against *E. coli* (ATCC 25922) that were 23.73 mm² for starch-chitosan films incorporated with 1 % oregano EO.

Several mechanisms are involved in the inhibition of microorganisms in edible films that depend on the source and concentration of the active compounds in the plant extracts and the composition of the film material.²² In this work, the film with 2 % oregano EO showed the best results with respect to antimicrobial activity primarily against the Gram positive bacteria, *S. aureus*, demonstrating its potential use and application in food packaging.

Table 5 Zone of inhibition of edible films prepared with quinoa flour and films containing essential oils against *E. coli* (ATCC 25972) and *S. aureus* (ATCC 1901)

Antimicrobial Agents	<i>E. coli</i> Gram (-)		<i>S. aureus</i> Gram (+)	
	Inhibitory (mm ²)	Contact	Inhibitory (mm ²)	Contact
Control	0	-	0	-
Oregano				
0.5%	0	+	16.5 ± 0,9	+
1%	23.5 ± 0,8	+	50.1 ± 0,9	+
2%	56.2 ± 1,0	+	122.5 ± 1,2	+
Thyme				
0.5%	0	+	13.1 ± 0,8	+
1%	25.3 ± 0,8	+	36.4 ± 0,9	+
2%	36.4 ± 0,9	+	98.1 ± 1,1	+

CONCLUSIONS

Our results indicate that quinoa flour containing the essential oil (EO) of oregano or thyme is a potentially useful material for the formulation of active coatings and edible films. The addition or the increase in EOs concentration both significantly changed the physical and mechanical properties. The incorporation of the EOs, despite the reduction in the resistance of the films, led to an increase in their elasticity, and they became more malleable. It also led to a reduction in the WVP and solubility, which is a positive attribute for their application in food. The films exhibited good light absorption while maintaining the protective barrier against UV and visible light, which are important characteristics for their application in food with high lipid contents to minimize the oxidative effects of light. Even for the low concentrations, all of the films incorporated with the EOs of oregano and thyme demonstrated greater antimicrobial activities against *S. aureus* and *E. coli*. However, larger zones of inhibition were observed for films with the oregano EO compared to films with the thyme EO. Therefore, our results are encouraging because they demonstrate that the use of EOs, in addition to improving the mechanical and barrier properties of films, may offer an alternative method for limiting pathogens and aerobic spoilage in food.

Acknowledgments

We acknowledge Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for financial support and Electronic Microscope Center (CME) of the Federal University of Rio Grande do Sul UFRGS for technical assistance.

REFERENCES

1. Pelissari, F. M.; Andrade-Mahecha, M. M.; Sobral, P. J. d. A.; Menegalli, F. C., *Food Hydrocolloids* 30, 681 2013.
2. Guerrero, P.; Stefani, P. M.; Ruseckaite, R. A.; de la Caba, K., *Journal of Food Engineering* 105, 65 2011.
3. Andrade-Mahecha, M. M.; Tapia-Blacido, D. R.; Menegalli, F. C., *Carbohydrate Polymers* 88, 449 2012.
4. Tapia-Blacido, D.; Mauri, A. N.; Menegalli, F. C.; Sobral, P. J. A.; Anon, M. C., *Journal of Food Science* 72, E293 2007.

5. Tapia-Blacido, D.; Sobral, P. J.; Menegalli, F. C., *Journal of Food Engineering* 67, 215 2005.
6. Colla, E.; do Amaral Sobral, P. J.; Menegalli, F. C., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 6645 2006.
7. Dias, A. B.; Muller, C. M. O.; Larotonda, F. D. S.; Laurindo, J. B., *Lwt-Food Science and Technology* 44, 535 2011.
8. Tapia-Blacido, D. R.; Sobral, P. J. D.; Menegalli, F. C., *Lwt-Food Science and Technology* 50, 392 2013.
9. Valenzuela, C.; Abugoch, L.; Tapia, C.; Gamboa, A., *International Journal of Food Science and Technology* 48, 843 2013.
10. Tapia-Blacido, D. R.; Sobral, P. J. D.; Menegalli, F. C., *Lwt-Food Science and Technology* 44, 1731 2011.
11. Tapia-Blacido, D.; Sobral, P. J.; Menegalli, F. C., *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 22, 249 2005.
12. Mariniello, L.; Di Pierro, P.; Esposito, C.; Sorrentino, A.; Masi, P.; Porta, R., *Journal of Biotechnology* 102, 191 2003.
13. Bonilla, J.; Talón, E.; Atarés, L.; Vargas, M.; Chiralt, A., *Journal of Food Engineering* 118, 271 2013.
14. Tanada-Palmu, P. S.; Grosso, C. R. F., *Postharvest Biology and Technology* 36, 199 2005.
15. Dias, A. B.; Muller, C. M. O.; Larotonda, F. D. S.; Laurindo, J. B., *Journal of Cereal Science* 51, 213 2010.
16. Araujo-Farro, P. C.; Podadera, G.; Sobral, P. J. A.; Menegalli, F. C., *Carbohydrate Polymers* 81, 839 2010.
17. Ahamed, N. T.; Singhal, R. S.; Kulkarni, P. R.; Kale, D. D.; Pal, M., *Carbohydrate Polymers* 31, 157 1996.
18. Abugoch, L. E.; Tapia, C.; Villamán, M. C.; Yazdani-Pedram, M.; Díaz-Dosque, M., *Food Hydrocolloids* 25, 879 2011.
19. Emiroğlu, Z. K.; Yemiş, G. P.; Coşkun, B. K.; Candoğan, K., *Meat Science* 86, 283 2010.
20. Jouki, M.; Yazdi, F. T.; Mortazavi, S. A.; Koocheki, A., *Food Hydrocolloids* 36, 9 2014.
21. Campos, C.; Gerschenson, L.; Flores, S., *Food and Bioprocess Technology* 4, 849 2011.
22. Seydim, A. C.; Sarikus, G., *Food Research International* 40, 949 2007.
23. Zivanovic, S.; Chi, S.; Draughon, A. F., *Journal of Food Science* 70, M45 2005.

24. Pranoto, Y.; Rakshit, S. K.; Salokhe, V. M., *Lwt-Food Science and Technology* 38, 859 2005.
25. Gómez-Estaca, J.; López de Lacey, A.; López-Caballero, M. E.; Gómez-Guillén, M. C.; Montero, P., *Food Microbiology* 27, 889 2010.
26. Silva-Weiss, A.; Ihl, M.; Sobral, P. J. A.; Gomez-Guillen, M. C.; Bifani, V., *Food Engineering Reviews* 5, 200 2013.
27. Pagno, C. H.; Costa, T. M. H.; de Menezes, E. W.; Benvenuti, E. V.; Hertz, P. F.; Matte, C. R.; Tosati, J. V.; Monteiro, A. R.; Rios, A. O.; Flores, S. H., *Food Chemistry* 173, 755 2015.
28. Wang, L.; Dong, Y.; Men, H.; Tong, J.; Zhou, J., *Food Hydrocolloids* 32, 35 2013.
29. Dick, M.; Henrique Pagno, C.; Haas Costa, T. M.; Gooma, A.; Subirade, M.; de Oliveira Rios, A.; Hickmann Flôres, S., *Journal of Applied Polymer Science*, n/a 2015.
30. Abugoch, L. E.; Romero, N.; Tapia, C. n. A.; Silva, J.; Rivera, M. n., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 4745 2008.
31. Abugoch James, L. E. In *Advances in Food and Nutrition Research*; Steve, L. T., Ed.; Academic Press, 2009.
32. Repo-Carrasco, R.; Espinoza, C.; Jacobsen, S. E., *FOOD REVIEWS INTERNATIONAL* 19, 179 2003.
33. Burt, S., *International Journal of Food Microbiology* 94, 223 2004.
34. Pesavento, G.; Calonico, C.; Bilia, A. R.; Barnabei, M.; Calesini, F.; Addona, R.; Mencarelli, L.; Carmagnini, L.; Di Martino, M. C.; Lo Nostro, A., *Food Control* 54, 188 2015.
35. Calo, J. R.; Crandall, P. G.; O'Bryan, C. A.; Ricke, S. C., *Food Control* 54, 111 2015.
36. Sanchez-Gonzalez, L.; Vargas, M.; Gonzalez-Martinez, C.; Chiralt, A.; Chafer, M., *Food Hydrocolloids* 23, 2102 2009.
37. Ma, W.; Tang, C. H.; Yin, S. W.; Yang, X. Q.; Wang, Q.; Liu, F.; Wei, Z. H., *Food Research International* 49, 572 2012.
38. Jiménez, A.; Fabra, M. J.; Talens, P.; Chiralt, A., *Carbohydrate Polymers* 82, 585 2010.
39. Pereda, M.; Amica, G.; Marcovich, N. E., *Carbohydrate Polymers* 87, 1318 2012.
40. Hosseini, M. H.; Razavi, S. H.; Mousavi, M. A., *Journal of Food Processing and Preservation* 33, 727 2009.
41. Yanishlieva, N. V.; Marinova, E.; Pokorný, J., *European Journal of Lipid Science and Technology* 108, 776 2006.

42. Jouki, M.; Mortazavi, S. A.; Yazdi, F. T.; Koocheki, A., *Carbohydrate Polymers* 99, 537 2014.

ARTIGO 3 Synthesis of biodegradable films with antioxidant properties based on cassava starch containing bixin nanocapsules

Abstract

Biodegradable and active packaging based on cassava starch incorporated bixin nanocapsules with different concentrations were developed. The physical, mechanical, barrier properties and antioxidant activity of the active packaging were studied. The films incorporated of bixin nanocapsules were found to be homogeneous and thermally stable. Films with higher concentrations of bixin nanocapsules exhibited a significant reduction tensile strength (TS) and increases in elongation at break (EB), well as, significant improvement in protection against UV and visible light and decreased water solubility and increased water vapor permeability. The films were used to pack sunflower oil under accelerated oxidation conditions (65 % RH / 35 °C). Sunflower oil packaged in films with bixin exhibited lower oxidation rates, thus maintaining its freshness according to Codex Alimentarius guidelines (< 10 milliequivalent.kg-1). Films containing bixin nanocapsules are very promising materials for use as packaging with antioxidant properties for maintaining food safety and extending the shelf life.

Keywords: biodegradable films, bixin nanocapsules, active packaging, antioxidant potential

Introduction

The main objective of food packaging is to maintain the quality and safety of food during storage and distribution. However, the majority of packaging used by industry comes from non-degradable polymers, raising environmental concerns. Recent environmental regulations, societal concerns and growing environmental awareness throughout the world have triggered efforts in the plastic industry to develop new products and processes that are less harmful to the environment (Maran et al 2013).

The use of biopolymers for the development of edible and/or biodegradable films could be an alternative to reduce or replace conventional non-biodegradable plastics (Tongdeesoontorn et al 2012). Starch has been considered one of the most promising candidates for the future, primarily because of an attractive combination of its large

availability and relatively low price (Souza et al 2012). Cassava starch has been extensively used to produce films (Chen and Lai, 2008; Maran et al 2013; Souza et al 2013).

In recent years, there have also been increased concerns about food quality and safety, which have motivated the development, in addition to biodegradable packaging, of active packaging that interact with food and assist in its conservation (Park et al 2012; Silva-Weisset al 2013).

Oxidation processes are involved in most deterioration mechanisms present in nature, including in food products (López-de-Dicastillo et al 2010). Active packages with antioxidant properties have received special attention because they are alternatives to traditional packaging, in which antioxidants are incorporated into or coated onto food packaging materials to reduce oxidation of the food, one of the main causes of food spoilage (López-de-Dicastillo et al 2012).

Currently, the tendency to reduce the use of synthetic additives in packaging, such as BHA or BHT, has focused interest on their substitution by natural antioxidants, such as tocopherol, plant extracts, and essential oils from herbs, that are safer and in most cases offer multiple health benefits (Li et al 2012). Several studies have report the development of active packaging with antioxidants incorporated to improve food preservation, such as α -tocopherol (Gomez-Estaca et al 2014; Martins et al 2012), plant extracts (Li et al 2014; Silva-Weiss et al 2013), essences oils from herbs (Salarbashi et al 2014; Silva-Weiss et al 2013), curcumin (López-de-Dicastillo et al 2012), eugenol (Burt, 2004), among others. However, to date, there is limited work in the literature on the development of active films with the addition of antioxidants such as bixin.

The bixin is the primary pigment found in annatto seeds, a carotenoid consists of nine conjugated double bonds and two carboxylic groups; such a structure is responsible not only for its light absorption and antioxidant properties but also for its low solubility in water. Like other carotenoids, bixin is an efficient quencher of singlet oxygen and a scavenger of reactive species of oxygen and nitrogen (Rios et al 2009).

Because of its low solubility and instability in the presence of oxygen, heat and light, its use may be limited for application in food packaging; however, nanoencapsulation technology provides a way to overcome these setbacks. In general, encapsulation improves the stability, solubility and bioavailability of encapsulated species and promotes its controlled release. The researchers (Lobato et al 2013), have produced, characterized, and evaluated the stability of bixin nanocapsules, observing, in addition to increased solubility of the nanocapsules, increased stability, thus enabling their application in products with low lipid content or with

antioxidant agents in active packaging. Therefore, it is important to evaluate the characteristics of the films after the incorporation of the antioxidant compound.

The aim of this study was to develop biodegradable cassava starch-films incorporated with bixin nanocapsules as an antioxidant for active packaging applications and to evaluate the effect of the addition of nanocapsules on the mechanical, physical, optical properties and the protector effect of active packaging against accelerated oxidation in Sunflower oil.

Materials and Methods

Materials

For the preparation of the films were used cassava starch (CS) (Yoki Alimentos, São Paulo, Brazil) and glycerol (Merk) was used as a plasticizer. To obtain the bixin nanocapsules the polymer poly- ϵ -caprolactone (PCL) ($M_w = 80,000$) and sorbitan monostearate (Span 60) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). The capric/caprylic triglycerides (CCT) and polysorbate 80 (Tween 80) were purchased from Delaware (Porto Alegre, Brazil). All other chemicals and solvents were of analytical or pharmaceutical grade.

Obtaining Bixin Nanocapsules

The bixin nanocapsules were obtained by a technique of the interfacial deposition of preformed poly- ϵ -caprolactone (PCL) according to Lobato et al., (2013). The PCL (250 mg), capric/caprylic triglyceride (CCT) (400 μ L), sorbitan monostearate (Span 60) and bixin (0.4 mg) were dissolved in a mixture of acetone (60 mL) and ethanol (7.5 mL) under magnetic stirring at 40 °C. After solubilisation PCL, CCT and Span 60, bixin standard (98.7%) was added and remained under magnetic stirring for 10 min (40 °C). This organic phase was added into an aqueous phase (130 mL) containing Tween 80 (195 mg) and remained under stirring for 10 min. The dispersion was concentrated under reduced pressure until it reached a final volume of 25 mL. The bixin concentration used in this work was 16.92 ± 0.16 g mL⁻¹, which is the optimal concentration reported by the authors to ensure the stability of nanocapsules.

Preparation of Films

The films were produced by casting. The film-forming solution was prepared with a suspension of 4 % cassava starch (4 g 100g⁻¹ total film solution). The dispersion of starch was gelatinized at 82 °C for 15 minutes with constant stirring in a water bath (DeLeo B450). The glycerol was then added at a concentration of 0.25 g/g starch, thus obtaining the standard film. Different concentrations of solution containing bixin nanocapsules were added to the standard film with consideration for the total amount of starch in the film solution in grams, thus obtaining the films B2% (0.5 g/g), B5% (1.25 g/g), B8% (2 g/g) and B10% (2.5 g/g). The film-forming solution was then poured evenly onto acrylic plates in 0.24 g cm⁻² batches. The films were dried in an oven with forced air circulation (DeLeo B5AFD) at 35 °C for 16 hours.

Characterization of Films

The starch films containing bixin nanocapsules were characterized by determining the solubility and morphological, thermal and optical properties (color, opacity), and conditioned in desiccators under 58 % RH at 25 °C for 48 hours before being characterization of mechanical properties (Tensile strength and percent elongation at break). The acceleration of the antioxidant effects of the films was also tested.

Mechanical properties

The films were cut into strips (80 mm x 25 mm), and its thickness was measured using a micrometer (Precision 0.001 mm, resolution / 0 mm - 25 mm), at five random positions on each strip. Tensile strength (TS) [MPa] and percent elongation at break (EB) [%] were evaluated by a tensile test performed on a texture analyzer (TA.XT2i e Stable Micro Systems, UK) with a load cell of 5 kg and using the A/TGT self-tightening roller grips fixture, according to ASTM D882-12, as described by Dick et al (2015). Ten strips were cut, and each one was mounted between the grips of the equipment for testing with the initial distance between the grips and test speed set to 50 mm and 0.8 mm s⁻¹, respectively.

Water vapor permeability (WVP)

The WVP was determined according to the method ASTM E-96-05, as described by Pagno et al (2015). The samples were placed in permeation cells (inner diameter: 63 mm, height: 25 mm), filled with granular anhydrous calcium chloride and hermetically sealed. The

permeation cells were placed in a glass chamber, with saturated sodium chloride solution, providing RH gradients of 0 to 75 % at 25 °C. The mass gain was monitored for 24 hours by weighing the permeation cell on an analytical balance (AY 220, Shimadzu). The water vapor permeability of the samples was determined in triplicate using Eq. (1).

$$\text{Eq. (1): } WVP = w \cdot L / A \cdot t \cdot \Delta p$$

Where w is the weight of water permeated through the film (g), L is the thickness of the film (mm), A is the permeation area (m²), t is the time of permeation (h), and Δp the water vapor pressure difference between the two sides of the film (KPa).

The WVP was expressed as g mm h⁻¹m⁻²KPa⁻¹.

Water solubility

The solubility was calculated as the percentage of dry matter of the film dissolved after immersion for 24 h in water at 25 °C. Discs of film (diameter: 2 cm) were cut, weighed, immersed in 30 mL of distilled water, and slowly and periodically agitated. The amount of dry matter in the initial and final samples was determined by drying the samples at 105 °C for 24 hours (Pelissari et al 2013). The solubility was calculated using Eq. (2):

$$\text{Eq. (2): } S\% = 100[(w_i - w_f) / w_i]$$

Where: w_i is the initial dry weight of the sample (g) and w_f is the final dry weight of the sample (g).

Optical properties (color, opacity)

The opacity was determined by measuring the film absorbance at 210 and 500 nm using a UV spectrophotometer (Shimadzu UV-1800). The films were cut into rectangle pieces and directly placed in a spectrophotometer test cell. An empty test cell was used as the reference. The opacity of the films was calculated, dividing the values of absorbance (nm) by the thickness of the film (mm) (Wang et al 2013).

The color of the films was determined with a colorimeter (Hunter Lab system, model Miniscan XE, USA) operating with D65 (day light) and using the CIELab color parameters. The parameters L^* (luminosity), a^* (red–green) and b^* (yellow–blue) were determined. A white disk (L_0 : 97.5; a_0 : 0.13 and b_0 : 1.7) was used as a standard. The color difference (ΔE), compared to a white standard was calculated using the Eq. (3) (Rotta et al 2009).

$$\text{Eq (3): } \Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Where: $\Delta L^* = L^* - L_0$; $\Delta a^* = a^* - a_0$, $\Delta b^* = b^* - b_0$, where L_0 , a_0 , b_0 are the values of color of standard and L^* , a^* , b^* are the film color values.

Morphological properties

The morphological properties of the films containing bixin nanocapsules were studied using scanning electron microscopy (SEM). The images were obtained using a scanning electron microscope JSM 5800 LV, JEOL (Tokyo, Japan), connected to a secondary electron detector with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). The films were cut and pasted onto double sided conducting tape on an aluminum support and coated with a thin film of platinum using a Balted SCD 050 Sputter Coater (Scotia, New York, USA). The micrograph was obtained with a magnification of 1000 \times operating at an accelerating voltage of 5 kV. Several images were taken from various parts of the solid phase, to ensure that the final image taken was representative of the whole sample.

Thermal stability

The thermal stability of the films was studied using thermogravimetric analysis. This was performed under argon flow on a Shimadzu Instrument model TGA-502, with a heating rate of 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ from room temperature up to 600 $^{\circ}\text{C}$.

Testing Acceleration of Antioxidant Effect of Films

The method used to investigate the antioxidant effect has been described by Iahnke et al (2015) where the films were cut to 5 x 10 cm^2 ; with the aid of a sealing machine (Modelo F200, Fastvac, Brasil), bags were formed containing 7 g of sunflower oil. The liquid volume to surface area ratio was 0.07 g cm^{-2} . After packing the oil, the bags were stored in a chamber at 35 ± 2 $^{\circ}\text{C}$, exposed to fluorescent light at an average relative humidity of 75 %. Sunflower oil samples were collected at different times for 13 days to determine the peroxide value (PV), which quantifies the primary oxidation product using the method described for AOCS (1993). Sunflower oil samples encased in plastic packages (closed package - CP) and sunflower oil placed in a petri dish (without packaging - WP) were used as controls.

Three trials were carried out for each sample. The results were expressed as milliequivalents of oxygen per kilogram of oil (mEq.kg^{-1}). The *Codex Alimentarius* proposes that the PV for refined oils like sunflower oil should be up to 10 mEq kg^{-1} to be considered fresh.

Statistical Analysis

The results were evaluated by analysis of the variance (ANOVA) and Tukey test at a significance level of 0.05 using the software Statistica 12.0 (STATSOFT Inc., São Paul, Brazil).

Results and Discussion

Thickness and Mechanical Properties

Table 1 shows the mechanical properties and thickness of the films containing bixin nanoparticles. Note that the thickness of the developed films was not significantly different ($p > 0.05$), ranging from 97.2 ± 8.9 to 125.5 ± 14.3 μm .

The tensile strength (TS) is the measurement of maximum strength in the film under applied tensile stress. The analysis of the mechanical properties revealed that the film B2%, with a concentration of 2 % bixin nanocapsules, exhibited a significant increase ($p < 0.05$) in TS (14.40 ± 1.69 MPa), when compared to the standard film (12.13 ± 0.95 MPa). However, with concentrations higher than 2%, the films exhibited a significant decrease ($p < 0.05$) in TS down to 1.94 ± 0.37 MPa (B10%) ($p < 0.05$). An inverse effect was observed in relation to elongation at break (EB) (Table 1), where the film containing the bixin nanocapsules at a concentration of 2 % (B2%), exhibited a significant decrease ($p < 0.05$) in EB from 6.05 ± 0.72 % (film standard) to 2.19 ± 0.349 %. As for the films with concentrations higher than 2%, the films exhibited a significant increase ($p < 0.05$) in EB, with a maximum value of up to 34.34 ± 3.40 % for B10%.

A similar effect was observed by Norajit et al, (2010), where the incorporation of ginseng extracts in alginate films caused a significant reduction in the TS from 22.20 ± 4.00 MPa (control) to 8.05 ± 1.46 MPa and increased EB from 19.32 ± 6.81 % (control) to 27.95 ± 7.63 %. When adding α -tocopherol in chitosan-based films, Martins et al (2012) observed a significant decrease ($p < 0.05$) in the TS was observed (from 34.06 MPa (0 %) to 16.24 MPa (0.2 %) with the increased concentration of antioxidant; however, there was a similarly observed significant reduction ($P < 0.05$) of EB with the addition of α -tocopherol from 53.84 % (0 %) to 23.12 % (0.2 %).

In developing methylcellulose films incorporated with α -tocopherol nanocapsules (Noronha, de Carvalho, Lino, & Barreto, 2014), another group of researchers observed a

significant reduction ($p < 0.05$) in the TS from 57.82 ± 7.17 MPa (control film) to 23.19 ± 1.44 MPa, and EB significantly increased ($p < 0.05$) from 17.91 ± 1.78 (control film) to 30.03 ± 1.94 %. According to the same authors, these results suggested that the addition of hydrophobic substances modified their interactions with film-forming agents, which increased the spacing between macromolecule chains, reducing ionic and hydrogen bonding between the chains and inducing the development of structural discontinuities in the films.

Table 1 Thickness, Tensile strength (TS) and elongation at break (E) of standard films and films containing bixin nanocapsules

	Thickness (μm)	TS (MPa)	E (%)
Standard	95.3 ± 1.5^a	12.13 ± 0.95^b	6.05 ± 0.72^d
B2%	97.2 ± 8.9^a	14.40 ± 1.69^a	2.19 ± 0.349^e
B5%	116.2 ± 6.0^a	8.95 ± 1.32^c	15.55 ± 1.14^c
B8%	125.3 ± 10.6^a	2.06 ± 0.34^d	28.57 ± 3.44^b
B10%	125.0 ± 12.7^a	1.94 ± 0.37^e	34.34 ± 3.40^a

The results are represented as the means \pm standard deviation of ten repetitions. Values with the same letter in the same column are not significantly different ($p < 0.05$) for films with different concentrations of bixin nanocapsules per gram of starch - Standard (0 %), B2% (0.5 g / g), B5% (1.25 g / g), B8% (2 g / g) and B10% (2.5 g / g).

Water Vapor Permeability (WVP) and water Solubility

The water vapor permeability (WVP) can be seen in Table 2. It can be observed that the addition of bixin nanocapsules caused a gradual increase in WVP. However, this increase was significant ($p < 0.05$) in the film with higher bixin concentration, increasing from 0.207 ± 0.014 (standard film) to 0.273 ± 0.018 (B10%). This could be due to the influence of adding bixin nanocapsules over the cohesive forces of the film network, as observed in the mechanical properties results; this would improve water vapor transport through the film matrix. A similar effect was observed by Martins et al (2012) with a significant increase ($p < 0.05$) in WVP in chitosan-based films when adding α -tocopherol, from $6.02 \pm 0.40 \times 10^{-11}$ ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$) (0 % α -tocopherol) to $7.38 \pm 0.03 \times 10^{-11}$ ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$) (0.2 % α -tocopherol). Another factor suggesting that an increase in bixin nanocapsules concentration causes an increase in WVP, is the appearances of cracks observed by SEM in the films B8% and B10%.

It was observed (Table 2) that an increase in the concentration of bixin nanocapsules caused a decrease in the solubility of films when compared with the standard ($40.18 \pm 1.29\%$); however, the films B2% ($39.27 \pm 2.48\%$) and B5% ($36.53 \pm 2.16\%$) showed no significant difference ($p > 0.05$) when compared each other. In a study on cassava starch-based films, in varying the concentration of gelatin to improve the mechanical properties, the original solubility of the standard film decreased from 73 % with increasing concentration of gelatin (Tongdeesoontorn et al. 2012). Another study developing cassava starch-based films, by varying the concentration of glycerol, agar and Span 80, obtained values of solubility ranging from 24 % to 27 % (Maran et al 2013).

Lower solubility values were obtained for the films B8% ($18.93 \pm 0.71\%$) and B10% ($16.44 \pm 1.28\%$), which were significantly difference ($p < 0.05$) when compared with the standard biofilm. The bixin is naturally insoluble in aqueous solution; the nanoencapsulation employed by these authors contributed to increasing its solubility, thus making it promising for applications in active food packaging (Lobato et al. 2013). However, it should be noted that higher concentrations of bixin nanocapsules caused a decrease in solubility of the films. This is seen as a positive point when the objective of the film is food preservation in the presence of large amounts of water and with the release of antimicrobials or antioxidants (Ozdemir and Floros, 2008).

Table 2 Water vapor permeability (WVP) and solubility of standard films and films containing bixin nanocapsules

	Solubility (%)	WVP (g mm m ⁻² h ⁻¹ kPa ⁻¹)
Standard	40.18 ± 1.29^a	0.207 ± 0.014^b
B2%	39.27 ± 2.48^a	0.202 ± 0.008^b
B5%	36.53 ± 2.16^a	0.216 ± 0.007^b
B8%	18.93 ± 0.71^b	0.243 ± 0.010^{ab}
B10%	16.44 ± 1.28^b	0.273 ± 0.018^a

The results are represented as the means \pm standard deviation of the five repetitions. Values with the same letter in the same column are not significantly different ($p < 0.05$) for films with different concentrations of bixin nanocapsules per gram of starch: standard (0 g / g), B2% (0.5 g / g), B5% (1.25 g / g), B8% (2 g / g), B10% (2.5 g / g).

In α -tocopherol-chitosan-based films development by Martins et al. (2012) the authors found no significant difference ($P > 0.05$) in films solubility with the increasing antioxidant concentration, ranging 31.6 ± 0.9 % to 29.1 ± 1.5 %. The water solubility of films based on cassava starch and carnauba wax, developed by Chiumarelli and Hubinger (2012) ranged from 27.86 to 51.09 % which, according to the authors, are good values for applications with fresh-cut fruits. This way, the films B2% and B5% with respect to solubility have favorable properties for possible applications with fresh-cut fruits.

Optical Properties (color, opacity)

The color of the films (Table 3), showed significant increase ($P < 0.05$) in the values of ΔE^* with increasing concentration of bixin nanocapsules, 1.72 ± 0.02 for standard film up to 4131.65 ± 10.13 in B10%. Higher values of ΔE indicate films with a higher color intensity (Rotta et al 2009).

The increase in ΔE^* is mainly due to increases in parameter b^* CIELAB, corresponding to yellow, because of the presence of bixin nanocapsules. The nanocapsules developed by Lobato et al. (2013) exhibit yellow with the following CIELab coordinates of $L^* = 73.67 \pm 0.34$, $a^* = 6.01 \pm 0.24$ e $b^* = 48.60 \pm 0.95$. Compared to the pure bixin solution, prepared in hydrous ethanol (20 % ethanol and 80 % water), with parameters $L^* = 42.10 \pm 0.35$, $a^* = 13.54 \pm 0.98$ e $b^* = 25.50 \pm 2.2$, the bixin nanocapsules suspension presented an increase in luminosity and yellow, which was coupled with a decrease in red, which is directly reflected in the color of the films.

Table 3 Optical properties of color and opacity of standard biofilms and biofilms with the addition of bixin nanocapsules

	Color Parameters				Opacity A.mm ⁻¹	
	L^*	a^*	b^*	ΔE^*	210 nm	500 nm
Standard	95.4 ± 0.1^a	0.1 ± 0.0^d	2.47 ± 0.0^e	1.7 ± 0.0^d	14.3 ± 0.8^b	1.3 ± 1.0^c
B2%	94.7 ± 0.0^c	0.1 ± 0.0^d	9.30 ± 0.1^d	14.0 ± 0.3^d	19.4 ± 1.2^b	1.3 ± 0.6^c
B5%	95.0 ± 0.0^b	0.2 ± 0.0^c	13.24 ± 0.0^c	54.5 ± 0.1^c	37.3 ± 2.8^a	1.7 ± 1.4^b
B8%	95.4 ± 0.0^a	0.2 ± 0.0^b	15.14 ± 0.1^b	105.3 ± 2.3^b	38.9 ± 1.1^a	1.8 ± 1.2^{ab}
B10%	93.45 ± 0.1^d	0.5 ± 0.0^a	25.7 ± 0.0^a	4131.6 ± 10.1^a	41.6 ± 1.7^a	2.2 ± 2.3^a

The results are represented as the means \pm standard deviation of the five repetitions. Values with the same letter in the same column are not significantly different ($p < 0.05$) for films with different concentrations of bixin nanocapsules per gram of starch: B2% (0.5 g / g), B5% (1.25 g / g), B8% (2 g / g) and B10% (2.5 g / g).

In the analysis of opacity (Table 3), high absorbance values indicate less transparency and a high degree of opacity. The addition of bixin nanocapsules led to an improvement in blocking UV and visible light. In the visible region (500 nm), the absorbance increased significantly ($p < 0.05$) with increasing bixin nanocapsules concentration, from $1.3 \pm 1.0 A_{500} \text{ mm}^{-1}$ for standard film to $2.2 \pm 2.3 A_{500} \text{ mm}^{-1}$ for B10% film. Wang et al (2013) developed films of chitosan using polyphenols as the antioxidants and noted an increase in opacity with increasing concentrations of the antioxidants. These researchers obtained values for the absorbance at 600 nm ranging from $0.489 \pm 0.045 A_{600} \text{ mm}^{-1}$ for the standard biofilm to $2.898 \pm 0.158 A_{600} \text{ mm}^{-1}$ for the maximum concentration of antioxidants.

Similar behavior was observed in the UV region (210 nm), with increasing absorbance values (Table 3) from $14.35 \pm 0.78 A_{210} \text{ mm}^{-1}$ for the standard film up to $41.55 \pm 1.6 A_{210} \text{ mm}^{-1}$ for the B10% film. Martins et al (2012) reported that an increase of α -tocopherol concentration in chitosan-based films led to an improvement of the film barrier to UV and visible light. Films with 0.2% α -tocopherol and chitosan presented the lowest level of transmittance in the UV range (especially between 250 and 300 nm). Due to the high absorbance in the UV region, the films with the addition of bixin nanocapsules could be excellent barriers to prevent UV light-induced lipid oxidation when applied in food systems.

Morphological Properties

The scanning electron microscopy (SEM) results (Fig. 1) show that, for the studied magnification (1000 \times), the films containing bixin nanoparticles B2% (B), B5% (C) and the standard biofilm (A) presented compact and uniform structures without the presence of cracks or blistering. These results show that the addition of the nanocapsules at these concentrations did not alter the morphological properties of the starch films as far as we could observe at the magnification used. However, in the films B8% (D) and B10% (E), cracks appeared with increasing concentration of nanocapsules, which may explain the reduced strength of these films. According to Araujo-Farro et al (2010) films with compact and uniform structures indicate good interaction between the components of the film solution, in this case amylose,

amylopectin, glycerol, water and solution containing bixin nanocapsules in low concentrations.

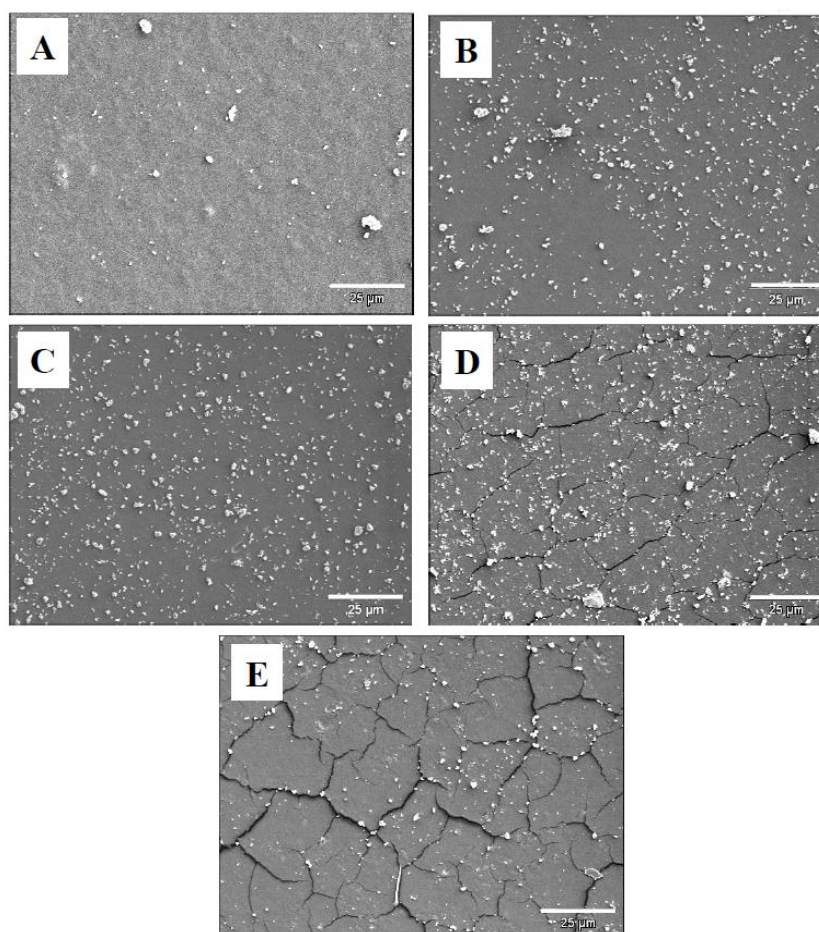


Fig. 1 Scanning Electron Microscopy (SEM) images of the biofilms standard (A) and containing bixin nanocapsules with concentrations of 2 % (B), 5 % (C), 8 % (D) and 10 % (E) (samples B2%, B5%, B8%, B10%, respectively)

Thermal Stability

The films were subjected to thermogravimetric analysis. The obtained curves are presented in Fig. 2. Weight loss was observed from room temperature to 150 °C, which is attributed to water desorption. The estimated amount of water desorbed was nearly 10 %. The major weight loss occurred between 250 and 350 °C for all samples, which is ascribed to the organic phase desorption. Therefore, all films show high thermal stability at least up to 270 °C. It was also possible to observe that the residual weight was higher with the gradual increase in concentration of nanocapsules, demonstrated by a higher amount of inorganic residue or carbonaceous material possibly originating from decomposition of high molecular weight polymers used in the preparation of the nanocapsules.

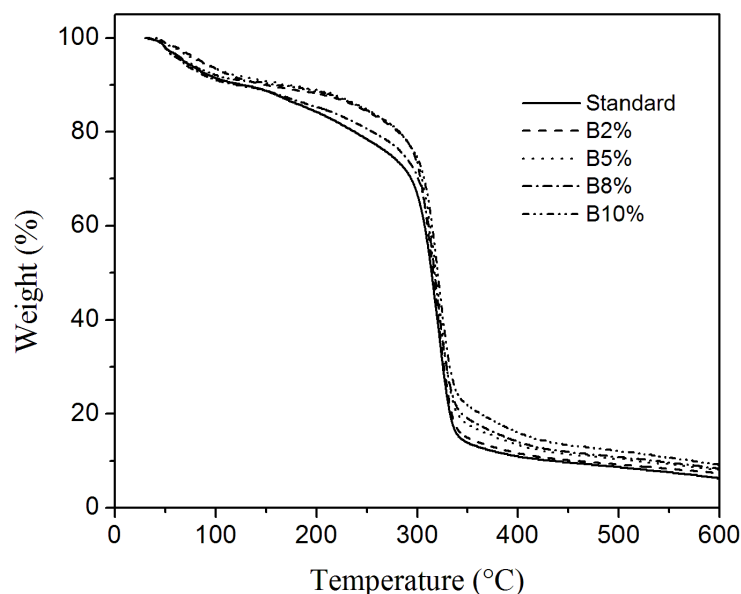


Fig. 2 Thermogravimetric Analysis (TGA) analyses of standard biofilms and biofilms containing bixin nanocapsules with concentrations of 2 % (B2 %), 5 % (B5 %), 8 % (B8 %) and 10 % (B10 %)

Acceleration of Oxidative Rancidity in Sunflower Oil

Fig. 3 presents the changes in the peroxide value (PV) all expressed in mEq kg^{-1} , of sunflower oil packaged in bags made with the films containing nanoencapsulated bixin and with the control film. All films retarded the lipid oxidation of sunflower oil during the study period; however, the samples not protected with film (WP and CP) oxidized rapidly, mainly starting from the sixth day. The sunflower oil used in the tests presented an initial PV of 1.66 ± 0.1 , increasing up to 93.6 ± 3.2 for the control without protection (WP) and up to 48.7 ± 3.2 for closed control (CP). The oils packaged with biodegradable films increased to 20.0 ± 0.7 (standard), 8.6 ± 0.1 (B2%), 6.2 ± 0.1 (B5%), 6.0 ± 0.2 (B8%) and 12.6 ± 0.5 (B10%) by the end of storage. The *Codex Alimentarius* proposes that the PV for refined oils like sunflower oil should be up to 10 mEq.kg^{-1} to be considered fresh; it could be observed that PV was significantly lower ($p < 0.05$) in oils packed in the films B2%, B5% and B8% than oils packed with the control packaging (WP and CP), which, even after the 13th day, presented PV below the rates indicated by the *Codex Alimentarius*.

When light and a sensitizing agent, such as chlorophyll, are present, the activation of oxygen in singlet oxygen can act as an important factor in the induction of oxidative

deterioration. The carotenoids may control the lipid oxidation by quenching singlet oxygen or inhibiting free radicals induced by lipid peroxidation (Rios et al 2007). Like other carotenoids, bixin is an efficient quencher of singlet oxygen and a scavenger of reactive species of oxygen and nitrogen. In the form of nanocapsules, the bixin, in addition to increasing stability, can be gradually released, acting as a natural antioxidant for foods (Lobato et al 2013). Even for the highest concentration of bixin nanocapsules in B10%, the PV was higher than those defined by *Codex Alimentarius*. This may be explained by the higher presence of cracks that were observed in the structure of this film, detected by SEM (Fig. 1), which increased the exchange of oxygen between the external medium and the lipid. The spontaneous reaction of atmospheric oxygen with lipids, known as auto-oxidation, is the most common process leading to oxidative deterioration. When developing films of low-density polyethylene (LDPE) added with marigold (*Tagetes erecta*) extract, Colín-Chávez et al. (2014) observed that bags made with these films showed a positive effect on soybean oil stability when used as packaging: the films were able to delay the oxidation of soybean oil under commercial conditions by tripling the time to reach the limit established for freshness by the *Codex Alimentarius*. Reis et al (2015) produced antioxidant food packaging films by incorporating mango pulp and yerba mate extract into a cassava starch matrix. The films were then used to pack palm oil (maintained for 90 days in storage) under accelerated oxidation conditions (63 % RH and 30 °C) in order to simulate a storage experiment. Palm oil packaged in these films exhibited a decreased oxidation rate, which was attributed to the yerba mate and mango pulp, depending on their concentrations. The evolution of PV of the contents indicated that, in general, the films with high concentrations of additives improved oil stability.

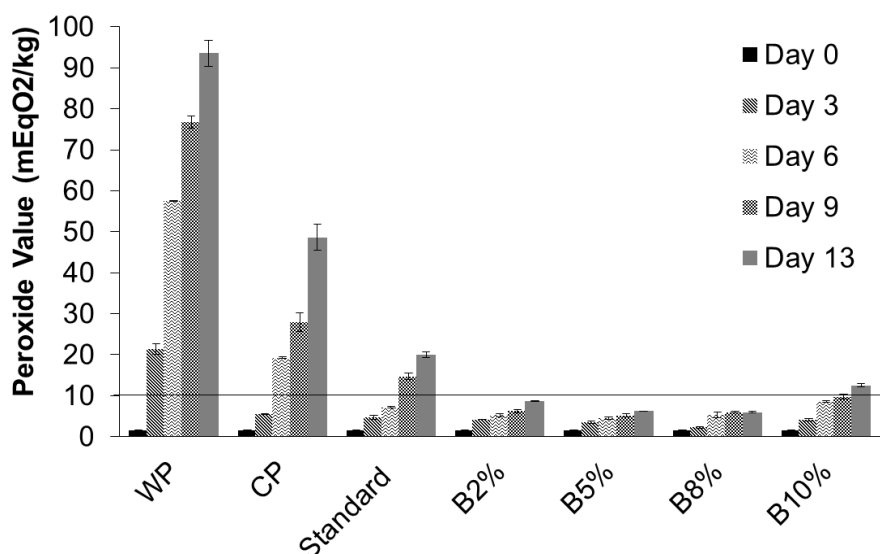


Fig. 3 Peroxide value (PV) of the sunflower oil protected by standard biofilms, biofilms containing bixin nanocapsules and of control samples without protection (without packaging - WP and closed package - CP)

Conclusion

The present study demonstrates the potential application of bixin nanocapsules in the development of biodegradable films for use in active food packaging. Intact, homogeneous and thermally stable films were obtained; however, it was observed that higher concentrations of the bixin nanocapsules affected the mechanical characteristics of the films, significantly decreasing the tensile strength (TS), although improving the elongation at break (EB) and leading to an improvement of the film barrier to UV and visible light. The packaging made from the films was able to delay the oxidation of sunflower oil under commercial conditions to remain below the limit established for freshness by the *Codex Alimentarius* ($PV < 10 \text{ mEq kg}^{-1}$). Thus, these films could be an advantageous alternative for food preservation and shelf life extension, helping to prevent lipid oxidation of fatty foodstuffs.

Acknowledgments

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for financial support, and Electronic Microscope Center (CME) of Federal University of Rio Grande do Sul UFRGS for technical assistance.

References

- AOCS, (1993). Peroxide value acetic acid-chloroform method—AOCS Official Method Cd 8-53. In: *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*, fourth ed. *American Oil Chemists' Society (AOAC)*,
- Araujo-Farro, P. C., Podadera, G., Sobral, P. J. A., & Menegalli, F. C. (2010). Development of films based on quinoa (*Chenopodium quinoa*, W) starch. *Carbohydrate Polymers*, 81(4), 839-848.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- Chen, C.-H., & Lai, L.-S. (2008). Mechanical and water vapor barrier properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsaio leaf gum films in the presence of plasticizer. *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1584-1595.
- Chiumarelli, M., & Hubinger, M. D. (2012). Stability, solubility, mechanical and barrier properties of cassava starch – Carnauba wax edible coatings to preserve fresh-cut apples. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 59-67.
- Colín-Chávez, C., Vicente-Ramírez, E., Soto-Valdez, H., Peralta, E., & Auras, R. (2014). The Release of Carotenoids from a Light-Protected Antioxidant Active Packaging Designed to Improve the Stability of Soybean Oil. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3504-3515.
- Dick, M., Pagno, C. H., Costa, T. M. H., Gomaa, A., Subirade, M., Rios, A. d. O., & Flôres, S. H. (2015). Edible films based on chia flour: Development and characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, 42455.
- Gomez-Estaca, J., Lopez-de-Dicastillo, C., Hernandez-Munoz, P., Catala, R., & Gavara, R. (2014). Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 35(1), 42-51.
- Iahnke, A. O. e. S., Costa, T. M. H., Rios, A. d. O., & Flôres, S. H. (2015). Residues of minimally processed carrot and gelatin capsules: Potential materials for packaging films. *Industrial Crops and Products*, 76, 1071-1078.
- Li, J.-H., Miao, J., Wu, J.-L., Chen, S.-F., & Zhang, Q.-Q. (2014). Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. *Food Hydrocolloids*, 37(0), 166-173.

- Lobato, K. B. d. S., Paese, K., Forgearini, J. C., Guterres, S. S., Jablonski, A., & Rios, A. d. O. (2013). Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. *Food Chemistry*, *141*(4), 3906-3912.
- López-de-Dicastillo, C., Alonso, J. M., Catalá, R. n., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2010). Improving the Antioxidant Protection of Packaged Food by Incorporating Natural Flavonoids into Ethylene–Vinyl Alcohol Copolymer (EVOH) Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(20), 10958-10964.
- López-de-Dicastillo, C., Gómez-Estaca, J., Catalá, R., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2012). Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. *Food Chemistry*, *131*(4), 1376-1384.
- Maran, J. P., Sivakumar, V., Sridhar, R., & Thirugnanasambandham, K. (2013). Development of model for barrier and optical properties of tapioca starch based edible films. *Carbohydrate Polymers*, *92*(2), 1335-1347.
- Martins, J. T., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2012). Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, *27*(1), 220-227.
- Norajit, K., Kim, K. M., & Ryu, G. H. (2010). Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering*, *98*(3), 377-384.
- Noronha, C. M., de Carvalho, S. M., Lino, R. C., & Barreto, P. L. M. (2014). Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with α -tocopherol nanocapsules. *Food Chemistry*, *159*(0), 529-535.
- Ozdemir, M., & Floros, J. D. (2008). Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties. *Journal of Food Engineering*, *84*(1), 116-123.
- Pagno, C. H., Costa, T. M. H., de Menezes, E. W., Benvenuto, E. V., Hertz, P. F., Matte, C. R., Tosati, J. V., Monteiro, A. R., Rios, A. O., & Flôres, S. H. (2015). Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity. *Food Chemistry*, *173*(0), 755-762.
- Park, H.-Y., Kim, S.-J., Kim, K. M., You, Y.-S., Kim, S. Y., & Han, J. (2012). Development of Antioxidant Packaging Material by Applying Corn-Zein to LLDPE Film in Combination with Phenolic Compounds. *Journal of Food Science*, *77*(10), E273-E279.

- Pelissari, F. M., Andrade-Mahecha, M. M., Sobral, P. J. d. A., & Menegalli, F. C. (2013). Comparative study on the properties of flour and starch films of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). *Food Hydrocolloids*, *30*(2), 681-690.
- Reis, L. C. B., de Souza, C. O., da Silva, J. B. A., Martins, A. C., Nunes, I. L., & Druzian, J. I. (2015). Active biocomposites of cassava starch: The effect of yerba mate extract and mango pulp as antioxidant additives on the properties and the stability of a packaged product. *Food and Bioproducts Processing*, *94*(0), 382-391.
- Rios, A. d. O., Antunes, L. M. G., & Bianchi, M. d. L. P. (2009). Bixin and lycopene modulation of free radical generation induced by cisplatin–DNA interaction. *Food Chemistry*, *113*(4), 1113-1118.
- Rios, A. d. O., Mercadante, A. Z., & Borsarelli, C. D. (2007). Triplet state energy of the carotenoid bixin determined by photoacoustic calorimetry. *Dyes and Pigments*, *74*(3), 561-565.
- Rotta, J., Ozório, R. Á., Kehrwald, A. M., de Oliveira Barra, G. M., de Melo Castanho Amboni, R. D., & Barreto, P. L. M. (2009). Parameters of color, transparency, water solubility, wettability and surface free energy of chitosan/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. *Materials Science and Engineering: C*, *29*(2), 619-623.
- Salarbashi, D., Tajik, S., Shojaee-Aliabadi, S., Ghasemlou, M., Moayyed, H., Khaksar, R., & Noghabi, M. S. (2014). Development of new active packaging film made from a soluble soybean polysaccharide incorporated *Zataria multiflora* Boiss and *Mentha pulegium* essential oils. *Food Chemistry*, *146*, 614-622.
- Silva-Weiss, A., Ihl, M., Sobral, P. J. A., Gomez-Guillen, M. C., & Bifani, V. (2013). Natural Additives in Bioactive Edible Films and Coatings: Functionality and Applications in Foods. *Food Engineering Reviews*, *5*(4), 200-216.
- Souza, A. C., Benze, R., Ferrão, E. S., Ditchfield, C., Coelho, A. C. V., & Tadini, C. C. (2012). Cassava starch biodegradable films: Influence of glycerol and clay nanoparticles content on tensile and barrier properties and glass transition temperature. *LWT - Food Science and Technology*, *46*(1), 110-117.
- Souza, A. C., Goto, G. E. O., Mainardi, J. A., Coelho, A. C. V., & Tadini, C. C. (2013). Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: Antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. *LWT - Food Science and Technology*, *54*(2), 346-352.

- Tongdeesoontorn, W., Mauer, L. J., Wongruong, S., Sriburi, P., & Rachtanapun, P. (2012). Mechanical and Physical Properties of Cassava Starch-Gelatin Composite Films. *International Journal of Polymeric Materials*, 61(10), 778-792.
- Wang, L., Dong, Y., Men, H., Tong, J., & Zhou, J. (2013). Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 35-41.

ARTIGO 4 Chitosan edible coating in delaying post-harvest ripening of tomato fruit

Abstract

Chitosan is a biopolymer with great potential as an ingredient for the preparation of edible films and coatings for different food applications. The aim of this study was to evaluate the effect of chitosan coating in physical and chemical quality characteristics and bioactive compounds of tomatoes during 14 days of storage at 20°C. The edible coating was prepared in lactic acid 1 % (v/v) with Chitosan 1.5 % (w/v) at 45 °C and Tween 20 (0.1 % v/v). The analyzes carried out on tomato fruit were: weight loss, total soluble solid (TSS), firmness, and titratable acidity (TA), respiration rate, ethylene production and quantification of carotenoids and phenolics by HPLC. Coated fruit delayed the ripening process by a decrease of the rate of respiration and ethylene production, as well changes in weight, firmness, and TSS concentration. In addition, the coated fruit showed a delayed peak of lycopene and β -carotene accumulation and degradation of phenolic compounds during storage, compared to uncoated control. The results suggest that chitosan-based coatings are effective in delaying the ripening process of tomatoes during storage at 20 °C, without any negative effects on postharvest quality. Thus, can be a promising tool for a commercial use to prolong the storage of tomatoes fruit.

Keywords: Postharvest quality, Chitosan coating, Refrigerated storage, Tomato

1 Introduction

Deterioration process of fruit and vegetables occurring in postharvest depend on different factors, as pathogen attacks, physiological disorders and mechanical damages (Kader 2005). Moreover, in the storage stage, there is a gradual loss of nutraceutical quality after harvest. Many different tools are currently used in order to improve shelf life and preserve food quality, such as modified atmosphere packaging, storage at low temperature, chemical treatments, irradiation with selected wavelengths (Castagna et al., 2014; Jagadeesh et al., 2011; Xanthopoulos et al., 2012). In the last decade use of edible coatings (ECs) has attracted interest from researchers and industry as a promising technology to prolong the shelf life of particularly perishable foods. ECs act as protective barriers, decreasing transpiration rate and gas transfer across the product surface. Thus induces the modification in the internal

atmosphere which, in turn, reduces respiration, the oxidative metabolism and ethylene emission (Dhall 2013; Falguera et al., 2011; No et al., 2007). Moreover, ECs may inhibit the growth of microorganisms due their natural antimicrobial activity as well as by sealing small wound which may be the point of attack by pathogens (Han et al., 2004). Finally, ECs may be employed as effective carriers of bioactive ingredients which increase the functional potential of the bio-based coatings (Bourbon et al., 2011), as vitamins antioxidants, antimicrobial peptides and essential oils (Han et al., 2004; Hosseini et al., 2013; Xing et al., 2011).

Among different materials, chitosan is considered the best edible coating polymer due to the absence of toxicity and its high biodegradability and antimicrobial activity (No et al., 2007). Chitosan derives from deacetylation of chitin, the principal component of crustacean shell and of some fungi, and represents the second most abundant biopolymer in nature after cellulose. Chitosan coating has low CO₂ and O₂ permeability what can modify the internal atmosphere composition of the product, and consequently, retard decay and prolong its shelf life (No et al., 2007). Chitosan-based coatings have been used to extend the shelf life of several fruit e. g. strawberry (Petriccione et al., 2015), tomato (Elghaouth et al., 1992), apple (El-Ghaouth et al., 2000), peach (Li and Yu, 2001), and table grape (Romanazzi et al., 2012).

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is a warm-season crop, in highest ranking compared to other crops in the contribution of Mediterranean diet nutrients. Indeed, tomato represents the main source of lycopene (around 76 %) and of β -carotene (around 17.2 %) in the Italian diet, and also contains a good amount of polyphenols (Frusciante et al., 2007).

Although the effectiveness of chitosan in prolonging shelf life has been reported by numerous researchers, there are few studies focused on nutraceutical quality of chitosan-coated fruit. Currently, an increasing interest by consumers is related not only to cost, convenience, and visual appearance but also quality and healthy properties of food. As a consequence the maintenance of bioprotective phytochemicals until food consumption is of great importance.

The present research aimed to evaluate the effectiveness of chitosan coating in delaying post-harvest ripening of tomato fruit and also decrease nutraceuticals losses during its storage. For this, ethylene and CO₂ emission, some physical and chemical fruit parameters and nutraceutical quality (carotenoid, phenolic and flavonoid content and profile) were analyzed during 14 days of conservation.

2 Materials and Methods

2.1 Tomato Fruit, Chitosan Treatment, and Storage Condition

Tomato (*Solanum lycopersicum* L., cv Sir Elyan) fruit was purchased from a local farm (Poggiomarino, Naples, Italy) and was selected by size and ripening stage (turning) and absence of visible damages. Fruit was randomly divided into two groups: for chitosan coating treatment and for control.

Chitosan (Galeano s.r.l., Carmignano, Prato, Italy) solution (1.5 %, w/v) was prepared in 1 % (v/v) lactic acid at 45 °C under magnetic stirring until complete dissolution. Tween 20 (0.1 % v/v) was added to solution and pH was adjusted to 5.0 with NaOH (0.1 M). After cooling at 35 °C tomato fruit were immersed in the solution for 1 min and dried at room temperature. Control fruit was dipped in distilled water. Fruit from both treatments ripened at 20 °C in climatic chambers (R.H. 85 %), in a total of 25 fruit for each one. Five fruit per treatment were collected at different times 0 (T0), 4 (T1), 7 (T2), 11 (T3) and 14 (T4) days and were used for determination of fruit quality parameters, respiration rate and ethylene determination. Samples for phenols and flavonoids analyzes were freeze-dried.

2.2 Determination of Fruit Quality Parameters

Fruit firmness was measured by digital penetrometer with 8 mm probe (Model 53205; TR, Forlì, Italy), on the equatorial zone of two opposite sides of each fruit, after removing of skin small disc. Values were expressed in Newton (N). Total soluble solid content (TSS) was measured by a digital refractometer (Digital Brix Refractometer DBR 35) and expressed as percent of soluble solids (%). Titratable acidity (TA) was determined by titration of 10 mL of juice with 0.1 mol L⁻¹ NaOH to an endpoint of pH 8.2 by automatic titrator (Model T80/20; Schott, Mainz, Germany), and expressed as percentage citric acid (%). The percentage of weight loss was calculated in comparison with initial weight.

2.3 Respiration Rate and Ethylene Production

The rates of respiration (CO₂ production) and ethylene emission were measured according to Pacifici et al., (2013). Healthy fruit was individually incubated in sealed jars (1.2 L) at room temperature (22 °C) for 30 min. Headspace samples (2 mL) were withdrawn with a

hypodermic syringe in a gas chromatography (HP5890; Hewlett-Packard, Menlo Park, CA, USA) equipped with a flame ionisation detector (FID) and thermal conductivity detector (TCD), respectively for ethylene and CO₂, and stainless-steel column (150 × 0.4 cm internal diameter, packed with Hysep T; Agilent Technologies, Milan, Italy). Column and detector temperatures were 70 °C and 350 °C, respectively. Nitrogen was used as carrier gas at a flow rate of 30 mL min⁻¹ and 45 mL min⁻¹ for ethylene and CO₂ respectively. Quantification was performed with an external standard and results were expressed on a fresh weight basis

2.4 Extraction and Quantification of Carotenoids

Carotenoids were extracted as reported by Heredia et al. (2010). Briefly, samples (0.5 g dry weight) were extracted in an ice bath under stirring for 30 min with 6 mL of methanol:acetone:hexane (1:1:1, v/v/v) under dark conditions. After addition of 2 mL of milliQ water to allow separation of hydrophilic and hydrophobic phases, samples were centrifuged (2 min / 6.000 g). The upper non-polar hexane phase containing carotenoids was collected. The extraction procedure was repeated until complete discoloration of the pellet. The combined extracts were concentrated under vacuum and filtered through 0.2 µm filters (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) and immediately subjected to HPLC analysis as follows. Separation was performed at room temperature by a Spectra System P4000 HPLC, equipped with a UV 6000 LP photodiode array detector (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) using a Phenomenex Prodigy LC-18 RP column (5 µm particle size, 250 x 4.6 mm, Phenomenex Italia, Castel Maggiore, Italy). The pigments were eluted at a flow rate of 1 mL min⁻¹ using acetonitrile as solvent A, and methanol:hexane:dichloromethane 1:1:1 v/v/v as solvent B, according to the following gradient: 0 min: 82 % A, 18 % B; 20 min: 76 % A, 24 % B; 30 min: 58 % A, 42 % B; 40 min: 39 % A, 61 % B. The column was allowed to re-equilibrate in 82 % solvent A for 5 min before the next injection. Pigments were detected by their absorbance at 445 nm. Lutein, lycopene, and β-carotene were quantified using standard curves of commercial standards (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

2.5 HPLC Analysis of Phenolics and Flavonoids

Freeze dried samples (0.5 g dry weight) were extracted using a total of 45 mL of methanol: water (80:20, v/v). The solution was sonicated in an ultrasonic bath for 30 min and

then extracted for 30 min on a magnetic stirrer. The supernatant was recovered by centrifugation (15 min / 14000g) at 4 °C. The extraction procedure was repeated two additional times. The collected extracts were reduced to 8 mL by rotavapor, filtered with 0.45 µm Minisart filters (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany).

Separation was performed by a Spectra System P4000 HPLC, equipped with a UV 6000 LP photodiode array detector (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) using a Phenomenex Prodigy LC-18 RP column (5 µm particle size, 250 x 4.6 mm, Phenomenex Italia, Castel Maggiore, Italy). Phenolics and flavonoids were eluted at a flow-rate of 1 ml min⁻¹ using 5 % formic acid in water as solvent A, and 5 % formic acid in methanol as solvent B, according to the following gradient: 0 min: 82 % A, 18 % B; 20 min: 76 % A, 24 % B; 30 min: 58 % A, 42 % B; 40 min: 39 % A, 61 % B, followed by 5 min re-equilibration in the initial condition before the next injection. The detector was set at 340 nm. Chlorogenic, caffeic and ferrulic acids, quercetin, rutin and kaempferol, were quantified using standard curves of commercial standards (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO).

2.6 Statistical Analysis

Data were subjected to one-way ANOVA using the NCSS 2000 (NCSS Statistical Software, Kaysville, UT, USA) software. Significant differences between chitosan-coated and control fruit for each time of sampling were calculated using, at least, three replicates according to Tukey's test ($P \leq 0.05$).

3 Results and Discussion

3.1 Determination of Fruit Quality Parameters

The Fig. 1 shows the changes in quality characteristics of control (uncoated) and chitosan-coated fruit. Both uncoated and chitosan-coated tomatoes (Fig. 1A) showed an increase in weight loss percentage during the storage period. However, on the 14th day of storage, coated sample showed a significantly lower weight loss as compared to the control sample (-16 %).

Changes in weight loss are in agreement with evolution detected in fruit firmness (Fig. 1B). A marked reduction of this parameter during the storage period was also observed, being more pronounced in control fruit. In particular, at 11th storage day, chitosan-coated fruit was

significantly firmer compared to control ones (+40 %). The weight loss during storage period could be related to reduction of the water content, and it is mainly associated with respiration and moisture evaporation through the skin. Furthermore, according to some authors, the water loss also is associated with fruit firmness, where greater is water loss, lower is firmness values observed (Garcia et al., 2014; Vargas et al., 2012).

Factors such as storage temperature and water vapor pressure gradient between fruit tissue and ambient atmosphere affect this process. So it is recommended to use low temperature and low humidity for tomato storage in order to minimize dehydration. The use of chitosan-based edible coatings can be advantageous once they act not only as barriers, reducing water transfer and protecting fruit skin from mechanical injuries, but also as a sealing for small wounds or eruptions on skins and thus delaying dehydration and infections (Garcia et al., 2014).

A study evaluating the effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of papaya fruit (*Carica papaya* L.) during five weeks cold storage, showed that the chitosan coating significantly reduced the weight loss and firmness during storage time. After five weeks, fruit from control treatment presented approximately 10 % of weight loss compared with 4 % of coated fruit (chitosan coatings 1.5 %). Regarding the loss of firmness, they also showed approximately 20 N of firmness compared with 90 N of coated fruit (chitosan coatings 1.5 %) (Ali et al., 2011). Similar results were observed by Oz and Ulukanli, (2012), with the application of the edible starch-based coating on pomegranate arils (*Punica granatum* L.) stored at 20 °C for 12 days. These authors observed that weight loss of fruit continuously increased from beginning to the end of storage and reported statistically significant differences between control (6 % weight loss) and coating treatments (2 % weight loss) after 12 days of storage.

Chitosan coating did not affect the titratable acidity of tomatoes, as shown in Fig. 1C. Values of this parameter slightly increased until the 7th day of storage, and, thereafter, there was a gradual decline in acidity for control and also for coated tomatoes. Similar results were observed by other authors, who investigated changes brought about by starch-based edible coatings on quality parameters of tomatoes stored at room temperature for twenty days. The authors noticed an increase in acidity of tomatoes until the 4th day of storage, what was attributed to the period of maturation prior to the ripening of tomatoes. After, it was reported a decline in acidity of both coated and uncoated tomatoes which was related to the increase in ethylene production and respiration rate during the advent of ripening (Das et al., 2013).

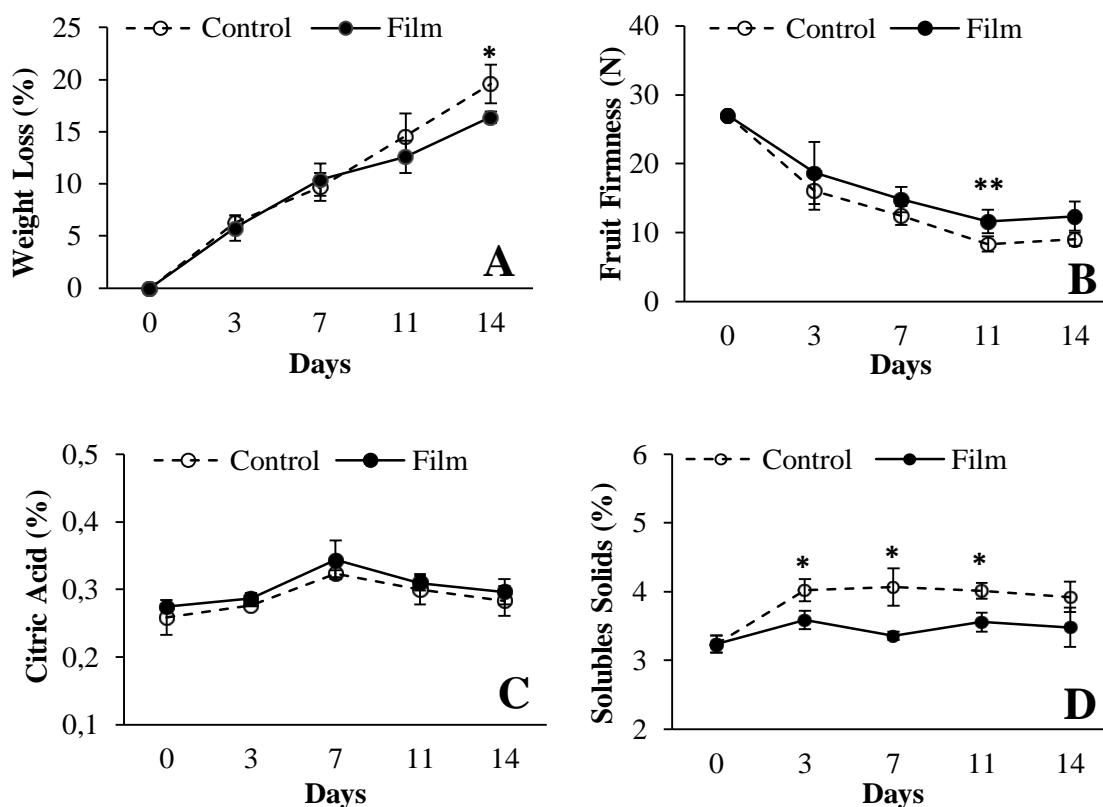


Fig. 1 Quality parameters: (A) Weight loss, calculated in comparison with the initial weight (B) Fruit firmness expressed in newtons (N), (C) titratable acidity expressed as percentage citric acid (%) and (D) total soluble solid (TSS) content expressed as percent of soluble solids (%), of control and chitosan-coated tomatoes during storage period. For each time, significant differences between chitosan-coated and control fruit are indicated by * ($P \leq 0.05$), ** ($P \leq 0.01$), *** ($P \leq 0.001$), according to one-way ANOVA followed by Tukey's test.

Total soluble solids content (TSS) of tomato samples from control and coated treatments during storage is presented in Fig. 1D. Fruit of control sample presented a significant increase in TSS content compared to coated fruit after the 3rd day of storage ranging from 7 to 18 % of soluble solids. In tomatoes coated with rice starch-based edible coating, Das et al. (2013) observed that the increase in TSS with storage was significantly higher in the control fruit. According to same authors, change in TSS content is correlated with hydrolytic changes in starch occurring during postharvest ripening. In tomatoes, conversion of starch to sugars is an important index of ripening. The degradation of cell wall polysaccharides (hemicellulose and pectins) during storage leads to the release of oligosaccharides which can influence fruit ripening (Das et al., 2013). In another study, Gol et al., (2013) investigated the efficacy of carboxymethyl cellulose (CMC), hydroxypropylmethyl

cellulose (HPMC) and composites with chitosan (CH) coatings on shelf-life and overall quality of strawberry fruit. They observed that during 4 days of storage, uncoated samples exhibited higher TSS content compared to all other coated samples.

3.2 Respiration Rate and Ethylene Production

The ethylene production and rate of respiration in fresh fruit and vegetables are considered good indicators in the determination of storage life. The highest value of ethylene emission was observed at time zero (T₀), corresponding to turning stage. However, during ripening progress, ethylene emission was progressively reduced, reaching the lowest value at the end of storage (Fig. 2A). Chitosan-coated tomatoes presented lower ethylene compared to control, ranging from 40 % to 49 % after three days of storage. Respiration rate did not change during storage while a significant decrease was observed in chitosan treatment at day 11 (-21 %) (Fig. 2B). A recent study evaluating effects of Arabic gum-based edible coating on tomato fruit during storage, Ali et al., (2013) observed a decrease in respiration rate in fruit treated with highest concentrations of Arabic gum (15 and 20 % gum arabic). Uncoated fruit and treated fruit with 5 % gum arabic, showed an increase in respiration rate, with a peak production after 8 days followed by a continuous decrease until the end of the storage period. A similar trend was shown by ethylene production in fruit from control treatment which reached a peak after 8 days followed by decreased during the storage period. This decrease in respiration rate and ethylene production of coated fruit suggests edible coating exerted a barrier to gaseous exchange.

In another study, alginate or zein as edible coatings was applied in tomato in order to maintain quality parameters during postharvest storage (Zapata et al., 2008). The authors observed that ethylene production and respiration rate initially increased in control fruit with storage time, with the occurrence of climacteric peak after 2 days. Conversely, in coated tomatoes a significant reduction in both ethylene production and respiration rate was detected. According to Ali et al., (2010), coatings provided an excellent semi-permeable film around the fruit, modifying the internal atmosphere by reducing O₂ and/or elevating CO₂ and suppressing ethylene production.

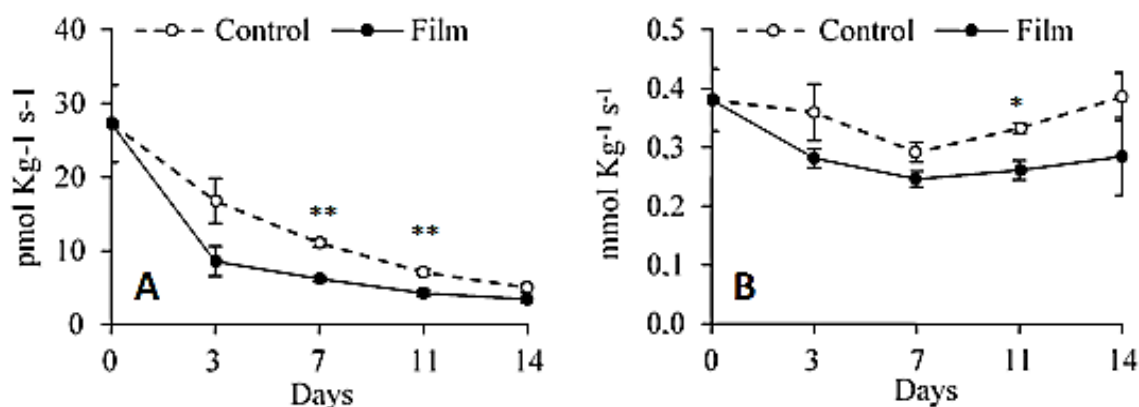


Fig. 2 (A) Ethylene and (B) CO₂ emission of control and chitosan-coated tomatoes during storage period. For each time, significant differences between chitosan-coated and control fruit are indicated by * ($P \leq 0.05$), ** ($P \leq 0.01$), *** ($P \leq 0.001$), according to one-way ANOVA followed by Tukey's test.

3.3 Carotenoids

The carotenoids participate in a wide range of physiological processes, including plant growth and development, and their production is related to plant physiology besides responses to environmental stimuli (Nisar et al., 2015).

It can be observed that concentrations of precursors phytoene (Fig. 3A) and phytofluene (Fig. 3B) increased with storage time, and coated fruit showed significantly lower concentrations of phytoene and phytofluene as compared to uncoated control fruit. The control fruit exhibited peak production at 11th day of storage, while in coated fruit this peak occurred at 14th day, being more evident for phytoene. Therefore, chitosan coating acted delaying peak production of phytoene and phytofluene accumulation for three days. Phytoene and phytofluene are precursors for synthesis and formation of other carotenoids, such as lycopene; a delay in production means delay in physiological processes of fruit (Bramley, 2002).

Storage time influenced the lycopene concentration, increased during storage in all fruit (Fig. 3C). However, while in control fruit lycopene showed a peak production at the 11th day, its production was slowed down in chitosan-coated fruit after 3 days of storage, as compared to control. This result shows a delayed production of lycopene in coated fruit. In fact, the control fruit exhibited a continuous increase in production of b-carotene until the 7th day of storage, followed by a subsequent decrease, while coated fruit reached the maximum

concentration only at 11th day of storage (Fig. 3D). The concentration of lutein (Fig. 3E) shows similar behavior in both samples (coated and uncoated), with a decrease until at the 3rd day of storage, followed by constant levels until the end of the experiment.

Phytoene and phytofluene are considered key metabolites, for being precursors of all others carotenoids. They are found together with lycopene in tomato products, although their individual concentrations are typically lower (Melendez-Martinez et al., 2015). A delay in their production may consequently lead to delayed synthesis of other carotenoids. The results in this work, are in accordance with the findings of Tasdelen et al., (1998), in their study with edible coatings composed of sucrose esters of fatty acids, sodium carboxymethyl cellulose and monodiglycerides of fatty acids, lycopene synthesis was reduced significantly in coated tomatoes.

Similarly, in a research which aimed to evaluate the effect of Arabic gum-based EC on antioxidant properties of tomato fruit during storage, Ali et al., (2013) observed that lycopene content in untreated control increased sharply and reached a maximum after 12 days of storage, while in coated fruit ethylene peak occurred after 16 days of storage. The earlier increase in total carotenoids detected in control suggested an earlier ripening as compared to fruit treated with highest concentrations of Arabic gum, which gave better results in terms of quality and shelf-life.

In tomato fruit, beginning of ripening is triggered by a dramatic increase in ethylene production, correlated with rapid accumulation of β -carotene and lycopene (Alba et al., 2005). Decrease in ethylene emission influences fruit physiology, causing a delay in ripening and, therefore, in the production of bioactive compounds (Fraser and Bramley, 2004; Liu et al., 2015). As previously observed in this study, use of chitosan coating decreased the ethylene production.

Moreover, a similar experiment carried out in our laboratory indicated that, during 14-days-storage, abscisic acid (ABA) continued to increase in control skin, while it remained fairly constant in the chitosan-coated samples. In fresh fruit, after 7 days of storage, higher ABA levels were detected in control fruit as compared to chitosan-treated ones (data not shown). ABA is reported to play a crucial role in regulating fruit ripening, acting upstream of ethylene (Zhang et al., 2009). These preliminary data reinforce the conclusion that chitosan acts by delaying tomato ripening, thus allowing a longer conservation of the produce.

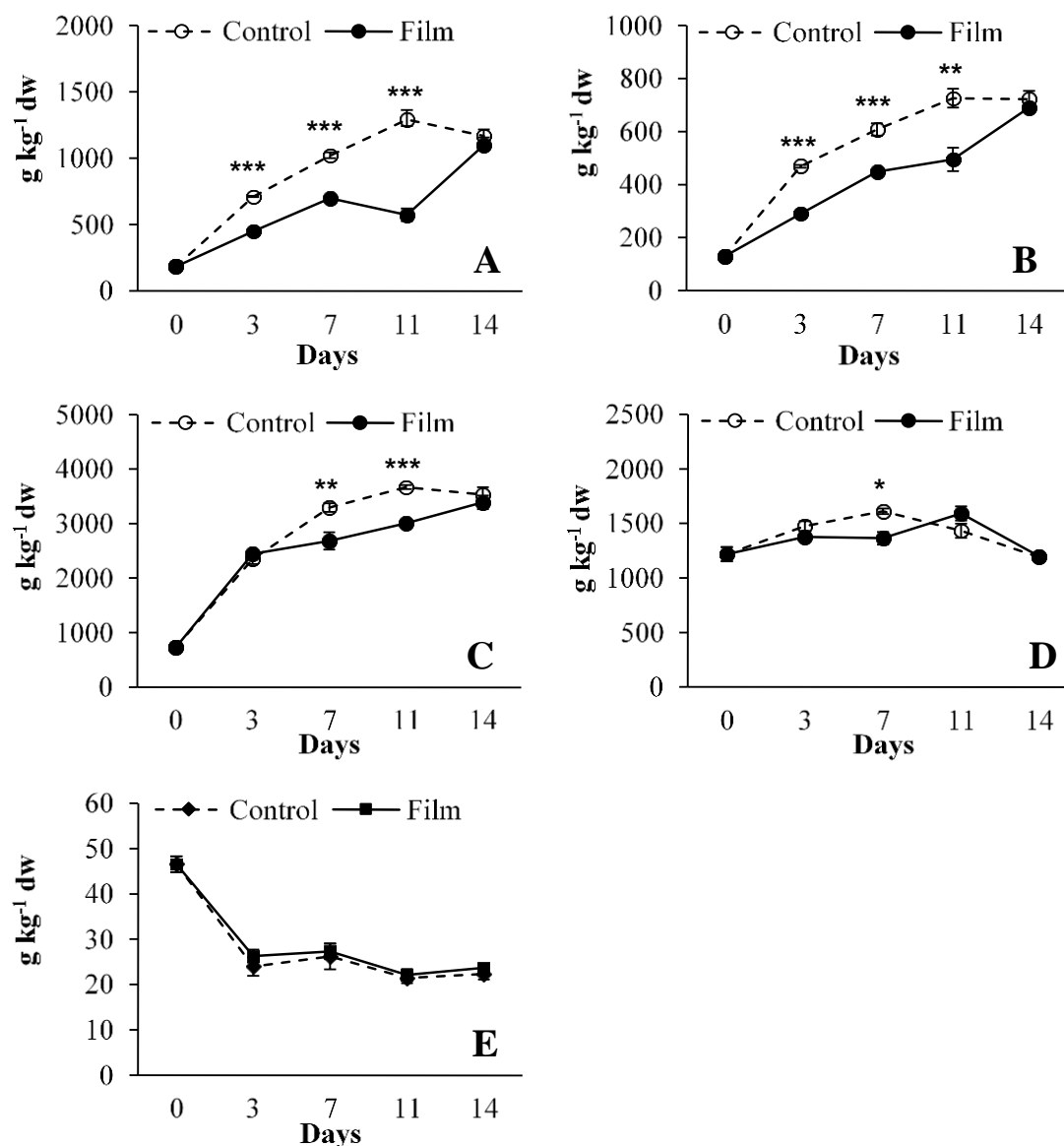


Fig. 3 Concentration of phytoene (A), phytofluene (B), lycopene (C), b-carotene (D) and lutein (E), expressed as g kg⁻¹ dry weight (d.w), of control tomatoes and chitosan-coated tomatoes, during storage peroxide. Data represent the mean of 3 replicates \pm DS. For each time, significant differences between chitosan-coated and control fruit are indicated by * ($P \leq 0.05$), ** ($P \leq 0.01$), *** ($P \leq 0.001$), according to one-way ANOVA followed by Tukey's test.

3.4 HPLC analysis of phenolics and flavonoids

The tomatoes contain a lot of phenolic compounds, which enhance its antioxidant properties. Some studies have shown that flavonoids as kaempferol, quercetin and rutin and phenolic acids, such as chlorogenic, caffeic and ferulic, are major phenolics found in fruit of

tomatoes (García-Valverde et al., 2013; Ghorbani et al., 2012; Martinez-Valverde et al., 2002; Periago et al., 2009).

Chlorogenic acid (Fig. 4A) showed the highest concentration at T0, followed by a reduction in all treatments. However, after 7 days of storage, chlorogenic acid was 85% higher in chitosan-coated fruit when compared to respective control. Similarly, to chlorogenic acid, also caffeic (Fig. 4B) and ferulic (Fig. 4C) acids exhibited highest values at T0. In control fruit, both compounds underwent to a continuous reduction starting from day 3 (caffeic acid) or day 0 (ferulic acid) throughout all storage time, while in coated fruit such a decrease was delayed and started after 7th day of storage. The different trend of accumulation between control and coated fruit accounted for differences observed at specific days of storage. In particular, caffeic acid of coated tomatoes was 22 % lower and 33 % higher at day 3 and 7, respectively, as compared to respective controls. Similarly, ferulic acid, showed significantly lower (-24 %) and higher (86 %) concentration at day 3 and day 7, in respect to control fruit.

Rutin (Fig. 4D) and quercetin (Fig. 4E) concentration did not present great differences during storage. The addition of chitosan-based coatings induced an increase in rutin concentration at day 7 (22 %) and in quercetin concentration at the end of the storage period (15 %), after an initial decrease at day 3 (-35 %). For kaempferol (Fig. 4F), the chitosan-based coating induced a negative effect, its concentration being 30% and 40% lower than respective controls at days 3 and 11.

The phenolic compounds, such as phenolic acids and flavonoids, contribute to a variable extent to the antioxidant capacity of tomato and tomato products. A significant reduction in the concentration of phenolic acids during storage time was observed in this work. Generally, this reduction may be associated with fruit maturation stage. According to some authors, a number of phenolics is affected by variety and ripening stages, increasing from green to the intermediate stage, decreasing afterward in red ripe stage (Dumas et al., 2003; García-Valverde et al., 2013). However, this reduction was delayed in chitosan-coated fruit. As previously described presence of coatings decreases biological processes of fruit, slowing down its metabolism.

Evaluating the effect of edible coatings (carnauba and mineral oil) on bioactive compounds of tomato fruit, Davila-Avina et al., (2014) observed a significant effect on total phenolic content, coated fruit showing significantly lower content than control. According to authors, edible coatings could induce abiotic stress on produce, modifying its metabolism and affecting the production of secondary metabolites such as phenolic and flavonoid compounds.

In another study Ali et al., (2013), evaluating the effect of Arabic gum-based edible coating on tomato fruit during storage, observed that untreated tomatoes showed the maximum content of total phenolics after 8 days of storage and thereafter, a slow decrease until the end of storage period. However, fruit treated with Arabic gum showed a slight but continuous increase in total phenolic content during storage. The low phenolic content, as well as the decline after 8 days in untreated control fruit, might be associated with higher rate of respiration, compared to coated tomatoes, which resulted in loss of total phenolic content due to the degradation of some phenolic compounds.

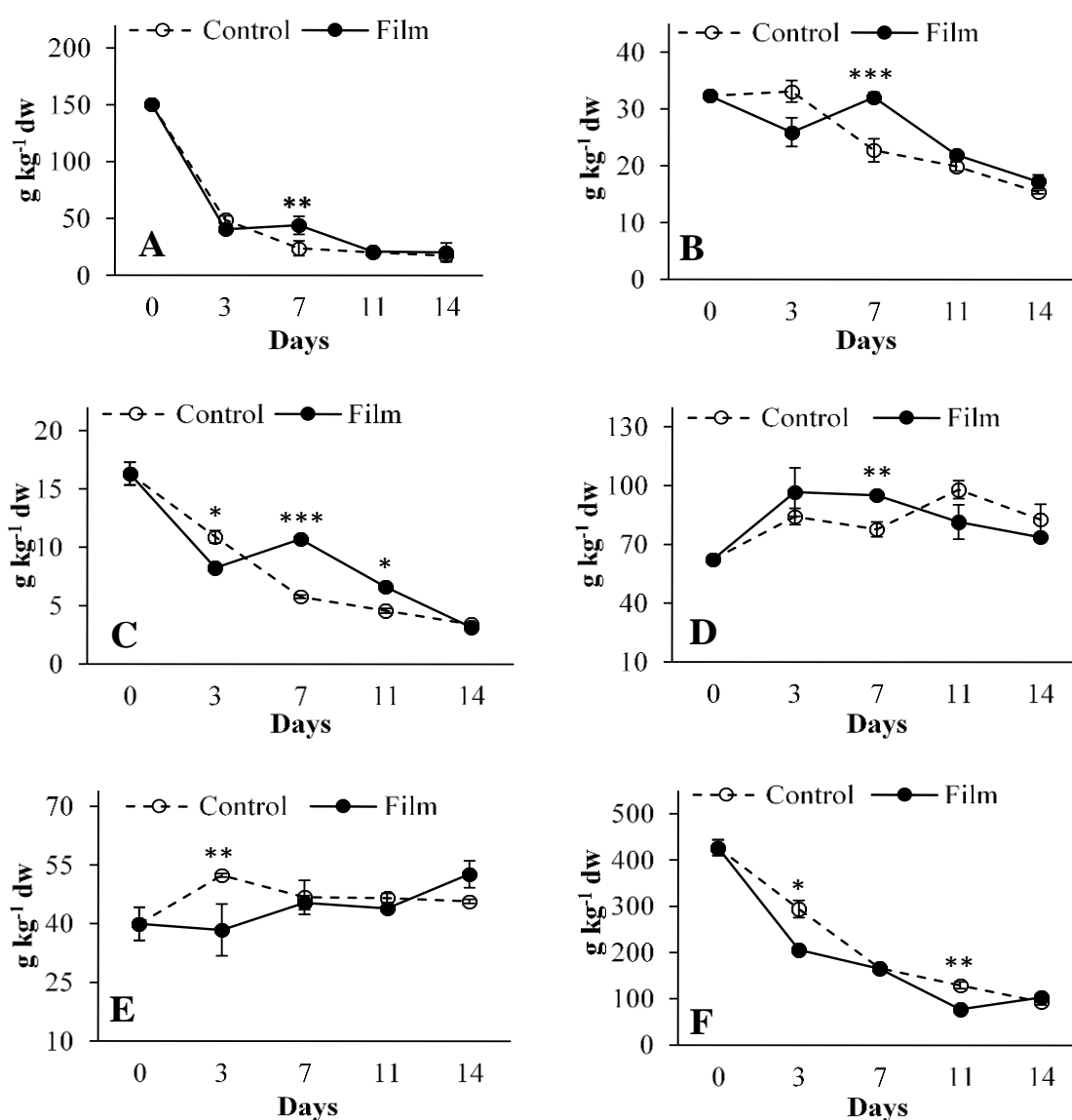


Fig.4 Concentration of (A) chlorogenic acid, (B) caffeic acid, (C) ferulic acid, (D) rutin, (E) quercetin and (F) kaempferol, expressed as g kg⁻¹ dry weight (d.w), of control tomatoes and chitosan-coated tomatoes, during storage peroxide. Data represent the mean of 3 replicates \pm

DS. For each time, significant differences between chitosan-coated and control fruit are indicated by * ($P \leq 0.05$), ** ($P \leq 0.01$), *** ($P \leq 0.001$), according to one-way ANOVA followed by Tukey's test.

4 Conclusions

Chitosan, as a preservative material, can delay the ripening process in tomato fruit by decreasing respiration rate and ethylene production. The chitosan-based edible coatings not only extended the shelf life by a decrease of weight loss, softening and soluble solids concentration but also had a significant effect on bioactive compounds, preserving them during storage. This suggests that chitosan is a promising edible coating for a possible use in commercial postharvest applications aimed to prolong shelf life and preserve antioxidant levels of tomato fruit.

Acknowledgements

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) by scholarship Proc. n° 99999.000139/2014-09, and financial support Project N° A69/2013 and funds of the University of Pisa, Italy.

References

- Alba, R., Payton, P., Fei, Z. J., McQuinn, R., Debbie, P., Martin, G. B., Tanksley, S. D., & Giovannoni, J. J. (2005). Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *Plant Cell*, *17*(11), 2954-2965.
- Ali, A., Maqbool, M., Alderson, P. G., & Zahid, N. (2013). Effect of gum arabic as an edible coating on antioxidant capacity of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit during storage. *Postharvest Biology and Technology*, *76*, 119-124.
- Ali, A., Maqbool, M., Ramachandran, S., & Alderson, P. G. (2010). Gum arabic as a novel edible coating for enhancing shelf-life and improving postharvest quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *58*(1), 42-47.
- Ali, A., Muhammad, M. T. M., Sijam, K., & Siddiqui, Y. (2011). Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. *Food Chemistry*, *124*(2), 620-626.

- Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Cerqueira, M. A., Rocha, C. M. R., Avides, M. C., Quintas, M. A. C., & Vicente, A. A. (2011). Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. *Journal of Food Engineering*, *106*(2), 111-118.
- Bramley, P. M. (2002). Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *Journal of Experimental Botany*, *53*(377), 2107-2113.
- Castagna, A., Dall'Asta, C., Chiavaro, E., Galaverna, G., & Ranieri, A. (2014). Effect of Post-harvest UV-B Irradiation on Polyphenol Profile and Antioxidant Activity in Flesh and Peel of Tomato Fruits. *Food and Bioprocess Technology*, *7*(8), 2241-2250.
- Das, D. K., Dutta, H., & Mahanta, C. L. (2013). Development of a rice starch-based coating with antioxidant and microbe-barrier properties and study of its effect on tomatoes stored at room temperature. *Lwt-Food Science and Technology*, *50*(1), 272-278.
- Davila-Avina, J. E., Villa-Rodriguez, J. A., Villegas-Ochoa, M. A., Tortoledo-Ortiz, O., Olivas, G. I., Ayala-Zavala, J. F., & Gonzalez-Aguilar, G. A. (2014). Effect of edible coatings on bioactive compounds and antioxidant capacity of tomatoes at different maturity stages. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, *51*(10), 2706-2712.
- Dhall, R. K. (2013). Advances in Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *53*(5), 435-450.
- Dumas, Y., Dadomo, M., Di Lucca, G., & Grolier, P. (2003). Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *83*(5), 369-382.
- El-Ghaouth, A., Smilanick, J. L., & Wilson, C. L. (2000). Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *19*(1), 103-110.
- Elghaouth, A., Ponnampalam, R., Castaigne, F., & Arul, J. (1992). Chitosan Coating to Extend the Storage Life of Tomatoes. *Hortscience*, *27*(9), 1016-1018.
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jimenez, A., Munoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions, and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, *22*(6), 292-303.
- Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, *43*(3), 228-265.
- Frusciante, L., Carli, P., Ercolano, M. R., Pernice, R., Di Matteo, A., Fogliano, V., & Pellegrini, N. (2007). Antioxidant nutritional quality of tomato. *Molecular Nutrition & Food Research*, *51*(5), 609-617.

- Garcia, M., Casariego, A., Diaz, R., & Roblejo, L. (2014). Effect of edible chitosan/zeolite coating on tomatoes quality during refrigerated storage. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26(3), 238-246.
- García-Valverde, V., Navarro-González, I., García-Alonso, J., & Periago, M. (2013). Antioxidant Bioactive Compounds in Selected Industrial Processing and Fresh Consumption Tomato Cultivars. *Food and Bioprocess Technology*, 6(2), 391-402.
- Ghorbani, R., Poozesh, V., & Khorramdel, S. (2012). Tomato Production for Human Health, Not Only for Food. In E. Lichtfouse (Ed.), *Organic Fertilisation, Soil Quality and Human Health*, vol. 9 (pp. 187-225): Springer Netherlands.
- Gol, N. B., Patel, P. R., & Rao, T. V. R. (2013). Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biology and Technology*, 85, 185-195.
- Han, C., Zhao, Y., Leonard, S. W., & Traber, M. G. (2004). Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria x ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). *Postharvest Biology and Technology*, 33(1), 67-78.
- Heredia, A., Peinado, I., Rosa, E., & Andres, A. (2010). Effect of osmotic pre-treatment and microwave heating on lycopene degradation and isomerization in cherry tomato. *Food Chemistry*, 123(1), 92-98.
- Hosseini, S. F., Zandi, M., Rezaei, M., & Farahmandghavi, F. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 50-56.
- Jagadeesh, S. L., Charles, M. T., Garipey, Y., Goyette, B., Raghavan, G. S. V., & Vigneault, C. (2011). Influence of Postharvest UV-C Hormesis on the Bioactive Components of Tomato during Post-treatment Handling. *Food and Bioprocess Technology*, 4(8), 1463-1472.
- Kader, A. A. (2005). Increasing food availability by reducing postharvest losses of fresh produce. *Proceedings of the 5th International Postharvest Symposium, Vols 1-3*(682), 2169-2175.
- Li, H. Y., & Yu, T. (2001). Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(2), 269-274.
- Liu, L. H., Shao, Z. Y., Zhang, M., & Wang, Q. M. (2015). Regulation of Carotenoid Metabolism in Tomato. *Molecular Plant*, 8(1), 28-39.

- Martinez-Valverde, I., Periago, M. J., Provan, G., & Chesson, A. (2002). Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(3), 323-330.
- Melendez-Martinez, A. J., Mapelli-Brahm, P., Benitez-Gonzalez, A., & Stinco, C. M. (2015). A comprehensive review on the colorless carotenoids phytoene and phytofluene. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 572, 188-200.
- Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N. C., & Pogson, B. J. (2015). Carotenoid Metabolism in Plants. *Molecular Plant*, 8(1), 68-82.
- No, H. K., Meyers, S. P., Prinyawiwatkul, W., & Xu, Z. (2007). Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. *Journal of Food Science*, 72(5), R87-R100.
- Oz, A. T., & Ulukanli, Z. (2012). Application of Edible Starch-based Coating Including Glycerol Plus Oleum Nigella on Arils From Long-stored Whole Pomegranate Fruits. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36(1), 81-95.
- Pacifici, S., Ferrante, A., & Mensuali-Sodi, A. (2013). Effect of mild vacuum packaging on cut *Matthiola incana* L. flowers vase life. *Australian Journal Of Crop Science*, 7, 861-869.
- Periago, M. J., Garcia-Alonso, J., Jacob, K., Olivares, A. B., Bernal, M. J., Iniesta, M. D., Martinez, C., & Ros, G. (2009). Bioactive compounds, folates and antioxidant properties of tomatoes (*Lycopersicum esculentum*) during vine ripening. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(8), 694-708.
- Petriccione, M., De Sanctis, F., Pasquariello, M. S., Mastrobuoni, F., Rega, P., Scortichini, M., & Mencarelli, F. (2015). The Effect of Chitosan Coating on the Quality and Nutraceutical Traits of Sweet Cherry During Postharvest Life. *Food and Bioprocess Technology*, 8(2), 394-408.
- Romanazzi, G., Lichter, A., Gabler, F. M., & Smilanick, J. L. (2012). Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 63(1), 141-147.
- Tasdelen, O., & Bayindirli, L. (1998). Controlled atmosphere storage and edible coating effects on storage life and quality of tomatoes. *Journal of Food Processing and Preservation*, 22(4), 303-320.
- Vargas, M., Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2012). 5 - Edible chitosan coatings for fresh and minimally processed foods. In K. L. Yam &

- D. S. Lee (Eds.), *Emerging Food Packaging Technologies*, (pp. 66-95): Woodhead Publishing.
- Xanthopoulos, G., Koronaki, E. D., & Boudouvis, A. G. (2012). Mass transport analysis in perforation-mediated modified atmosphere packaging of strawberries. *Journal of Food Engineering*, *111*(2), 326-335.
- Xing, Y. G., Li, X. H., Xu, Q. L., Yun, J. A., Lu, Y. Q., & Tang, Y. (2011). Effects of chitosan coating enriched with cinnamon oil on qualitative properties of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Food Chemistry*, *124*(4), 1443-1450.
- Zapata, P. J., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Valero, D., & Serrano, M. (2008). Use of alginate or zein as edible coatings to delay postharvest ripening process and to maintain tomato (*Solanum lycopersicon* Mill) quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *88*(7), 1287-1293.
- Zhang, M., Yuan, B., & Leng, P. (2009). The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany*, *60*(6), 1579-1588.

CAPITULO 6
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

DISCUSSÃO GERAL

Nos últimos anos, é crescente o interesse em pesquisas voltadas para o desenvolvimento de filmes e coberturas biodegradáveis, principalmente devido à demanda por embalagens produzidas a partir de matérias primas renováveis, que diminuem danos ambientais e criam produtos que possam satisfazer o desejo de consumidores que primam pelo apelo da sustentabilidade. Além disso, estes tipos de embalagens também são utilizadas com o intuito de prolongar a vida de prateleira dos alimentos, sem provocar riscos à saúde.

Diante disso, os filmes biodegradáveis apresentam diversas vantagens, pois além de diminuir o impacto ambiental provocado pelo uso indiscriminado de embalagens plásticas oriundas do petróleo, podem ser melhoradas pela adição de diferentes compostos com características ativas na sua matriz polimérica, atribuindo função extra às embalagens, como atividade antimicrobiana e antioxidante. Já as coberturas comestíveis, quando aplicadas sobre diferentes alimentos, formam uma barreira protetora sobre os mesmos, o que diminui a interação com o ambiente externo, e assim retardam processos fisiológicos naturais dos alimentos e aumentam a conservação e a segurança alimentar.

Com base no exposto acima, quatro trabalhos foram elaborados. Em três deles, filmes ativos e biodegradáveis foram desenvolvidos e caracterizados em relação a suas propriedades mecânicas, físicas, de barreira, e nos casos específicos, atividade antimicrobiana e antioxidante. Além da aplicação de uma cobertura comestível, com avaliação da vida de prateleira.

Para os filmes, no primeiro artigo intitulado de “*Development of active biofilms of quinoa (Chenopodium quinoa W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity*”, filmes ativos antimicrobianos foram desenvolvidos a partir do amido de quinoa contendo solução de nanopartículas metálicas de ouro (AuNPs). No segundo artigo, intitulado de “*Physical and antimicrobial properties of quinoa flour-based films incorporated with essential oil*”, foi utilizado a farinha integral de quinoa adicionado de óleos essenciais (OE) para o desenvolvimento dos filmes ativos antimicrobianos. E no terceiro artigo intitulado de “*Synthesis of biodegradable films with antioxidant properties based on cassava starch containing bixin nanocapsules*”, os filmes ativos antioxidantes foram desenvolvidos a partir de amido de mandioca adicionados de solução contendo nanocápsulas de bixina, um antioxidante extraído das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.). Na tabela 1, estão resumidas as principais propriedades dos filmes estudados neste trabalho.

Tabela 1 Resumo da caracterização e propriedades dos filmes biodegradáveis.

Propriedade do filme	AQ	AQ AuNPs	AQ Branco	FQ	FQ + Óleo	AM	AM + Bixina
Proteção contra oxidação de óleo de girassol	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	Não	Sim
Atividade Antimicrobiana	Não	Sim	Sim	Não	Sim	N.T.	N.T.
Solubilidade (%)	21,5 ^c	18,8 ^d	8,2 ^e	43,1 ^a	36,5 ^b	40,1 ^a	36,5 ^b
Permeabilidade ao vapor de água*	0,393 ^a	0,338 ^a	0,375 ^a	5,3.10 ^{-04c}	3,8.10 ^{-04d}	0,207 ^b	0,216 ^b
Tração na ruptura (MPa)	7,6 ^c	9,9 ^b	22,2 ^a	3,5 ^d	1,3 ^e	12,13 ^b	8,95 ^c
Elongação na ruptura (%)	5,2 ^c	3,0 ^d	2,7 ^d	14,3b	27,3 ^a	6,05 ^c	15,55 ^b
Diferença de cor	5,35 ^d	25,92 ^c	5,37 ^d	1398,8 ^a	1606,8 ^a	1,7e	54,5 ^b
Opacidade**	1,86 ^d	1,48 ^{de}	2,44 ^c	4,6 ^b	6,8 ^a	1,3e	1,7 ^d
Estabilidade térmica	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Estrutura Homogênea	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

N.T. = não testado. *PVA: g mm/ h m² kPa. **Opacidade=A₅₀₀ mm⁻¹

AQ – Filmes de Amido de Quinoa

AQ AuNPS – Filmes de amido de quinoa com 5 % de solução de AuNPS

AQ Branco – Filmes de Amido de Quinoa com 5 % da solução branco

FQ – Filmes de farinhas de quinoa

FQ + Óleos – valor médio dos filmes de farinha de quinoa com 2% de óleo essencial

AM – Filmes de amido de mandioca

AM + Bixina – Filmes de amido de mandioca com 5 % de solução de bixina

O amido de maneira geral é amplamente utilizado para o desenvolvimento de filmes e cobertura, por ser renovável e de baixo custo. A aplicação do amido na produção de filmes se baseia nas propriedades químicas, físicas e funcionais da amilose para formar géis e na sua

capacidade para formar filmes. O amido e a farinha integral de quinoa se mostraram como materiais promissores para o desenvolvimento de filmes e a produção de embalagens biodegradáveis. Os grãos de quinoa contêm aproximadamente 80 % de amido, com teor de amilose entre 10 a 21 % (dependendo da variedade) e grânulos com tamanho médio de 1 μm , o que facilita sua dissolução e formação da solução filmogênica, já sua farinha contém alto teor de proteínas em relação a outros cereais e uma equilibrada combinação entre lipídeos e carboidratos, o que os torna extremamente propício para a produção de filmes. As nanopartículas de ouro (AuNPs) e os óleos essenciais adicionados aos filmes, com o objetivo de atribuir atividade antimicrobiana aos mesmos, demonstraram uma ampla eficiência contra redução microbiana dos patógenos *S.aureus* e *E.coli*. As AuNPs, assim como outros íons metálicos, apresentam um efeito tóxico para células microbianas, que alguns autores chamam de ação oligodinâmica, ou seja, substâncias que em concentrações extremamente baixas, afetam a atividade de organismos vivos. Além disso, devido a seu tamanho, as nanopartículas, quando em contato com a membrana bacteriana, pode penetrá-la facilmente causando seu rompimento, provocando dessa maneira, a morte celular. Outro fator associado a atividade antimicrobiana da solução de AuNPs, é a presença de alguns grupos de amônio quaternários na estrutura do silsesquioxano utilizado na estabilização das mesmas. O mecanismo de ação de estruturas de amônio quaternários dá-se através da desnaturação e precipitação das proteínas da membrana celular e citoplasma da bactéria, ocorrendo à liberação de nitrogênio e potássio, e ocasionam a morte celular.

Já os óleos essenciais são constituídos de uma complexa mistura de substâncias voláteis, geralmente lipofílicas, cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos fixos, em diferentes concentrações, nos quais, um composto farmacologicamente ativo é majoritário. Assim, no orégano, tem-se o carvacrol (3 a 17 %) e no tomilho, o timol (40 %), substâncias consideradas antibacteriana e antifúngica. Logo, tanto as AuNPs como os óleos essenciais se mostraram muito promissores para aplicação em filmes e embalagens para alimentos já que auxiliam na redução ou controle da carga microbiana e conseqüentemente sua conservação e maior segurança dos alimentos.

A atividade antioxidante dos filmes ativos contendo nanocápsulas de bixina, foi comprovada através de sua aplicação como embalagem para óleo de girassol, rico em gorduras poli-insaturadas e por isso tende a sofrer o processo de oxidação. O efeito dos filmes em proteger o óleo a oxidação primária foi investigado em condições extremas de armazenamento através do índice de peróxidos. Enquanto o óleo armazenado em embalagem

plástica comum ultrapassou em até 9 vezes o limite estabelecido pelo *Codex Alimentarius* (1999), o óleo embalado pelos filmes ficou abaixo deste índice (10 mEq/kg). A bixina é um carotenoide constituído por nove ligações duplas conjugadas e dois grupos carboxílicos; estrutura responsável pela sua propriedade antioxidante e baixa solubilidade; semelhante a outros carotenoides, é um eficiente inibidor de oxigênio *singlete*. A tecnologia de nanoencapsulação aumentou sua solubilidade e estabilidade, o que facilitou seu uso e homogeneização nos filmes. Logo, a aplicação de nanocápsulas de bixina em filmes para produção de embalagens para alimentos foi efetiva já que pode-se produzir embalagens com alto poder antioxidante e características adequadas à sua utilização em diferentes produtos alimentícios.

O efeito da adição dos componentes ativos aos filmes também foram avaliados pela caracterização de suas propriedades mecânicas, físicas e de barreira. Em relação as propriedades mecânicas, os valores desejados para resistência à tração (RT) e alongação na ruptura (ER) dependem do propósito de aplicação da embalagem. Em geral, deseja-se a obtenção de filmes com alta RT e moderada ER. Os filmes de amido de quinoa apresentaram aumento na resistência (média 40 %), após a adição da solução contendo AuNPS, no entanto o aumento foi mais pronunciado para os filmes elaborados apenas com a solução branco (solução estabilizante sem AuNPs) (média de 150 %). Este aumento pode ser atribuído aos polímeros de silsesquioxano utilizado para estabilizar as AuNPs, os quais formam uma matriz emaranhada e aleatória com as cadeias de amido, e conseqüentemente aumento da RT. Na presença da AuNPs a interação entre os polímeros de amido e silsesquioxano foi diminuída devido a maior interação física do estabilizante com as nanopartículas de ouro que diminuem, por sua vez, interação com o amido. Contudo, este aumento na RT em função das AuNPs e do estabilizante, teve como consequência a redução da elasticidade dos filmes. Efeito inverso foi observado tanto pela adição dos OEs como das nanocápsulas de bixina aos filmes. Filmes de farinha de quinoa com RT de 3,5 MPa, apresentaram redução na resistência entre 20 % e 57 %, após adição dos OEs, apesar disso, a sua ER aumentou até 91 %, para os filmes com as maiores concentrações de OEs. O filme de amido de mandioca com RT inicial de 12,13 MPa, teve redução entre 26 % a 84 % com aumento na concentração da solução contendo as nanocápsulas de bixina, com um aumento significativo na sua elasticidade. Os óleos apresentam efeito plastificante aos filmes, levando a uma interrupção das cadeias poliméricas, tendo como consequência a diminuição da RT e aumento da ER. Efeito similar foi observada para a adição das nanocápsulas de bixina, levando em consideração que a estrutura formadora das nanocápsulas é um polímero com um núcleo oleoso e estes devem se alojar entre as

cadeias poliméricas de amido, tornando filmes mais frágeis, porém substancialmente mais elásticos.

Filmes elaborados a partir de polímeros biodegradáveis apresentam naturalmente características mecânicas inferiores aos polímeros não biodegradáveis, tais como polietileno de alta densidade (HDPE RT de 22 a 23 Mpa; ER de 500%), polipropileno (PP RT de 31 a 38 MPa), e ácido polilático (PLA RT de 47,6 a 53,1 MPa), contudo filmes de amido de quinoa com adição de AuNPs ou solução branco, apresentaram resistência similar ao RT encontrada na literatura para o polietileno de alta densidade e o polietileno de baixa densidade (LDPE RT de 9 a 17 Mpa e ER de 750 %) (Han, 2014b; Dick, M. *et al.*, 2015).

Para as características de solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes, deseja-se que os valores para essas propriedades sejam baixos a fim de garantir a manutenção da qualidade do alimento. De maneira geral, filmes de amido apresentam sensibilidade à água, devido ao seu caráter hidrofílico apresentam maior interação amido-água, já os filmes de farinhas apresentam afinidade moderada com a água, devido a presença de lipídeos na sua matriz polimérica. Efeito positivo foi observado para a solubilidade dos filmes com adição dos componentes ativos. Nos filmes de amido, sugere-se que as interações de amido-água, foram substituídas por interações entre os grupos hidrofílicos dos polímeros de silsesquioxano utilizados na estabilização das AuNPs e da estrutura polimérica das nanocápsulas de bixina com as cadeias de amido, o que reduz a disponibilidade de grupos polares que interagem com a água. Nos filmes de amido de quinoa a presença da AuNPs não influenciou sua PVA. Filmes de amido de mandioca tiveram aumento da PVA com aumento na concentração das nanocápsulas de bixina; esse resultado pode ser consequência da presença de rachaduras observadas pela microscopia eletrônica de varreduras na superfície dos filmes. Os filmes de farinha de quinoa apresentaram diminuição da sua solubilidade com a adição dos óleos essenciais. Além disso, mostram os menores valores a permeabilidade a vapor de água dos filmes estudados. De maneira geral, as características de afinidade com água de filmes a base de farinhas, são diretamente relacionadas com a sua composição, filmes à base de amido ou proteínas apresentam alta solubilidade e permeabilidade ao vapor de água em função do caráter hidrofílico, já a presença de lipídeos, aumentou o caráter hidrofóbico dos filmes e conseqüentemente sua afinidade com grupos polares, ocasionando a diminuição da solubilidade e PVA. A farinha de quinoa utilizada na elaboração dos filmes apresentou composição aproximada de 3 % de proteínas, 6 % de lipídeos e 71 % de carboidratos (amido).

Com exceção dos filmes de amido de mandioca com altas concentrações de nanocápsulas de bixina, a análise por microscopia eletrônica de varredura permitiu visualizar a ausência de rachaduras e bolhas em praticamente todas as demais formulações estudadas. A microscopia eletrônica de transmissão realizada para os filmes de amido de quinoa contendo a AuNPs, mostrou uma distribuição homogênea das mesmas pela estrutura do filme.

Quanto à propriedade térmica, todos os filmes apresentaram boa estabilidade e três estágios de perda de peso. Ao final do experimento até 600 °C, os valores de massa residual variaram entre 15% (filmes de amido de quinoa com AuNPs), 20% (filmes de farinha de quinoa com OEs) e 16 % (filmes de amido com nanocápsulas de bixina). A diferença no valor de massa residual dos filmes pode ser atribuída as diferentes formulações, componentes e interações entre as matrizes poliméricas e os componentes ativos, que proporcionou maior conteúdo de carbono residual ao final do experimento. Nos filmes contendo AuNPs, o maior peso residual é atribuído aos resíduos metálicos das nanopartículas.

Apenas a cor dos filmes de amido foi afetada pela incorporação da solução de AuNPs e nanocápsulas de bixina, o que resultou em filmes com alto índice de opacidade e baixa transferência de luz. Com isso, a transmitância de luz na faixa ultravioleta e visível foi significativamente menor em relação ao filme controle. Essa característica é vantajosa, visto que promove maior proteção ao alimento embalado contra a ação da luz nesses comprimentos de onda.

No artigo de aplicação da cobertura comestível intitulado de “*Chitosan edible coating in delaying post-harvest ripening of tomato fruit*”, foram avaliados os parâmetros de qualidade e compostos bioativos de tomates com coberturas formuladas a partir de quitosana e armazenados por 14 dias (20 °C / UR 85 %). A quitosana é considerada um polímero biodegradável e não tóxico, podendo assim ingerido junto com os alimentos, além disso, apresenta atividade antimicrobiana; características estas que tornam seu uso como coberturas de grande interesse por parte da indústria. Tomates recobertos com quitosana, apresentaram menores perdas de peso em comparação com frutos controle (não recobertos), além de maiores índices de firmeza. Ao formar uma membrana protetora, a quitosana reduz a perda de umidade dos frutos para o ambiente, retardando com isso, sua perda de peso e firmeza. Além disso, diminui as trocas gasosas, o que pode levar a uma diminuição da taxa respiratória dos frutos e consequentemente diminuição de alguns processos fisiológicos naturais de maturação; fato esse claramente observado pela redução na produção de etileno dos frutos recobertos. Com a redução na produção de etileno e da taxa respiratória, nota-se que, de maneira geral, frutos revestidos apresentaram redução na produção dos carotenoides, bem

como, exibiram picos de produção ou degradação retardados em comparação com frutos controle (não recobertos). O que evidencia que filmes de quitosana, foram eficientes em retardar os processos fisiológicos e a maturação de tomates, podendo assim, entender sua conservação e manter seu valor nutricional.

CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou ser possível produzir filmes biodegradáveis com propriedades ativas e propriedades mecânicas de largo espectro de aplicação. De maneira geral todas as matérias primas utilizadas (amido de quinoa, farinha de quinoa, amido de mandioca) apresentaram capacidade de formar filmes com características diferenciadas em função de sua composição. O amido e a farinha de quinoa se mostraram matérias primas promissoras para tal finalidade, tanto pelas características de seus filmes como pelo uso de fontes renováveis pouco exploradas, como os grãos de quinoa, atribuindo a estes filmes um caráter funcional.

A adição dos compostos ativos, tais como: nanopartículas de ouro, óleos essenciais e nanocápsulas de bixina, se mostrou satisfatória na produção de filmes com propriedades antimicrobianas e/ou antioxidantes. Os filmes foram capazes de reduzir microrganismos patogênicos (comumente envolvidos em surtos alimentares) e promover atividade antioxidante, e assim proporcionarem valor agregado às embalagens desenvolvidas. Além disso, por serem elaborados a partir de fontes biodegradáveis e comestíveis, são considerados seguros para saúde humana.

As embalagens ativas antimicrobianas ou antioxidantes podem ser consideradas como conceito inovador; onde as interações entre embalagem e alimento prolongam ou melhoram sua vida útil, enquanto mantém a qualidade. Outra vantagem do uso de embalagens ativas é a segurança do consumidor, já que os aditivos aos serem adicionados na embalagem, são liberados gradualmente, mantendo-se presentes em menores quantidades e apenas onde sua presença é requerida; em vez de serem adicionados diretamente ao alimento.

A cobertura elaborada a partir de quitosana se mostrou promissora na conservação de tomates, devido à redução de seus processos metabólicos, apresentaram efeito positivo no aumento da vida útil, e com isso, eventuais desperdícios podem ser minimizados. Seu uso possui grande potencial para ser explorado, principalmente devido ao aumento da vida útil pós-colheita, e por ser uma tecnologia economicamente interessante, uma vez que são utilizadas pequenas quantidades de matérias-primas.

REFERENCIAS

ABIPLAST - Associação Brasileira da Indústria de Plástico (2014). Perfil 2014 - Indústria Brasileira de Transformação de Material Plástico. Disponível em: <<http://www.abiplast.org.br/site/estatisticas>>.

AOAC. **Official methods of analysis**. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists 2005.

ASTM 2009. Standard test method for determining gas permeability characteristics of plastic films and sheeting. In: *Annual books of ASTM Standards* (ASTM D1434). Philadelphia, PA: American Society for Testing and Material, 2009.

ASTM, 2005. Standard test method for water vapor transmission of materials (ASTM E 96-05). In: *Annual Book of ASTM Standards*. American Society for Testing Materials, Philadelphia, PA, 2005.

ASTM. 2012. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In *Annual book of ASTM standards* (ASTM D882-12). Philadelphia: American Society 56 for Testing and Materials, 2012.

HUNTER ASSOCIATES LABORATORY (Reston, Estados Unidos). Universal software versions 3.2 and above: Users manual: manual version 1.5. Reston , 1997

AHAMED, N. T. *et al.* Studies on *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus paniculatas* starch as biodegradable fillers in LDPE films. **Carbohydrate Polymers**, v. 31, n. 3, p. 157-160, 1996. ISSN 0144-8617. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861796000197>>.

AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 43, n. 6, p. 837-842, Jul 2010. ISSN 0023-6438. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000277034000001 >.

ALI, A. *et al.* Effect of gum arabic as an edible coating on antioxidant capacity of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 76, p. 119-124, Feb 2013. ISSN 0925-5214. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000330497400016 >.

_____. Gum arabic as a novel edible coating for enhancing shelf-life and improving postharvest quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 58, n. 1, p. 42-47, Oct 2010. ISSN 0925-5214. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000280899100006 >.

_____. Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 620-626, Jan 2011. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000282470500031 >.

AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant Activity of Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 46, p. 10835-10847, Nov 20 2013. ISSN 0021-8561; 1520-5118. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000327103400001 >.

ANDRADE-MAHECHA, M. M.; TAPIA-BLACIDO, D. R.; MENEGALLI, F. C. Development and optimization of biodegradable films based on achira flour. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 449-458, Apr 2012. ISSN 0144-8617. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000301633100007 >.

ARAUJO-FARRO, P. C. **Desenvolvimento de Filmes Biodegradáveis a Partir de Derivados do Grão de Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willdenow) da variedade “Real”**. 2008. 320 (Doutorado). Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

ARAUJO-FARRO, P. C. *et al.* Development of films based on quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willdenow) starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 4, p. 839-848, Jul 23 2010. ISSN 0144-8617. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000279218000013 >.

ARENAS, L. T. *et al.* Anisotropic self-organization of hybrid silica based xerogels containing bridge positively charged 1,4-diazoniabicyclo 2.2.2 octane chloride group. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 318, n. 1, p. 96-102, Feb 1 2008. ISSN 0021-9797. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251559300013 >.

ARRIETA, M. P. *et al.* Functional properties of sodium and calcium caseinate antimicrobial active films containing carvacrol. **Journal of Food Engineering**, v. 121, p. 94-101, Jan 2014. ISSN 0260-8774; 1873-5770. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000325954900013 >.

AVILA-SOSA, R. *et al.* Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 66-72, Feb 2012. ISSN 0168-1605. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000300750400010 >.

AZEREDO, H. M. C. D.; FARIA, J. D. A. F.; AZEREDO, A. M. C. D. Embalagens ativas para alimentos. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 20, p. 337-341, 2000. ISSN 0101-2061. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612000000300010&nrm=iso >.

BARBA DE LA ROSA, A. P. *et al.* Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. **Journal of Cereal Science**, v. 49, n. 1, p. 117-121, 1// 2009. ISSN 0733-5210. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521008001355 >.

BARBOSA-PEREIRA, L. *et al.* Development of new active packaging films containing bioactive nanocomposites. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 26, p. 310-318, 12// 2014. ISSN 1466-8564. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856414000976 >.

BONILLA, J. *et al.* Effect of the incorporation of antioxidants on physicochemical and antioxidant properties of wheat starch–chitosan films. **Journal of Food Engineering**, v. 118,

n. 3, p. 271-278, 10// 2013. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877413001726> >.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug 2004. ISSN 0168-1605. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222888700001 >.

BYUN, Y.; KIM, Y. T.; WHITESIDE, S. Characterization of an antioxidant polylactic acid (PLA) film prepared with α -tocopherol, BHT and polyethylene glycol using film cast extruder. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 2, p. 239-244, 9// 2010. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026087741000186X> >.

CALO, J. R. *et al.* Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, v. 54, n. 0, p. 111-119, 8// 2015. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515000456> >.

CAMPOS, C. D. **Desenvolvimento de filmes biodegradáveis a partir de resíduos da fabricação de cápsulas nutracêuticas**. 2014. 95 (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.). Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre - Brasil, 2014.

CIOFFI, N. *et al.* Copper Nanoparticle/Polymer Composites with Antifungal and Bacteriostatic Properties. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 21, p. 5255-5262, 2005/10/01 2005. ISSN 0897-4756. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/cm0505244> >. Acesso em: 2013/12/02.

CORRALES, M.; FERNÁNDEZ, A.; HAN, J. H. Chapter 7 - Antimicrobial Packaging Systems. In: HAN, J. H. (Ed.). **Innovations in Food Packaging (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2014. p.133-170. ISBN 978-0-12-394601-0.

DA CRUZ, C. V. M. **Estudo das propriedades de barreira em filmes de nanocompósitos obtidos de blendas de PEAD/PEBDL com montmorilonita organofílica**. 2013. 119 (Mestre em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - Brasil, 2013.

DAS, D. K.; DUTTA, H.; MAHANTA, C. L. Development of a rice starch-based coating with antioxidant and microbe-barrier properties and study of its effect on tomatoes stored at room temperature. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 272-278, Jan 2013. ISSN 0023-6438. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000309896600038 >.

DE CAMARGO ANDRADE-MOLINA, T. P. *et al.* Active biodegradable packaging for fresh pasta. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 25-29, 11// 2013. ISSN 0023-6438. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643813001722> >.

DEL NOBILE, M. A. *et al.* Effect of Ag-containing nano-composite active packaging system on survival of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 8, p. E379-E383, Oct 2004. ISSN 0022-1147. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225016300022 >.

DHALL, R. K. Advances in Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 5, p. 435-450, Jan 2013. ISSN 1040-8398. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000315671800003 >.

DIAS, A. B. *et al.* Biodegradable films based on rice starch and rice flour. **Journal of Cereal Science**, v. 51, n. 2, p. 213-219, Mar 2010. ISSN 0733-5210. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000276651500006 >.

_____. Mechanical and barrier properties of composite films based on rice flour and cellulose fibers. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 535-542, 3// 2011. ISSN 0023-6438. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643810002604> >.

DICK, M. **Desenvolvimento de Filmes Biodegradáveis a partir da Semente e da Mucilagem de Chia(*Salvia hispanica L.*)**. 2015a. 93 (Mestre). Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

_____. **Desenvolvimento de Filmes Biodegradáveis a partir da Semente e da Mucilagem de Chia(*Salvia hispanica L.*)**. 2015b. 93 (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - Brasil, 2015.

DICK, M. *et al.* Edible film production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 198-205, Oct 2015. ISSN 0144-8617. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000357244900024 >.

_____. Edible films based on chia flour: Development and characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, p. 42455, 2015. ISSN 1097-4628. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/app.42455> >.

EMAMIFAR, A. *et al.* Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange juice. **Food Control**, v. 22, n. 3-4, p. 408-413, Mar-Apr 2011. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000285952500009 >.

EMIROĞLU, Z. K. *et al.* Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, v. 86, n. 2, p. 283-288, 10// 2010. ISSN 0309-1740. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174010001488> >.

FAKHOURI, F. M. *et al.* Comparative study of processing methods for starch/gelatin films. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 2, p. 681-689, 6/20/ 2013. ISSN 0144-8617. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861713002658> >.

_____. Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 109, p. 57-64, 11// 2015. ISSN 0925-5214. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521415300272> >.

FERNANDEZ, A.; PICOUET, P.; LLORET, E. Cellulose-silver nanoparticle hybrid materials to control spoilage-related microflora in absorbent pads located in trays of fresh-cut melon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 1-2, p. 222-228, Aug 2010. ISSN 0168-1605. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281344400030 >.

FERREIRA, M. P. F. **Embalagens Ativas para Alimentos: Caracterização e Propriedades**. 2012. 123 f (Mestre em Ciência dos Materiais). Pós Graduação em Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2012.

FERRER, G. *et al.* Review on the methodology used in thermal stability characterization of phase change materials. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 665-685, Oct 2015. ISSN 1364-0321. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000358968000047 >.

FLOROS, J. D. *et al.* Advances in Modified Atmosphere and Active Packaging with applications in the dairy industry. **Bulletin of the International Dairy Federation No 346/2000: Packaging of Milk Products**, p. 22-28, 2000. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165072000004 >.

GALLO, J. A. Q. *et al.* Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based edible films. **Journal of Membrane Science**, v. 180, n. 1, p. 37-46, Dec 2000. ISSN 0376-7388. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165522700004 >.

GALUS, S.; KADZIŃSKA, J. Food applications of emulsion-based edible films and coatings. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 273-283, 10// 2015. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224415001788> >.

GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 6, p. 941-947, Sep 2000. ISSN 0022-1147. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165129600005 >.

GARCÍA, M. *et al.* Characterization of Starch and Composite Edible Films and Coatings. In: HUBER, K. C. e EMBUSCADO, M. E. (Ed.). **Edible Films and Coatings for Food Applications**: Springer New York, 2009. cap. 6, p.169-209. ISBN 978-0-387-92823-4.

GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Microstructural Characterization of Plasticized Starch-Based Films. **Starch - Stärke**, v. 52, n. 4, p. 118-124, 2000. ISSN 1521-379X. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/1521-379X\(200006\)52:4<118::AID-STAR118>3.0.CO](http://dx.doi.org/10.1002/1521-379X(200006)52:4<118::AID-STAR118>3.0.CO) >.

GOMES, C. *et al.* Quality of olive oil reformulated MRE entree packaged in oxygen-absorbing film. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 191-197, Mar 2012. ISSN 0023-6438. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000297002800010 >.

HAN, J. H. Chapter 1 - A Review of Food Packaging Technologies and Innovations. In: HAN, J. H. (Ed.). **Innovations in Food Packaging (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2014a. p.3-12. ISBN 978-0-12-394601-0.

_____. Chapter 9 - Edible Films and Coatings: A Review. In: HAN, J. H. (Ed.). **Innovations in Food Packaging (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2014b. p.213-255. ISBN 978-0-12-394601-0.

HEREDIA, A. *et al.* Effect of osmotic pre-treatment and microwave heating on lycopene degradation and isomerization in cherry tomato. **Food Chemistry**, v. 123, n. 1, p. 92-98, Nov 2010. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000279390900014 >.

JANJARASSKUL, T.; TANANUWONG, K.; KROCHTA, J. M. Whey Protein Film with Oxygen Scavenging Function by Incorporation of Ascorbic Acid. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 9, p. E561-E568, Nov-Dec 2011. ISSN 0022-1147. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000297457000022 >.

JIMÉNEZ, A. *et al.* Edible and Biodegradable Starch Films: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 6, p. 2058-2076, 2012/08/01 2012. ISSN 1935-5130. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-012-0835-4> >.

JOUKI, M. *et al.* Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 9-19, May 2014. ISSN 0268-005X; 1873-7137. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000327540500002 >.

KANMANI, P.; RHIM, J. W. Physicochemical properties of gelatin/silver nanoparticle antimicrobial composite films. **Food Chemistry**, v. 148, p. 162-169, Apr 2014. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000328810500024 >.

KECHICHIAN, V. *et al.* Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1088-1094, 9// 2010. ISSN 0023-6438. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643810000745> >.

KRAMER, M. Structure and Function of Starch-Based Edible Films and Coatings. In: HUBER, K. C. e EMBUSCADO, M. E. (Ed.). **Edible Films and Coatings for Food Applications**: Springer New York, 2009. cap. 4, p.113-134. ISBN 978-0-387-92823-4.

KROCHTA, J. M.; DEMULDERJOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. **Food Technology**, v. 51, n. 2, p. 61-74, Feb 1997. ISSN 0015-6639. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997WH10800023 >.

LAHNKE, A. O. E. S. **Filmes biodegradáveis com propriedades funcionais produzidos a partir de resíduos industriais**. 2015. 122 (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre - Brasil, 2015.

LAROTONDA, F. D. S. *et al.* Biodegradable films made from raw and acetylated cassava starch. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 477-484, 2004. ISSN 1516-8913. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132004000300019&nrm=iso >.

LEE, D. S. Chapter 6 - Antioxidative Packaging System. In: HAN, J. H. (Ed.). **Innovations in Food Packaging (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2014. p.111-131. ISBN 978-0-12-394601-0.

LEE, S. J.; RAHMAN, A. T. M. M. Chapter 8 - Intelligent Packaging for Food Products. In: HAN, J. H. (Ed.). **Innovations in Food Packaging (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2014. p.171-209. ISBN 978-0-12-394601-0.

LIAO, J. *et al.* Antibacterial titanium plate deposited by silver nanoparticles exhibits cell compatibility. **International journal of nanomedicine**, v. 5, p. 337-342, / 2010. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/20517478> >.

LIM, L. T. 4.52 - Active and Intelligent Packaging Materials. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.). **Comprehensive Biotechnology (Second Edition)**. Burlington: Academic Press, 2011. p.629-644. ISBN 978-0-08-088504-9.

LIN, D.; ZHAO, Y. Y. Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 6, n. 3, p. 60-75, Jul 2007. ISSN 1541-4337. Disponível em: < [Go to ISI](http://www.interscience.wiley.com/jpages/1541-4337/abstract/doi/10.1002/crfs.10001)>://WOS:000248257400001 >.

LLORENS, A. *et al.* Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 24, n. 1, p. 19-29, 3// 2012. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224411002184> >.

LOBATO, K. B. D. S. **Produção e avaliação da estabilidade de nanocápsulas de bixina em sistemas modelo defotossensitização e aquecimento**. 2013. 107 (Mestre). Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

LOBATO, K. B. D. S. *et al.* Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3906-3912, 12/15/ 2013. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613008182> >.

MALI, S. *et al.* Mechanical and thermal properties of yam starch films. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 1, p. 157-164, Jan 2005. ISSN 0268-005X. Disponível em: < [Go to ISI](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X0500017)>://WOS:000225518300017 >.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Starch films: production, properties and potential of utilization. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 137-156, 2010.

MARAN, J. P. *et al.* Development of model for barrier and optical properties of tapioca starch based edible films. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1335-1347, 2/15/ 2013. ISSN 0144-8617. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861712009873> >.

MARTINS, J. T.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 220-

227, 5// 2012. ISSN 0268-005X. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X11002025> >.

MEI, J. *et al.* Characterization of edible starch–chitosan film and its application in the storage of Mongolian cheese. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 57, n. 0, p. 17-21, 6// 2013. ISSN 0141-8130. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181301300086X> >.

MELLINAS, C. *et al.* Active edible films: Current state and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 2, p. 15, Jan 2016. ISSN 0021-8995. Disponível em: <
<http://www.interscience.wiley.com/jpages/0021-8995/abstract/doi/10.1002/app.42888> >.

MELO JR., M. A. *et al.* Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, p. 1872-1878, 2012. ISSN 0100-4042. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000900030&nrm=iso >.

MONTERREY, E. S.; SOBRAL, P. J. D. A. Caracterização de propriedades mecânicas e óticas de biofilmes a base de proteínas miofibrilares de tilápia do nilo usando uma metodologia de superfície-resposta. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 19, p. 294-301, 1999. ISSN 0101-2061. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611999000200025&nrm=iso >.

MORAES, A. R. F. E. *et al.* Desenvolvimento e avaliação de filme antimicrobiano na conservação de manteiga. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 27, p. 33-36, 2007. ISSN 0101-2061. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612007000500006&nrm=iso >.

NASCIMENTO, T. A.; CALADO, V.; CARVALHO, C. W. P. Development and characterization of flexible film based on starch and passion fruit mesocarp flour with nanoparticles. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 588-595, 11// 2012. ISSN 0963-9969. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912002955> >.

NORAJIT, K.; KIM, K. M.; RYU, G. H. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 3, p. 377-384, 6// 2010. ISSN 0260-8774. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026087741000021X> >.

NORONHA, C. M. *et al.* Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with α -tocopherol nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 159, n. 0, p. 529-535, 9/15/ 2014. ISSN 0308-8146. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614003628> >.

OLIVEIRA, L. M. D.; OLIVEIRA, P. A. P. L. V. D. Review: Main Antimicrobial Agents Used in Plastic Packaging. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 7, n. 2, p. 161-165, 2004.

ORTEGA-TORO, R. **Development and characterization of corn starch films by blending with more hydrophobic compounds** 2015. 356 (Doctorado). Ciencia Tecnología y Gestión Alimentaria, Universitat Politècnica de València, Valencia.

OTHMAN, S. H. Bio-nanocomposite Materials for Food Packaging Applications: Types of Biopolymer and Nano-sized Filler. **2nd International Conference on Agricultural and Food Engineering (Cafe 2014) - New Trends Forward**, v. 2, p. 296-303, 2014. ISSN 2210-7843. Disponible em: < <Go to ISI>://WOS:000346363800041 >.

PACIFICI, S.; FERRANTE, A.; MENSUALI-SODI, A. Effect of mild vacuum packaging on cut *Matthiola incana* L. flowers vase life. **Australian Journal Of Crop Science**, v. 7, p. 861-869, 2013.

PAGNO, C. H. *et al.* Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 173, p. 755-762, Apr 15 2015. ISSN 0308-8146. Disponible em: < <Go to ISI>://WOS:000347755800099 >.

PARRIS, N. *et al.* Water vapor permeability and solubility of zein/starch hydrophilic films prepared from dry milled corn extract. **Journal of Food Engineering**, v. 32, n. 2, p. 199-207, 1997. ISSN 0260-8774. Disponible em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877497000150> >.

PAVLATH, A.; ORTS, W. Edible Films and Coatings: Why, What, and How? In: HUBER, K. C. e EMBUSCADO, M. E. (Ed.). **Edible Films and Coatings for Food Applications**: Springer New York, 2009. cap. 1, p.1-23. ISBN 978-0-387-92823-4.

PELLISSARI, F. M. *et al.* Comparative study on the properties of flour and starch films of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 2, p. 681-690, 3// 2013. ISSN 0268-005X. Disponible em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X12001798> >.

PENG, Y.; YIN, L.; LI, Y. F. Combined effects of lemon essential oil and surfactants on physical and structural properties of chitosan films. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 1, p. 44-50, Jan 2013. ISSN 0950-5423. Disponible em: < <Go to ISI>://WOS:000312647800006 >.

PEREDA, M.; AMICA, G.; MARCOVICH, N. E. Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1318-1325, 1/15/ 2012. ISSN 0144-8617. Disponible em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861711008022> >.

PEREIRA DE ABREU, D. A. *et al.* Natural antioxidant active packaging film and its effect on lipid damage in frozen blue shark (*Prionace glauca*). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 12, n. 1, p. 50-55, 1// 2011. ISSN 1466-8564. Disponible em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S146685641000113X> >.

PETERSEN, K. *et al.* Potential of biobased materials for food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 2, p. 52-68, 2// 1999. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224499000199> >.

PETERSSON, M.; STADING, M. Water vapour permeability and mechanical properties of mixed starch-monoglyceride films and effect of film forming conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 1, p. 123-132, Jan 2005. ISSN 0268-005X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225518300013 >.

REALINI, C. E.; MARCOS, B. Active and intelligent packaging systems for a modern society. **Meat Science**, v. 98, n. 3, p. 404-419, Nov 2014. ISSN 0309-1740. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000341466900011 >.

REIS, L. C. B. *et al.* Active biocomposites of cassava starch: The effect of yerba mate extract and mango pulp as antioxidant additives on the properties and the stability of a packaged product. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, n. 0, p. 382-391, 4// 2015. ISSN 0960-3085. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308514000558> >.

RHIM, J. W.; WANG, L. F.; HONG, S. I. Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 2, p. 327-335, Dec 2013. ISSN 0268-005X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000320614500019 >.

SAKANAKA, L. S. **Confecção de filmes biodegradáveis por extrusão de blendas de amido termoplástico e polibutileno succinato co-adipato (PBSA)**. 2007. 108 (Doutorado). Departamento de Ciência e Tecnologia de alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

SANCHEZ-GONZALEZ, L. *et al.* Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 277-283, Sep 2010. ISSN 0144-8617. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000280574600009 >.

SANTANA, M. C. C. B. D. *et al.* Incorporação de urucum como aditivo antioxidante em embalagens biodegradáveis a base de quitosana. **Ciência Rural**, v. 43, n. 3, p. 544-550, 2013. ISSN 0103-8478. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cr/2013nahead/a7213CR2012-0010.pdf> >.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. *et al.* **Embalagens plásticas flexíveis : principais polímeros e avaliação de propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, 2002. ISBN 8570290489 9788570290489.

SCHMIDT, V.; GIACOMELLI, C.; SOLDI, V. Thermal stability of films formed by soy protein isolate-sodium dodecyl sulfate. **Polymer Degradation and Stability**, v. 87, n. 1, p. 25-31, Jan 2005. ISSN 0141-3910. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225743400004 >.

SENGUPTA, T.; HAN, J. H. Chapter 4 - Surface Chemistry of Food, Packaging, and Biopolymer Materials. In: HAN, J. H. (Ed.). **Innovations in Food Packaging (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2014. p.51-86. ISBN 978-0-12-394601-0.

SILVA, E. C. D.; PAOLA, M. V. R. V. D.; MATOS, J. D. R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 347-356, 2007. ISSN 1516-9332. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322007000300004&nrm=iso >.

SILVA-WEISS, A. *et al.* Natural Additives in Bioactive Edible Films and Coatings: Functionality and Applications in Foods. **Food Engineering Reviews**, v. 5, n. 4, p. 200-216, Dec 2013. ISSN 1866-7910. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000326290900002 >.

SINGH, N. *et al.* Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219-231, May 2003. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000181666800007 >.

SOARES, R. M. D.; SCREMIN, F. F.; SOLDI, V. Thermal Stability of Biodegradable Films Based on Soy Protein and Corn Starch. **Macromolecular Symposia**, v. 229, n. 1, p. 258-265, 2005. ISSN 1521-3900. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/masy.200551132> >.

SOBRAL, P. J. A. *et al.* Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 4-6, p. 423-432, 7/11/ 2001. ISSN 0268-005X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X01000613> >.

SOUSA, G. M. D. **Desenvolvimento de Filmes Biodegradáveis Ativos e Aplicação na Conservação de Massa Alimentícia Fresca**. 2012. 89 (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiás, Brasil, 2012.

SOUZA, A. C. *et al.* Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: Antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 346-352, 12// 2013. ISSN 0023-6438. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364381300234X> >.

SOUZA, C. O. *et al.* Mango and Acerola Pulps as Antioxidant Additives in Cassava Starch Bio-based Film. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2248-2254, Mar 23 2011. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000288401800017 >.

SOUZA, C. O. D.; SILVA, L. T.; DRUZIAN, J. I. Estudo Comparativo da Caracterização de Filmes Biodegradáveis de Amido de Mandioca Contendo Polpas de Manga e de Acerola. **Química Nova**, v. 35, p. 262-267, 2012. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000200006&nrm=iso >.

SOUZA, R. C. R.; ANDRADE, C. T. Investigação dos processos de gelatinização e extrusão de amido de milho. **Polímeros**, v. 10, p. 24-30, 2000. ISSN 0104-1428. Disponível em: <

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282000000100006&nrm=iso >.

TANADA-PALMU, P. S.; GROSSO, C. R. F. Effect of edible wheat gluten-based films and coatings on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. **Postharvest Biology and Technology**, v. 36, n. 2, p. 199-208, 2005. ISSN 0925-5214. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092552140400287X> >.

TAPIA-BLACIDO, D.; SOBRAL, P. J.; MENEGALLI, F. C. Development and characterization of biofilms based on Amaranth flour (*Amaranthus caudatus*). **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1-2, p. 215-223, Mar 2005. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225668600021 >.

TONGNUANCHAN, P. *et al.* Emulsion film based on fish skin gelatin and palm oil: Physical, structural and thermal properties. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 248-259, Jun 2015. ISSN 0268-005X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000352697700029 >.

TOSATI, J. V. **Determinação da Taxa de Respiração de Tomate Cereja e da Permeabilidade à Gás de Filme Comestível a Base de Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)**. 2013. 106 f (Mestre em Engenharia de Alimentos). Engenharia de Alimentos e Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, Brasil, 2013.

VANDERROOST, M. *et al.* Intelligent food packaging: The next generation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 39, n. 1, p. 47-62, 9// 2014. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092422441400137X> >.

VIÑA, S. Z. *et al.* Effects of polyvinylchloride films and edible starch coatings on quality aspects of refrigerated Brussels sprouts. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 701-709, 2007. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606007229> >.

WANG, G.; THOMPSON, M. R.; LIU, Q. Controlling the moisture absorption capacity in a fiber-reinforced thermoplastic starch using sodium trimetaphosphate. **Industrial Crops and Products**, v. 36, n. 1, p. 299-303, Mar 2012. ISSN 0926-6690. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000300921100044 >.

WIHODO, M.; MORARU, C. I. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 3, p. 292-302, Feb 2013. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000312172800002 >.

WOLF, K. L. **Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra e pó de colágeno**. 2007. 103 (Dissertação (apresentada ao final do curso de pós-graduação *strictosensu* em Engenharia de Alimentos)). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José de Rio Preto – SP.

ZHANG, Y.; REMPEL, C.; MCLAREN, D. Chapter 16 - Thermoplastic Starch. In: HAN, J. H. (Ed.). **Innovations in Food Packaging (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2014. p.391-412. ISBN 978-0-12-394601-0.

ZHAO, R. X.; TORLEY, P.; HALLEY, P. J. Emerging biodegradable materials: starch- and protein-based bio-nanocomposites. **Journal of Materials Science**, v. 43, n. 9, p. 3058-3071, May 2008. ISSN 0022-2461. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000254458500007 >.

ZHONG, Y.; SONG, X. Y.; LI, Y. F. Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch-chitosan composite films as a function of acid solvent types. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 335-342, Feb 2011. ISSN 0144-8617. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000287349500044 >.