



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

UTILIZAÇÃO DE AMIDO, ÓLEO DE ORÉGANO E EXTRATO DE RESÍDUO
DE ABÓBORA PARA O DESENVOLVIMENTO DE FILMES
BIODEGRADÁVEIS ATIVOS

Karine dos Santos Caetano

Porto Alegre, Abril de 2016.

Karine dos Santos Caetano

**UTILIZAÇÃO DE AMIDO, ÓLEO DE ORÉGANO E EXTRATO DE RESÍDUO
DE ABÓBORA PARA O DESENVOLVIMENTO DE FILMES
BIODEGRADÁVEIS ATIVOS**

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

Orientadora: Prof. Dra. Florencia Cladera Olivera
Co-orientadora: Prof. Dra. Simone Hickmann Flôres

Porto Alegre, Abril de 2016.

CIP - Catalogação na Publicação

Caetano, Karine dos Santos

UTILIZAÇÃO DE AMIDO, ÓLEO DE ORÉGANO E EXTRATO DE
RESÍDUO DE ABÓBORA PARA O DESENVOLVIMENTO DE FILMES
BIODEGRADÁVEIS ATIVOS / Karine dos Santos Caetano. -
- 2016.
121 f.

Orientador: Florencia Cladera Olivera.
Coorientador: Simone Hickmann Flôres.

Dissertação (Mestrado) -- 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 ativos biodegradáveis. 2. Aplicação em
alimentos. I. Cladera Olivera, Florencia, orient.
II. Flôres, Simone Hickmann, coorient. III. Título.

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

Autora: Karine dos Santos Caetano (Engenheira de Alimentos/UNEMAT – Campus Barra do Bugres-MT)

Título da dissertação: Utilização de amido, óleo de orégano e extrato de resíduo de abóbora para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis ativos

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

Aprovada em:/...../.....

Pela banca examinadora:

Prof^a. Dra. Florencia Cladera Olivera
Orientadora
Docente do Instituto de Ciência e
Tecnologia
de Alimentos PPGCTA/UFRGS

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

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

Banca: Dra. Jordana Corralo Spada
Doutora em Engenharia Química -
UFRGS
DEQUI/UFRGS

Banca: Prof. Dr. Alessandro de
Oliveira Rios
Doutor em Ciência dos Alimentos -
UNICAMP
PPGCTA/UFRGS
Homologada em:/...../.....
Por:

Prof^a. Dra. Rosane Rech
Coordenadora do PPGCTA

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Diretor do ICTA

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos vai para meus pais, Osméria e Dofico, que do modo deles, sempre me incentivam cada vez mais a buscar pelo conhecimento. Por todo amor e compreensão, pelo apoio em minhas escolhas e por estarem sempre ao meu lado quando mais preciso e a minha irmã pelo companheirismo e amizade.

Aos meus sogros, Dilse e Cesar, que me acolheram e dão todo apoio.

Agradecimentos especiais ao meu namorado Roger, meu maior incentivador, pela compreensão, suporte emocional e imensa ajuda na elaboração deste trabalho. Obrigada pelos momentos de descontração, pelo carinho e amor dedicados a mim.

Meu muito obrigado aos amigos que ganhei no mestrado, Alessandra, Lucas e Luz, vocês foram sem dúvida essenciais para tornar essa etapa mais leve e divertida, obrigada pelos bons momentos, pela viagem, companhia na descoberta de novos restaurantes mexicanos e comemorações.

À minha orientadora Florencia Cladera Olivera e Co-orientadora Simone Hickmann Flôres pela condução e contribuições valiosas, obrigada pela confiança e pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

Ao professor Alessandro Rios pela disposição de sempre nos atender e sanar dúvidas.

À todos do Lab 211, principalmente ao Carlos, Camila e Vanessa que em algum momento se dispuseram a me ajudar.

Aos ICs Carolinne e Adson.

Ao laboratório de Microbiologia e Bioquímica e Microbiologia Aplicada do ICTA, por ceder todo material e estrutura na realização de uma parte do trabalho.

Agradecimentos especiais a Nathalie Lopes e Cláudia Hessel que contribuíram com as análises microbiológicas.

À UFRGS e ao ICTA.

À FAPERGS pela bolsa de estudos e Degasperi por ter concedido os resíduos.

À banca examinadora pelas contribuições.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

RESUMO

O impacto ambiental causado por materiais plásticos utilizados como embalagem e a grande quantidade de resíduos gerados pela indústria de alimentos, é uma crescente preocupação. Como alternativa para reduzir os problemas de disposição de resíduos e o uso excessivo de materiais não biodegradáveis, têm-se realizado diversas pesquisas sobre o desenvolvimento de filmes a partir de biopolímeros e de resíduos alimentares ou a combinação destes. Os filmes produzidos podem ser utilizados para substituir parcialmente o uso de plástico não biodegradável e representam uma alternativa para agregar valor a materiais até então subutilizados com redução do consumo de materiais provenientes de fontes não renováveis. Neste contexto, desenvolveu-se um filme biodegradável com propriedades antioxidantes e antimicrobianas a partir do amido de mandioca e adição de óleo essencial de orégano e extrato de resíduo de abóbora. Os filmes foram caracterizados quanto a suas propriedades físico-químicas, mecânicas, de barreira e antioxidantes (DPPH). De acordo com os resultados obtidos, foram selecionados os melhores filmes, e caracterizados quanto suas propriedades óticas, térmicas e antimicrobianas. Posteriormente, foram selecionadas duas formulações para o teste de proteção contra oxidação em carne moída e uma formulação para avaliar o efeito do filme em carne moída em relação à atividade antimicrobiana contra coliformes, mesófilos e *Salmonella*. A adição do extrato do resíduo de abóbora teve efeito na cor e na opacidade dos filmes, e o óleo essencial de orégano teve efeito positivo na atividade antioxidante avaliada pelo método de captura do radical DPPH. O óleo e o glicerol provocaram aumento na alongação e uma redução na resistência à tração dos filmes. As formulações com as maiores concentrações de extrato e óleo essencial apresentaram atividade antioxidante acima de 45% de inibição do radical DPPH. Nos testes de atividade antimicrobiana, os filmes de formulação 8 (4,8% de extrato, 1,6% de óleo, 1,76% de glicerol, 4% de amido de mandioca) e 12 (3% de extrato, 2% de óleo, 1,7% de glicerol e 4% de amido de mandioca) foram efetivos contra *Escherichia coli*, *Stafilococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Em relação à aplicação dos filmes em carne moída, o filme ativo (2% de óleo e 3% de extrato) foi efetivo no retardo da oxidação do produto embalado. Os filmes ativo e o filme controle (sem adição de óleo e extrato) foram efetivos até o terceiro dia de armazenamento contra a multiplicação de coliformes e mesófilos. O filme ativo foi mais efetivo na redução da contagem de coliformes comparado com o filme controle e a carne sem filme. No teste de multiplicação de *Salmonella* Enteritidis, o filme ativo apresentou menor contagem no dia 6 quando comparado com o filme controle o que demonstra sua efetividade para uso na manutenção da qualidade microbiológica de carnes. De modo geral, os filmes produzidos se mostraram como uma alternativa de embalagem ativa biodegradável para o uso em alimentos.

ABSTRACT

The environmental impact, caused by waste plastic material used as packaging and the large amount of waste generated by the food industry, is a growing concern. As an alternative to reduce the waste disposal problem and the excessive use of non-biodegradable materials, many studies are being conducted in order to develop biodegradable films from biopolymers and food waste or a combination of both. The films produced may be used to partially replace the use of non-biodegradable plastic material, in this way emerging as an alternative to add value to materials so far underutilized and reduce the consumption of materials from non-renewable sources. In this context, it was developed a biodegradable film with antioxidant and antimicrobial properties from cassava starch with addition of pumpkin residue extract and oregano essential oil. The films were characterized based on physico-chemical, mechanical, barrier and antioxidant (DPPH) properties. According to the results, the best films were selected and characterized upon their optical, thermal and antimicrobial properties. From these results, two formulations were selected for the protection against oxidation test which was conducted on ground beef and one formulation to evaluate the film antimicrobial activity against coliforms, mesophiles and *Salmonella* on ground beef. It was observed that the addition of pumpkin residue extract had effect on the color and opacity of the films, and the oregano essential oil had a positive effect on the antioxidant activity of the films evaluated by the DPPH radical capture method. The oil and glycerol caused an increase in elongation and a reduction in films tensile strength. In the antimicrobial activity test, the films formulation 8 (4.8% extract, 1.6% oil, 1.76% glycerol, 4% cassava starch) and 12 (3% extract, 2% oil, 1.7% glycerol and 4% cassava starch) were effective against *Escherichia coli*, *Stafilococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Regarding the application of the films on ground beef, the active film (2% oil and 3% extract) was effective in delaying the meat oxidation. The active film and the control film (without oil and extract) were effective until the third day of storage against the coliforms and mesophiles multiplication. The active film was more effective in reducing coliform count compared to the control film and meat without film. In *Salmonella* Enteritidis multiplication test, the active film showed a lower count on the 6th day when compared to the film control which demonstrates its effectiveness when used to maintain the meat microbiological quality. In general terms, the films produced have proved suitable as an alternative biodegradable active packaging to be used on food.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 1: Resíduo do processamento mínimo de abóbora.....	33
Figura 2: Processo de obtenção do resíduo triturado (esquerda); resíduo seco (direita).	35
Figura 3: Preparo da solução filmogênica e plaqueamento.	37
Figura 4: Micrômetro digital usado para medir a espessura dos filmes.....	38
Figura 5: Análise da solubilidade dos filmes biodegradáveis.	38
Figura 6: Texturômetro usado para análise das propriedades mecânicas.	39
Figura 7: Cápsulas de permeabilidade com filmes (esquerda) e câmara de vidro usadas para análise de PVA dos filmes (direita).	40
Figura 8: Análise de cor dos filmes usando o colorímetro.	41
Figura 9: Equipamento usado para avaliar a estabilidade térmica dos filmes. .	42
Figura 10: Microscópio eletrônico de varredura (direita); filmes colados em stubs metalizados com ouro (meio); exemplo de imagem obtida com aumento de 1500 x da superfície de um filme.....	42
Figura 11: Filme usado para embalar carne moída para avaliar a atividade antioxidante do filme	44
Figura 12: Discos de filmes apresentando halos de inibição em placa inoculada com E. coli.....	45
Figura 13: Carne usada para aplicação do filme.	45
Figura 14: Carne embalada com os filmes.	46
Figura 15: Petrifilm™ utilizado para contagem de Coliformes.	47

CAPÍTULO 3: ARTIGOS CIENTÍFICOS

Active Biodegradable Films Developed with Cassava Starch, Oregano Oil, and Pumpkin Residue Extract

Figure 1: Response surface for DPPH scavenging activity (SA %) as a function of pumpkin extract and oregano essential oil.	65
Figure 2: Response surface for percentage elongation at break (EB %) as a function of oregano essential oil and glycerol.....	66
Figure 3: Response surface for color difference (ΔE) as a function of pumpkin residue extract and oregano essential oil.	67
Figure 4: Response surface for opacity (OP Abs.nm) as a function of pumpkin residue extract and oregano essential oil.	69
Figure 5: Thermogravimetric analysis curves for the selected films (composition of the films according to Table 2).	70
Figure 6: Images obtained by scanning electron microscopy of the surface of F7, F8, F12, F13, F16 and control (FC) films, enlarged x1000.....	72
Figure 7: Films antioxidant activity as packaging for ground beef.....	72

**Application of Active Cassava Starch Films Incorporated with Oregano
Essential Oil and Pumpkin Residue Extract on Ground Beef.**

Figure 1: Images obtained by SEM of the surface of the AF and CF at magnification of 1,000x. 91

Figure 2: Coliform count (a) and mesophilic count (b) in ground beef packaged with active films. 94

Figure 3: Salmonella count in ground beef packaged with active films.....98

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 1: Planejamento rotacional completo 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais.	36
--	----

CAPÍTULO 3: ARTIGOS CIENTÍFICOS

Active Biodegradable Films Developed with Cassava Starch, Oregano Oil, and Pumpkin Residue Extract

Table 1: Proximate composition of pumpkin residue.	60
Table 2: A complete rotacional experimental design, 2^3 with repetitions of center points and responses for the following independent variables: thickness (T), moisture content (MC), DPPH scavenging activity (SA), tensile strength (TS), percentage elongation at break (EB) and water vapor permeability (WVP)	56
Table 3: A complete rotacional experimental design, 2^3 with repetitions of center points and responses for the following independent variables: Parameters CIE (L, a^* , b^*), Color (C) and Opacity (OP)	63
Table 4: Regression coefficients and analysis of variance (ANOVA) for DPPH radical scavenging capacity (SA), percent elongation at break (EB), color (C) and opacity (OP).	64
Table 5: Results for films water solubility.	73
Table 6: Antimicrobial Activity of selected films against the tested microorganisms.	74

Application of Active Cassava Starch Films Incorporated with Oregano Essential Oil and Pumpkin Residue Extract on Ground Beef.

Table 1: Thickness (T), moisture content (MC), solubility (SO), DPPH scavenging activity (SA) and water vapor permeability (WVP) of films.....	90
Table 2: pH values for ground beef stored at 4 ± 1 °C for 6 days.....	92
Table 3: Color properties of the ground beef packed with active starch films...	93

CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Tabela 1: Formulações e propriedades dos filmes produzidos a base de amido de mandioca com extrato de resíduo de abóbora e óleo essencial de orégano.	103
--	-----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 Filmes Biodegradáveis	16
3.2 Filmes Biodegradáveis Ativos	17
3.2.1 Agentes Antioxidantes	17
3.2.1.1 Carotenoides	18
3.2.2 Agentes Antimicrobianos	19
3.2.2.1 Óleo de Orégano	20
3.3 Filmes de Amido de Mandioca	22
3.4 Abóboras	23
3.4.1 Aproveitamento de Resíduos na Produção de Filmes Biodegradáveis	24
3.7 Caracterização dos Filmes Biodegradáveis	27
3.7.1 Propriedades Mecânicas	27
3.7.2 Propriedades Morfológicas	28
3.7.3 Propriedades Óticas	28
3.7.4 Propriedades Térmicas	29
3.7.5 Permeabilidade ao vapor de água	29
3.7.6 Espessura	30
3.7.7 Propriedade Antioxidante	30
3.7.8 Atividade Antimicrobiana	31
CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Materiais	33
4.2 Composição centesimal do resíduo (Casca)	34
4.3 Extrato do resíduo de abóbora para adição aos filmes e identificação de carotenoides	34
4.4 Extrato para identificação de carotenoides do resíduo de abóbora	35

4.4.1 Condições cromatográficas.....	35
4.4 Preparo dos filmes.....	35
4.5 Caracterização dos filmes biodegradáveis	37
4.5.1 Umidade.....	37
4.5.2 Espessura	37
4.5.3 Solubilidade.....	38
4.5.4 Propriedades mecânicas.....	39
4.5.5 Permeabilidade ao vapor de água.....	39
4.5.6 Cor	40
4.5.7 Opacidade.....	41
4.5.8 Propriedade térmica	41
4.5.8 Propriedade morfológica	42
4.5.9 Propriedade antioxidante	42
4.5.9.2 TBARS.....	43
4.5.10 Propriedade antimicrobiana	44
4.6 Aplicação em carne moída	45
4.6.1 Análises de pH e cor das amostras.....	46
4.6.2 Análises Microbiológicas	47
4.6.2.1 Contagem de Coliformes e Mesófilos	47
SEÇÃO 3: ARTIGOS CIENTÍFICOS	50
ARTIGO 1: Active Biodegradable Films Developed with Cassava Starch, Oregano Oil, and Pumpkin Residue Extract	51
ARTIGO 2: Application of Active Cassava Starch Films Incorporated with Oregano Essential Oil and Pumpkin Residue Extract on Ground Beef.....	83
CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES E PERSPECTIVA	101
DISCUSSÃO GERAL	102
CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS.....	106

1 INTRODUÇÃO

A embalagem dos alimentos tem como principal objetivo proteger os produtos contra danos físicos, degradações como a oxidação e evitar contaminação microbiológica. O plástico é amplamente utilizado para satisfazer esses quesitos, devido ao baixo custo, qualidades estéticas, conveniência e propriedades mecânicas. Porém o impacto ambiental dos resíduos de material plástico não biodegradável é uma preocupação crescente .

A necessidade de reduzir o uso de recursos não renováveis tem sido motivação de estudos para verificar materiais alternativos para embalagens e uma das opções é o uso de filmes biodegradáveis (Ferreira *et al.*, 2009; Nobrega *et al.*, 2013). Novos materiais para embalagens, derivados de fontes renováveis, como os filmes com base biológica, têm sido produzidos a partir de uma variedade de matérias-primas.

Devido ao inevitável aumento dos preços dos materiais à base de petróleo e às preocupações ambientais, o desenvolvimento de materiais poliméricos, com base em recursos renováveis tem se tornado cada vez mais importante nos últimos anos. Estes materiais utilizados na produção de embalagens podem ajudar a resolver o problema de eliminação de resíduos, pela substituição parcial de plásticos não biodegradáveis. Eles também podem atuar como uma barreira a influências externas, tais como vapor de água e oxigênio ou como veículo para compostos funcionais para aumentar o valor nutricional dos alimentos.

Com isso, na última década, houve um interesse crescente no desenvolvimento e uso de filmes biodegradáveis ativos com atividade antimicrobiana e antioxidante com o objetivo de melhorar a segurança do alimento e reduzir o uso de conservantes químicos, visto que os consumidores cada vez mais preferem alimentos frescos e produtos minimamente processados. Esses filmes podem ser constituídos por biopolímeros como amidos, derivados de celulose, quitosana / quitina, gomas, proteínas animais ou à base de plantas e lipídeos. Entre os biopolímeros, o amido destaca-se por ser biodegradável, de baixo custo e disponível em todo mundo.

Para elaboração de filmes biodegradáveis ativos, compostos antimicrobianos e antioxidantes têm sido incorporados na matriz polimérica do filme. O óleo essencial de orégano é bastante conhecido por suas propriedades

antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória, o que o torna uma ótima alternativa como conservante natural para alimentos. Os principais componentes de sua composição, responsáveis por sua atividade antimicrobiana são o timol e carvacrol.

No mesmo sentido existem muitas pesquisas voltadas para a utilização de subprodutos e resíduos de alimentos com intuito de extrair compostos bioativos e adicioná-los ao filme ou mesmo utilizá-los como material base para produzir o filme. Diversos estudos mostram que estes resíduos são fontes de compostos bioativos que possuem considerável atividade antioxidante (Oreopoulou and Tzia, 2007; Galanakis, 2012; Martin-Sanchez *et al.*, 2014). Assim, o uso da casca de abóbora, oriundo da indústria de minimamente processados é uma alternativa para converter esse resíduo de baixo custo e abundante, em produtos de alto valor que podem trazer benefícios para os consumidores e para a indústria de alimentos.

Nesse contexto o objetivo do trabalho foi desenvolver filmes biodegradáveis ativos, utilizando amido de mandioca como matriz polimérica e como aditivos naturais, o extrato da casca da abóbora Cabotiá e o óleo essencial de orégano.

Esta dissertação está organizada em 4 Capítulos. No **Capítulo 1** é apresentada uma revisão bibliográfica referente a filmes biodegradáveis, bem como a matéria-prima utilizada a para produção dos mesmos, além de aspectos relacionados à caracterização destes filmes. No **Capítulo 2** é apresentada de forma detalhada a metodologia utilizada. Os resultados são apresentados na forma de artigos científicos no **Capítulo 3** que é composto por dois artigos científicos sendo o primeiro artigo intitulado “**Active Biodegradable Films Developed with Cassava Starch, Oregano Oil, and Pumpkin Residue Extract**” e o segundo intitulado “**Application of Active Cassava Starch Films Incorporated with Oregano Essential Oil and Pumpkin Residue Extract on Ground Beef**”. No **Capítulo 4**, encontra-se a discussão geral, conclusões e perspectivas referentes a esta dissertação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar e aplicar filmes biodegradáveis, com propriedades antioxidantes e antimicrobianas, formulados a partir de amido de mandioca adicionado de extrato do resíduo (casca) de abóbora e óleo essencial de orégano.

2.2 Objetivos Específicos

O trabalho apresenta os seguintes objetivos específicos:

- ✓ obter extrato do resíduo de abóbora cabotiá e caracterizá-lo quanto à atividade antioxidante e à composição de carotenoides;
- ✓ produzir filmes biodegradáveis a partir de amido de mandioca com adição do extrato de resíduo de abóbora e óleo essencial de orégano, com diferentes formulações;
- ✓ caracterizar os filmes obtidos quanto às propriedades físico-químicas, mecânicas, morfológicas, óticas, antioxidante e antimicrobianas;
- ✓ aplicar os filmes para embalar carne moída e verificar sua eficiência em relação à proteção da oxidação lipídica e multiplicação de microrganismos.

CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Filmes Biodegradáveis

A embalagem dos alimentos tem como principal objetivo proteger os produtos contra impactos físicos, danos oxidativos e contaminação microbológica. Além disso, são utilizadas também para informar o consumidor sobre o alimento que acondicionam (Marcos *et al.*, 2013; Ünalán *et al.*, 2013; Motarjemi, 2014).

Dentre os materiais disponíveis, o plástico é amplamente utilizado para satisfazer esses requisitos, devido ao baixo custo, conveniência, qualidades estéticas, e propriedades mecânicas (Gomez e Michel, 2013). No entanto, o uso de plásticos de fontes não renováveis causa grandes impactos ambientais (Martins Cerqueira e Vicente, 2012).

Estudos de avaliação de materiais alternativos para embalagens têm sido motivados devido à preocupação em reduzir o uso de recursos não renováveis (Ferreira *et al.*, 2009; Nobrega *et al.*, 2013). O desenvolvimento de filmes ou revestimentos comestíveis à base de biopolímeros naturais (proteínas, polissacarídeos e seus derivados) fornece uma alternativa potencial para os materiais de embalagem não-biodegradáveis (Souza *et al.*, 2010).

Filmes são geralmente utilizados em alimentos com a finalidade de proteger os mesmos, inibindo ou minimizando a permeação de umidade, oxigênio, dióxido de carbono, aromas e a migração de lipídios. Podem também carregar compostos antimicrobianos e antioxidantes, conferir proteção mecânica ou auxiliar no aumento da vida de prateleira de alimentos (Krochta and De Mulder-Johnston, 1997).

Filmes comestíveis podem ser definidos como uma camada fina e contínua de material formado ou colocado sobre ou entre os alimentos ou componentes de alimentos (Bravin *et al.*, 2006; Falguera *et al.*, 2011). Esses podem ser produzidos a partir de biopolímeros, incluindo proteínas, lipídeos e carboidratos, que são comestíveis e biodegradáveis (Coma, Véronique, 2008). O seu uso em alimentos, especialmente produtos altamente perecíveis, é baseado em algumas propriedades particulares, tais como custo, disponibilidade, atributos funcionais, propriedades mecânicas (flexibilidade, tensão), propriedades ópticas (brilho e luminosidade), o efeito barreira contra

gases, resistência estrutural à água e microrganismos e aceitabilidade sensorial (Falguera *et al.*, 2011).

Essas características são influenciadas por parâmetros tais como o tipo de material aplicado, matriz estrutural (composição, distribuição de massa molar), as condições sob as quais os filmes são pré-formados (tipo de solvente, pH, concentração dos componentes e temperatura) e o tipo e concentração dos aditivos (plastificantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes ou agentes emulsificantes) (Rojas-Graü *et al.*, 2009).

No entanto, estes biopolímeros podem ser mais caros do que os filmes plásticos, sendo que o custo total de um alimento está relacionado com o custo do material de embalagem. Deste modo, a busca por materiais de embalagem de menor custo é um interesse da indústria de alimentos (Aider, 2010). Campos, Gerschenson e Flores (2011) recomendam o uso de biopolímeros a partir de materiais subutilizados ou subprodutos da indústria de alimentos e resíduos, para reduzir o custo dos filmes.

3.2 Filmes Biodegradáveis Ativos

A produção de uma embalagem ativa tem como objetivo incorporar componentes ativos que sejam liberados ou absorvidos pelo alimento embalado com o intuito de prolongar a vida de prateleira e também contribuir para maximizar a proteção (Bolumar, Andersen e Orlien, 2011; Marcos *et al.*, 2013; Ünalán *et al.*, 2013).

Filmes comestíveis bioativos podem ser considerados como uma alternativa natural e biodegradável para prolongar a vida de prateleira de alimentos atuando como barreiras protetoras e como veículos de compostos bioativos, tais como agentes antimicrobianos e antioxidantes (Pastor *et al.*, 2013).

3.2.1 Agentes Antioxidantes

Tem-se observado um crescente aumento na demanda dos consumidores por produtos alimentícios sem aditivos artificiais e um maior interesse em antioxidantes naturais. Pesquisas têm sido realizadas para viabilizar o uso desses compostos em materiais de embalagem, como por exemplo, os

compostos fenólicos (Camo *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2011; Marcos *et al.*, 2014). Embalagens com ação antioxidante podem evitar a oxidação de alimentos que poderiam desencadear o desenvolvimento de “*off-flavours*”, mudanças na cor, sabor e perdas nutricionais (Marcos *et al.*, 2014).

De acordo com Bolumar, Andersen e Orlien (2011), incluir no material da embalagem compostos antioxidantes propicia vantagens quando comparado à adição direta aos alimentos, tais como menores quantidades de substâncias ativas necessárias, atividade centrada na superfície do produto, liberação controlada para a matriz alimentícia e a eliminação de etapas adicionais no processo de produção necessária para adição dessas substâncias. Nesse sentido, trabalhos tem sido desenvolvidos com adição de compostos antioxidantes em filmes para proporcionar uma alternativa de embalagem funcional para alimentos (Medina Jaramillo *et al.* 2015; Peng, Wu e Li, 2013; Pastor *et al.*, 2013)

Há também o estudo da adição de antioxidantes naturais como terpenos, tocoferóis, carotenoides e vitaminas adicionados em filmes com o objetivo de melhorar a estabilidade em relação à oxidação lipídica dos produtos gordurosos (Falguera *et al.*, 2011; Gómez-Estaca *et al.*, 2014).

3.2.1.1 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis responsáveis pela coloração de uma vasta variedade de alimentos. Eles podem ser divididos em dois grupos: xantofilas, moléculas que contêm oxigênio, tais como luteína e zeaxantina; e, carotenos, moléculas não oxigenadas, tais como α -caroteno e licopeno (Shen *et al.*, 2009). Alguns carotenoides são pró-vitâmicos, e posteriormente, são transformados em vitamina A no organismo, o que pode prevenir doenças oculares graves, como a cegueira noturna, a susceptibilidade à infecção, pele escamosa entre outras (Amorim-Carrilho *et al.*, 2014), sendo que dos 700 carotenoides existentes, apenas 50 apresentam essa característica e, somente três são encontrados em alimentos: β -caroteno, β -criptoxantina e α -caroteno (Lozano-Alejo *et al.*, 2007; Jaswir *et al.*, 2011). A ingestão de carotenoides tem grande relevância já que estas substâncias lipofílicas possuem propriedades

antioxidante, atividade provitamina A e contribuem na prevenção do câncer (Jorgensen and Skibsted, 1993; Krinsky, 1994; Astorg, 1997).

Embora os carotenoides estejam presentes em muitos alimentos consumidos pelos humanos, as frutas e verduras bastante pigmentadas constituem suas principais fontes como: vegetais e frutas amarelo-laranja que fornecem a maior parte do β -caroteno e α -caroteno; frutas de cor laranja fornecem α -criptoxantina; vegetais verde-escuros fornecem a luteína e a zeaxantina, tomates e produtos de tomate o licopeno (Rao e Rao, 2007).

Como exemplos de boas fontes de β -caroteno tem-se couve, nabo, espinafre, alface, manga, melão cantaloupe, pimentão, abóbora, cenoura e batata-doce. O α -caroteno é encontrado em um número limitado de vegetais alaranjados, como cenoura, batata doce, abóbora e vegetais verde-escuros, como brócolis, feijão verde e espinafre (Amorim-Carrilho *et al.*, 2014; Khoo *et al.*, 2011; Lakshminarayana *et al.*, 2005). Quase todos os carotenoides, em maior ou menor grau, mostram propriedades de eliminação de quantidades excessivas de radicais livres, que podem ser produzidas durante o curso do ciclo de vida de uma célula (Gonnet, Lethuaut e Boury, 2010; Santocono *et al.*, 2007; Rodriguez-Amaya, 1997), sendo eficientes supressores de oxigênio singlete, protegendo células e outros componentes do corpo do ataque de radicais livres (Jomova e Valko, 2013). O dano oxidativo resultante do ataque de radicais livres tem sido associado com o início do envelhecimento prematuro, câncer, aterosclerose, catarata, degeneração macular relacionada com a idade e uma gama de outras doenças degenerativas (Murkovic, Müllleder e Neunteufl, 2002; Rao e Rao, 2007).

3.2.2 Agentes Antimicrobianos

Como forma de introduzir agentes ativos para preservar alimentos, antimicrobianos podem ser adicionados aos filmes, sendo que essa é uma das maiores áreas de pesquisa em embalagens para alimentos (Rojas-Grau *et al.*, 2006). Dentre os antimicrobianos mais utilizados em embalagens biodegradáveis estão os óleos essenciais (óleo de orégano, óleo de alecrim, óleo de sálvia, tomilho, canela, entre outros), nanopartículas metálicas, enzimas ou matrizes poliméricas com atividade antimicrobiana como a quitosana (Seydin e

Sarikus, 2006; Pelissari et al., 2009; Taqui, Mutihac e Stmatin, 2013; Souza et al., 2013; Aguire Borneo e Leon, 2013; Higuera et al., 2013; Kaisangsri, Kerdchoechuen e Laohakunjit, 2014; Debiagi et al., 2014; Arancibia et al., 2014; Pagno et al., 2015)

Os óleos essenciais são utilizados por serem naturais e por promoverem modificações nas características dos filmes, tais como melhoria nas propriedades mecânicas e de barreira. Além disso, muitas vezes, possuem outras propriedades benéficas no desenvolvimento de filmes tais como atividade antioxidante (Rojas-Graü et al., 2006; Benavides, Villalobos-Carvajal e Reyes, 2012; Ghasemlou et al., 2013).

3.2.2.1 Óleo de Orégano

Óleos essenciais são líquidos voláteis aromáticos e desempenham papel de defesa na planta e geralmente possuem propriedade antimicrobiana, trata-se de metabólitos secundários e podem ser usados como agentes flavorizantes para consumo de humanos e animais sendo reconhecidos como seguros (GRAS) nos Estados Unidos (Arfa et al., 2007; Hyldgaard et al., 2012; Shah et al., 2012) e dessa forma pode representar uma alternativa para o uso como ingrediente antimicrobiano natural (Arfa et al., 2007).

Quando em emulsão, os óleos essenciais possuem melhor eficiência em sistemas alimentares devido à estabilização de seus compostos o que aumenta sua liberação no meio (Bhargava et al., 2015). Além disso podem apresentar-se como alternativa ao uso de sanitizantes químicos contra bactérias (Bhargava et al., 2015), o que aumenta o interesse em relação ao seu uso, uma vez que existe uma percepção negativa por parte dos consumidores quanto ao uso de conservantes sintéticos (Hyldgaard et al., 2012). Os principais componentes dos óleos essenciais são do grupo de terpenos como os hidrocarbonetos mono e sesquiterpeno, aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres, óxidos e derivados de fenol (Alinkina et al., 2013; Grondona et al., 2014).

O orégano (*Origanum vulgare L.*) pertence à família Lamiaceae e é encontrado na Europa, Bacia do Mediterrâneo e Ásia (Perez G et al., 2011). Possui importantes propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, antifúngica e antioxidante (Kordali et al., 2008; Garcia-Perez et al., 2013).

Os mais de 200 componentes do óleo essencial de orégano estão divididos em duas frações principais: fração volátil, constituída por 90 a 95% do óleo, responsável pelo aroma característico e a fração não volátil de 5 a 10% do óleo (Grondona *et al.*, 2014). Os terpenos mais encontrados no orégano são o timol e carvacrol, os principais responsáveis por suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (Seydim and Sarikus, 2006; Dundar *et al.*, 2008). Atribui-se o modo de ação dessas substâncias pela alteração na membrana citoplasmática, que modifica a força motriz de prótons, o fluxo de elétrons, transporte ativo e/ou a coagulação de conteúdo celular (Burt, 2004).

O óleo de orégano quando aplicado diretamente sobre o alimento (por imersão ou pulverização), tem suas substâncias neutralizadas ou são difundidas rapidamente da superfície do alimento e também provocam alterações nas características sensoriais (Coma, Veronique, 2008; Avila-Sosa *et al.*, 2010).

Para evitar esses problemas, uma solução é a incorporação de óleo essencial em filmes comestíveis. Os filmes adicionados de óleos, podem servir como transportadores dos agentes antimicrobianos sobre a superfície do alimento, controlando o crescimento de patógenos e deteriorações (Krochta e De Mulder-Johnston, 1997; Marsh e Bugusu, 2007). Outras vantagens incluem: a manutenção de altas concentrações do agente ativo diretamente na superfície do alimento, com baixas taxas de migração, redução das chances de inativação da substância ativa pelos constituintes do alimento e diminuição do uso de aditivos sintéticos (Coma, Veronique, 2008). Porém alguns fatores podem influenciar a liberação do agente antimicrobiano dos filmes comestíveis, como: mudanças estruturais causadas pela adição do antimicrobiano, interações eletrostáticas (entre a substância e as cadeias poliméricas), osmose e condições ambientais (Avila-Sosa *et al.*, 2010).

De acordo com estudos realizados sobre a atividade antibacteriana com vários óleos essenciais, o de orégano tem-se mostrado o mais efetivo (Seydim e Sarikus, 2006; Friedman *et al.*, 2015; Pagno *et al.*, 2016). Conforme estudo feito por Seydim e Sarikus (2006), filmes à base de proteína de soro adicionados de óleo de orégano foram mais eficientes contra *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, e *Lactobacillus plantarum* do que os óleos de alecrim e alho.

Pelissari *et al.* (2009) desenvolveram filmes à base de amido de mandioca e quitosana com incorporação de óleo essencial de orégano e obtiveram filmes com atividade antimicrobiana contra *B. cereus*, *S. aureus*, *S. enteritidis* e *E.coli*. Aguirre, Borneo e León (2013) produziram filmes a base de proteína triticales com adição de óleo essencial de orégano e os filmes apresentaram efetiva atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e menor atividade contra *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Pagno *et al.* (2016) estudaram filmes ativos elaborados com a farinha de quinoa e adição de óleos essenciais (OE) de orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) (0,5 %, 1 % e 2 % p/p). Os autores observaram 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.

Portanto a inclusão de compostos antimicrobianos e/ou antioxidantes em filmes comestíveis é uma nova alternativa para melhorar a segurança e a vida de prateleira dos alimentos (Martucci *et al.*, 2015).

3.3 Filmes de Amido de Mandioca

A produção mundial de mandioca foi de aproximadamente 260 milhões de toneladas em 2012, o que torna essa raiz uma abundante fonte de amido. A África é responsável por mais da metade da produção, a Ásia por um terço e a América Latina por 14%. O Brasil apresentou um aumento da sua produção em 25 milhões de toneladas em 2012 (Faostat, 2012).

Entre os primeiros filmes biodegradáveis e comestíveis estão os elaborados a partir do amido, por serem uma alternativa mais viável economicamente às resinas tradicionais (Chandra e Rustgi, 1998). O uso de amido como base para produção de filmes tem sido bastante estudado pois trata-se de um biopolímero de baixo custo e renovável (Bonilla *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2014) e podem contribuir para a redução do uso de fontes não renováveis,

que causam grande impacto ambiental na produção de plásticos sintéticos (Bonilla *et al.*, 2013).

Os filmes de amido de mandioca não possuem propriedades mecânicas adequadas para embalagens de alimentos por serem muito frágeis (Bergo *et al.*, 2012; De Moraes *et al.*, 2013). Para reduzir essa fragilidade, polióis como glicerol são adicionados como plastificantes (Auras *et al.*, 2009); porém os polióis também possuem a característica de serem higroscópicos, aumentando a absorção de água do ambiente pelo filme (De Moraes *et al.*, 2013). Devido a sua hidrofobicidade, os lipídeos são usados para diminuir a permeabilidade ao vapor de água (Santos *et al.*, 2014).

A utilização de amido na produção de filmes é geralmente associada à interação com outros materiais, tanto sintéticos (Chandra e Rustgi, 1998; Ratto *et al.*, 1999), quanto orgânicos, com e sem a adição de plastificantes e materiais lipídicos na tentativa de melhorar suas características mecânicas e de permeabilidade à água (Fishman *et al.*, 2000; Arvanitoyannis e Biliaderis, 1999).

3.4 Abóboras

As abóboras são provenientes da América do Sul e pertencem à família das cucurbitáceas, sendo classificadas em variedades de *Cucurbita máxima*, *Cucurbita pepo*, *Cucurbita moschata* e *Cucurbita mixta*, de acordo com sua textura e a forma de suas hastes (Shi *et al.*, 2013). São cultivadas em todo o mundo para o uso de sua polpa e sementes para a nutrição humana, seja para consumo direto ou para a preparação de outros alimentos, como xaropes, geleias, doces, purês, entre outros (Provesi *et al.*, 2011).

A abóbora é rica em carotenoides que são responsáveis pela sua coloração, que varia do amarelo ao vermelho (Oliver e Palou, 2000), possuem elevado valor nutricional e promovem a proteção da saúde, sendo que dentre as diferentes propriedades funcionais dos carotenoides na abóbora, tem sido dada maior atenção à propriedade antioxidante, sendo o β -caroteno o carotenoide principal na maioria das espécies, com concentrações superiores a 70 $\mu\text{g/g}$, mas outros carotenoides importantes também são encontrados (Finley, 2005; Ambrósio, Campos e Faro, 2006; Arruda De Almeida Siqueira e De Valencia, 2009; Padmaja, 2009; Shi *et al.*, 2013).

As variações no teor de carotenoides em abóboras podem ocorrer mesmo dentro da mesma espécie ou variedade, dependendo das condições de crescimento, estágio de maturação, ou colheita e tratamento pós-colheita (Preedy, 2015).

A abóbora híbrida “Tetsukabuto”, também denominada abóbora japonesa ou cabotiá, é resultante do cruzamento entre linhagens selecionadas de moranga (*Cucurbita Maxima Duch.*) – empregadas como genitores femininos – e linhagens de abóbora (*C. Moschata Duch. et Poir.*), empregadas como genitores masculinos (Bisognin, 2002). Uma das estratégias utilizadas para produção comercial de frutos de “Tetsukabuto” têm sido o plantio adjacente e concomitante de acessos de *C. maxima* ou *C. moschata* como polinizadores (Nascimento *et al.*, 2008).

Essa espécie híbrida foi desenvolvida no Japão em meados 1940 e foi trazida ao Brasil na década de 1960 (Bisognin, 2002). As formas híbridas “Tetsukabuto” possuem elevada importância econômica em diferentes regiões do país, com expressiva área plantada, devido a uma série de características positivas, tais como rusticidade, precocidade, uniformidade, elevado potencial produtivo, qualidade organoléptica (incluindo textura, sabor, reduzido tempo de cozimento) e prolongada conservação pós-colheita quando comparada com cultivares locais de polinização aberta (Tavares, 1999). É uma hortaliça de paladar muito agradável, de ótima aceitação comercial, especialmente pela resistência ao transporte e armazenamento (Pedrosa *et al.*, 2012).

Em estudo realizado por Murkovic, Mülleder e Neunteufl (2002) a espécie Tetsukabuto apresentou teores relevantes de α -caroteno (2,4 mg/100 g), β -caroteno (3,5 mg/100 g), luteína e zeaxantina (12 mg/100 g) e equivalente a retinol (0,78 mg).

3.4.1 Aproveitamento de Resíduos na Produção de Filmes Biodegradáveis

Evitar o desperdício de alimentos é de grande importância nos esforços para combater a fome e aumentar a renda nos países mais pobres do mundo. Essas perdas geram um impacto sobre o desenvolvimento econômico, meio ambiente e segurança alimentar (Vandermeersch *et al.*, 2014). Os alimentos são perdidos ou desperdiçados ao longo da cadeia, desde a produção agrícola inicial

até o consumo final das famílias. Estima-se que 1,3 bilhões de toneladas (um terço da produção total) da produção de alimentos destinada ao consumo humano são desperdiçadas anualmente (Gustavsson, 2011).

Sabe-se que subprodutos agroindustriais são ricos em fibras dietéticas, quantidades apreciáveis de pigmentos, compostos antioxidantes ou outras substâncias com efeitos positivos para a saúde (Oreopoulou e Tzia, 2007). O aproveitamento de subprodutos é de grande interesse para a indústria de alimentos, sendo que esses resíduos têm sido considerados como uma fonte barata de componentes de alto valor agregado. As tecnologias existentes permitem a recuperação destes para utilização como aditivos em vários produtos, já que podem possuir propriedades funcionais, tecnológicas e nutricionais com benefícios para a saúde e com redução dos riscos de contaminação na indústria e no meio ambiente e conseqüentemente redução de custos (Schieber *et al.*, 2001; Galanakis, 2012; Saavedra *et al.*, 2015).

Em geral, resíduos de processamento de frutas e legumes são os substratos mais investigados para a extração de vários tipos de antioxidantes e fibras dietéticas (Martin-Sanchez *et al.*, 2014). Pode-se citar como exemplo, fenóis e carotenoides existentes em subprodutos de frutas que podem ser aplicados como conservantes naturais em alimentos ou bebidas, uma vez que prolongam o período de vida útil do produto pela diminuição da formação de sabores desagradáveis e da rancidez (Oreopoulou e Tzia, 2007).

Muitos subprodutos originados durante o processamento de alimentos foram estudados e reconhecidos como fontes de compostos bioativos, como as de cascas de frutas cítricas, polpa de tomate, cascas de cenoura, casca e polpa de beterraba vermelha, cascas de cebola, entre outros. Alguns extratos ricos em compostos fenólicos obtidos a partir desses resíduos mostraram atividade antioxidante comparável ao dos antioxidantes sintéticos (Schieber *et al.*, 2001; Balasundram *et al.*, 2006; Galanakis, 2012).

O uso de resíduos do processamento de vegetais, possibilita a conversão de um material vegetal relativamente barato e abundante em produtos de alto valor que possam trazer benefícios para os consumidores e para indústria de alimentos (Shi *et al.*, 2013).

As Cucurbitáceas são um importante grupo de vegetais devido à sua relevância nutricional e seu uso na culinária, dentre eles tem-se a abóbora, sendo que algumas espécies possuem uma casca grossa, que compõe a maior parte dos resíduos, composto ainda por sementes que são gerados durante seu processamento. Estes podem ser utilizados para extração de óleo, transformação em outros produtos, combustível e também como matéria-prima para indústrias (Shetty et al., 2012).

Os resíduos da abóbora são ricos em substâncias que também estão presentes na polpa, como vitaminas e compostos bioativos e podem ser utilizadas para agregar valor em outros alimentos, para uso em filmes comestíveis, entre outras aplicações. Norfezah, Hardacre e Brennan (2010) avaliaram o potencial do uso de farinha obtida a partir de resíduos de abóbora da espécie *cucurbita* máxima na produção de salgadinhos extrusados e obtiveram resultados promissores para o uso desse material. Silva e Silva (2012) utilizaram cascas e sementes e farinha da semente de abóbora (*Cucurbita moschata* L.) na elaboração de bolos, sendo que do ponto de vista sensorial, a produção de bolos se mostrou viável, dessa forma a elaboração de produtos alimentícios com partes da abóbora, convencionalmente descartadas, apresentaram considerável aplicabilidade e aceitação.

Ao avaliar cascas, sementes e polpa de abóboras das espécies *Cucurbita pepo*, *C. moschata* e *C. maxima*, Kim et al. (2012) encontraram quantidades significativas de compostos antioxidantes, como o tocoferol e carotenoides. Dalla Costa et al. (2014) produziram farinha a partir de resíduos de abóbora (cascas, aparas e sementes) e avaliaram o perfil de carotenoides e atividade antioxidante da farinha produzida. Foi encontrado 60% de inibição do radical DPPH e com a análise do perfil de carotenoides foram detectados picos de luteína (2,52 mg), zeaxantina (0,57 mg), α -caroteno (0,28 mg) e, destacando-se, β -caroteno (4,81 mg), com valores expressos para 100g de farinha de abóbora.

Em trabalho realizado por Saavedra et al. (2015) foram estudados os resíduos (casca e semente) da abóbora *Cucurbita pepo* L., que demonstraram ser potenciais fontes de compostos antioxidantes e apresentando efetividade quando testados em relação à inibição do radical DPPH. Vieira (2014) utilizou o

resíduo (semente) da abóbora *C. moschata* para obtenção de óleo e posterior extração de β -caroteno, sendo que conseguiu extrair 66 μg β -caroteno/g abóbora.

3.7 Caracterização dos Filmes Biodegradáveis

Filmes biodegradáveis são utilizados em alimentos para promover proteção e aumento da sua vida de prateleira. As propriedades físicas, mecânicas, químicas e microbiológicas dos filmes têm grande influência sobre a sua funcionalidade (Sothornvit e Krochta, 2001). Portanto várias características devem ser determinadas para avaliar a melhor aplicação do filme em um alimento. As principais serão descritas a seguir.

3.7.1 Propriedades Mecânicas

As propriedades estruturais são influenciadas pela composição e processamento do filme (Hernandez-Izquierdo e Krochta, 2008). A estrutura de filmes também pode ser afetada pelo tipo de plastificante utilizado para a formação do filme (Park e Zhao, 2006).

As propriedades mecânicas de filmes biodegradáveis dependem da sua composição assim como das condições ambientais em que se encontram. Os materiais utilizados na sua fabricação devem proporcionar características adequadas, tais como elasticidade, resistência à tração e porcentagem de alongação, com o intuito de manter a integridade do produto durante o manuseio e o armazenamento (Wihodo e Moraru, 2013).

A resistência à tração expressa a máxima tração desenvolvida pelo filme e a porcentagem de alongação expressa a habilidade do filme em se estender, sendo parâmetros relevantes e bastante estudados (Gontard *et al.*, 1994). As características mecânicas de filmes podem ser melhoradas com a adição de agentes plastificantes que colaboram com o aumento da porcentagem de alongação (Sothornvit e Krochta, 2001). Usualmente, quanto maior o teor de polímero na solução filmogênica, maior é a resistência, enquanto a deformação está diretamente relacionada com o conteúdo de plastificante (Giménez *et al.*, 2013).

Independentemente do tipo de biopolímeros utilizado na produção dos filmes, variações em suas propriedades mecânicas também podem ser controladas pela composição e diversidade dos compostos químicos nos extratos de plantas utilizados (Wang *et al.*, 2012).

3.7.2 Propriedades Morfológicas

O estudo da microestrutura e da interação dos componentes do filme pode fornecer informações a respeito das possíveis relações entre suas diferentes propriedades físicas (Wan *et al.*, 2005). Defeitos como buracos pontuais e rachaduras podem destruir a capacidade barreira do filme (Debeaufort *et al.*, 1998).

Métodos como a microscopia de luz polarizada, difração de raios-X, cristalinidade e microscopia eletrônica de varredura (MEV) podem ser utilizados para analisar a microestrutura de filmes (Mali *et al.*, 2002). A técnica de MEV é amplamente utilizada, que através da geração de imagens que possibilitam a observação microscópica da superfície e da seção transversal dos filmes (Li *et al.*, 2014).

3.7.3 Propriedades Óticas

As propriedades de barreira à luz estão relacionadas à opacidade e cor do filme. A opacidade da matriz polimérica é inversamente proporcional à sua transparência e depende de sua homogeneidade. A presença de heterogeneidades estruturais nos filmes com diferentes índices de refração promove espelhamento de luz e por isso, maior opacidade (Pastor *et al.*, 2013).

A transmitância interna dos filmes é usada para medir a transparência ou opacidade. Quanto maior o valor de transmitância, mais transparente é o filme e maior a ação da luz sobre a oxidação e degradação de compostos nutricionais do alimento revestido (Silva-Weiss *et al.*, 2013). Sendo assim, a opacidade é uma propriedade importante a se considerar, já que o filme pode ser utilizado para proteger o alimento embalado da radiação UV, que pode causar degradação de pigmentos, desnaturação de enzimas, destruição de vitaminas, e até redução do valor nutricional (Falguera *et al.*, 2011). De acordo com Silva-Weiss *et al.* (2013), filmes opacos ou que contenham ingredientes que absorvam

luz no espectro UV-Visível, como compostos antioxidantes, são uma alternativa a fim de evitar essas reações.

3.7.4 Propriedades Térmicas

As principais técnicas para análises térmicas convencionais são: calorimetria diferencial, análise térmica diferencial, análise termogravimétrica (TGA), análise termomecânica, entre outras. Essas análises podem ser ou não destrutivas. Elas oferecem vantagens em relação a outras técnicas analíticas como: variabilidade quanto à aplicação de energia térmica, uso de pouca amostra, o material pode ser sólido, gel, líquido, vidro, é relativamente rápida, e a instrumentação possui um custo razoável (Crompton, 2013).

Ainda segundo Crompton (2013), a TGA baseia-se na pesagem contínua do polímero que está sob um programa de temperatura que pode variar de 0 a 1000 °C. Esta técnica fornece informações quantitativas a respeito da cinética da decomposição térmica de um material polimérico e então a estabilidade térmica pode ser avaliada. É utilizada para avaliar a influência de fatores como o efeito da cristalinidade, massa molar, degradação do polímero, entre outros.

3.7.5 Permeabilidade ao vapor de água

As propriedades de barreira estão relacionadas com a composição química e estrutura dos polímeros da matriz, com as características do produto em que o filme é aplicado e condições de armazenamento (Lacroix, 2009).

A permeabilidade ao vapor de água (PVA), é definida pela ASTM E-96-90 como a taxa de transmissão de vapor de água por unidade de área através do filme, de espessura conhecida, induzida por um gradiente de pressão entre duas superfícies específicas, de temperatura e umidade relativa especificada (International, 2002).

A propriedade de barreira ao vapor de água é um importante fator a ser considerado na seleção de filmes para recobrimento de alimentos (Jeon *et al.*, 2002), no entanto não é uma propriedade restritiva, pois se o material é muito permeável, como filmes a base de amido, estes poderão ser utilizados para embalagens de alimentos frescos, enquanto um filme com menor permeabilidade poderá ser indicado para alimentos desidratados (Amaral, 2000).

3.7.6 Espessura

Filmes baseados em biopolímeros têm suas características relacionadas a sua composição e métodos de preparação (Lafargue *et al.*, 2007). Sabe-se que as propriedades básicas dos filmes são influenciadas por sua espessura. Portanto, o controle da espessura dos filmes é necessário para avaliar a repetibilidade das suas propriedades e poder comparar diferentes formulações e métodos usados em sua produção (Guilbert *et al.*, 1997; Amaral, 2000).

Em estudo realizado por Seo *et al.* (2014) foi constatado que a espessura influencia na resistência e resistividade dos filmes. De acordo com Cuq *et al.* (1996), o aumento da espessura de filmes elaborados a partir de proteínas miofibrilares resultou em um aumento linear da força de ruptura do filme.

3.7.7 Propriedade Antioxidante

Os filmes com propriedades antimicrobiana e antioxidante, podem ser usados para melhorar a vida de prateleira de alguns produtos e a estabilidade de alimentos frescos (Gómez-Estaca *et al.*, 2014), evitando a contaminação por microrganismos e a oxidação lipídica, que são os principais fatores de degradação dos alimentos (Schmid *et al.*, 2012).

A atividade antioxidante dos filmes biodegradáveis pode ser testada usando métodos de captura de radicais, como o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), radical N-dietil-p-fenilenodiamina (DPD), poder redutor de íons ferro (FRAP), radical 2,2'-azinobis (3-etil-benzotiazolino-6-ácido sulfônico) (ABTS) (Bonilla *et al.*, 2012). Outra forma, é a aplicação do filme para embalar alimentos, como carnes, para avaliar a capacidade do filme em prevenir a oxidação lipídica. Dessa forma o filme fica em contato com o alimento e a ação antioxidante dos filmes é averiguada através de testes executados no próprio alimento, a fim de avaliar sua qualidade e vida de prateleira e se a embalagem teve efeito em proteger o alimento da oxidação. Análise como índice de peróxidos, dienos e trienos podem ser realizadas, mas em carnes a mais utilizada é a análise de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), onde ocorre a reação do malonaldeído (MDA produto da oxidação lipídica) com o ácido tiobarbitúrico (TBA).

3.7.8 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de filmes pode ser testada avaliando a zona de inibição do crescimento de bactérias usando meios sólidos inoculados com as bactérias de interesse (Aguirre, Borneo e León, 2013). Outra forma é usando meios líquidos, onde o filme é colocado nos tubos juntamente com os meios que foram preparados com inoculação de bactérias a serem avaliadas. Posteriormente são feitas diluições e plaqueadas em placas de petri, após o período de incubação, é realizada a contagem de colônias (Muriel-Galet *et al.*, 2015). Pode-se também avaliar atividade antimicrobiana dos filmes, usando-os para embalar alimentos, nesse caso, o microrganismo é inoculado e verifica-se o quanto o filme inibiu o crescimento microbiano (Zinoviadou *et al.*, 2009).

CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de: Compostos Bioativos, Química de Alimentos, Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Microbiologia de Alimentos e Equipamentos Especiais do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A análise de microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) e a análise térmica no Laboratório de Altas Pressões e Materiais Avançados (LAPMA) da UFRGS.

4.1 Materiais

Os resíduos (casca) derivados de abóbora minimamente processada (Figura 1) (*Curcubita maxima* x *Curcubita moschata* var. *Tetsukabuto*) foram fornecidos pela empresa Degasperi Atacadista (Estrela, RS/Brasil). O glicerol foi adquirido da Dinâmica (São Paulo, Brasil); óleo essencial de orégano foi comprado da empresa Mundo dos Óleos (Brasília, Brasil); lecitina de soja (Giro Verde) e o amido de mandioca (Yoki) foram adquiridos em mercado local. **Produtos químicos:** radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) foi adquirido da Sigma-Aldrich; ácido tiobarbitúrico (TBA) da Jbaker; ácido tricloroacético (TCA) da Neon; butil hidroxitolueno (BHT) da Dinâmica; 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (TEP) da Sigma-Aldrich; Metanol, éter metil-terc-butílico (MTBE) de Panreac. Antes da análise por HPLC, as amostras e os solventes foram filtrados através de membranas Millipore (0,45 μ). Outros reagentes químicos utilizados foram de grau analítico

Figura 1: Resíduo do processamento mínimo de abóbora.



4.2 Composição centesimal do resíduo (Casca)

A composição centesimal foi avaliada no resíduo *in natura*. As análises de umidade, proteína, lipídeos, fibras e cinzas foram realizadas de acordo com os métodos oficiais da AOAC (2005). O conteúdo de carboidratos da amostra foi obtido por diferença.

4.3 Extrato do resíduo de abóbora para adição aos filmes e identificação de carotenoides

O resíduo de abóbora foi higienizado com hipoclorito de sódio (10 mL/L) por 15 min logo após o recebimento, então foi triturado em um processador de alimentos (Philips Walita, RI7762 / 91, Brasil), seco a 60 °C durante 4 horas em estufa com circulação de ar (B5AFD, DeLeo, Brasil), embalado a vácuo e armazenado sob refrigeração (Figura 2). A umidade do resíduo seco foi de $8,23 \pm 0,02$ % (AOAC, 2005). Para o extrato, 5 g do resíduo seco foi triturado com 20 mL de etanol absoluto em Turrax (T25 D S1, IKA, Alemanha) durante 10 min e centrifugado a 10.000 x g em centrífuga refrigerada (Hitachi Koki Co., Ltda, CR21GIII, Japão). O sobrenadante foi utilizado como extrato para a adição às formulações. Para identificação dos carotenoides, o sobrenadante foi coletado e transferido para um balão de separação com éter de petróleo/éter etílico (2:1). A solução foi saponificada por 16 horas a temperatura ambiente com KOH metanólico, em seguida lavou-se com água destilada até que a solução atingisse pH 7. Realizou-se a concentração em rota vapor e então foi realizada a ressuspensão em éter de petróleo e secagem em nitrogênio (De Rosso e Mercadante, 2007).

Figura 2: Processo de obtenção do resíduo triturado (esquerda); resíduo seco (direita).



4.4 Extrato para identificação de carotenoides do resíduo de abóbora

Os carotenoides foram exaustivamente extraídos com 20 mL de acetona a partir de 0,5 g de resíduo seco, os extratos foram filtrados e transferidos para um balão de separação com éter de petróleo/éter etílico (2:1). A solução foi saponificada por 16 h à temperatura ambiente com KOH metanólico (10 %), em seguida lavou-se com água destilada até que a solução apresentasse pH 7, concentrou-se em rota vapor e então ressuspendeu-se em éter de petróleo e secou-se em nitrogênio (De Rosso e Mercadante, 2007).

4.4.1 Condições cromatográficas

Os carotenoides foram separados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Waters e2695, Singapura), detector DAD (Waters 2998, Singapura), unidade de desgaseificação, e válvula de injeção Rheodyne com um loop de 20 μ L. Os carotenoides foram separados em coluna C30 YMC (5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm (inside diameter)] (Waters, Wilmington, DE), usando como fase móvel um gradiente linear metanol/MTBE, iniciando em 95:5 (v/v) até 70:30 (v/v) durante 30 min, seguido de 50:50 (v/v) por 20 min, mantendo essa proporção por 15 min a 0,9 mL/min e temperatura da coluna a 29 °C. Para identificação dos carotenoides foram considerados a ordem de eluição e a área dos picos.

4.4 Preparo dos filmes

Testes preliminares foram realizados para verificar as concentrações de aditivos que poderiam ser adicionados e que resultassem em uma solução

filmogênica homogênea. Foram utilizadas diferentes concentrações (p/v) do extrato de resíduo de abóbora (0 a 6%), de óleo essencial de orégano (0 a 2%) e glicerol (0,85 a 2,55%) de acordo com o planejamento rotacional completo (Tabela 1).

Tabela 1: Planejamento rotacional completo 2³ com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais.

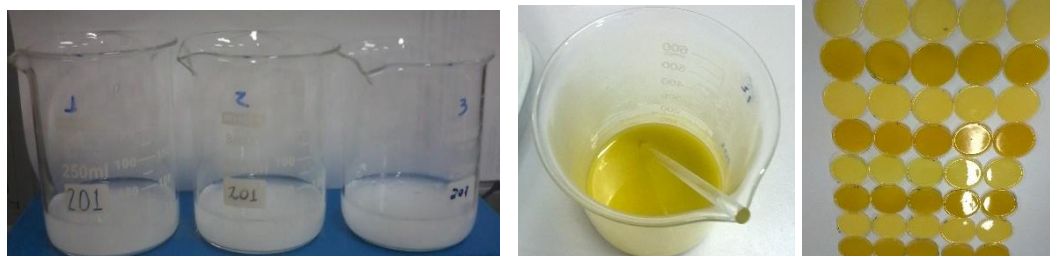
Formulação	Extrato (%)	Óleo (%)	Continua
			Glicerol (%)
1	1,2 (-1)	0,4 (-1)	1,64 (-1)
2	4,8 (1)	0,4 (-1)	1,64 (-1)
3	1,2 (-1)	1,6 (1)	1,64 (-1)
4	4,8 (1)	1,6 (1)	1,64 (-1)
5	1,2 (-1)	0,4 (-1)	1,76 (1)
6	4,8 (1)	0,4 (-1)	1,76 (1)
7	1,2 (-1)	1,6 (1)	1,76 (1)
8	4,8 (1)	1,6 (1)	1,76 (1)
9	0 (-1,68)	1 (0)	1,7 (0)
10	6 (1,68)	1 (0)	1,7 (0)
11	3 (0)	0 (-1,68)	1,7 (0)
12	3 (0)	2 (1,68)	1,7 (0)
13	3 (0)	1 (0)	0,85 (-1,68)
14	3 (0)	1 (0)	2,55 (1,68)
15	3 (0)	1 (0)	1,7 (0)
16	3 (0)	1 (0)	1,7 (0)
17	3 (0)	1 (0)	1,7 (0)
Controle (C)	0	0	1,7

Valores codificados entre parênteses

A quantidade de amido de mandioca foi mantida em 4 % (p/v). Para homogeneizar o óleo à solução filmogênica, foi adicionado a lecitina de soja na proporção de 1/3 da quantidade de óleo em cada formulação. Os filmes foram produzidos pela técnica de *casting*. A solução filmogênica foi obtida pela gelatinização do amido da seguinte forma: a água destilada, o amido e o glicerol foram misturados e aquecidos em banho-maria (Dubnoff NT 232, Piracicaba, SP. Brasil) a 80 °C por 10 min sob agitação constante. Após o resfriamento da solução até 50 °C, os aditivos foram adicionados e homogeneizados manualmente para evitar a formação de bolhas. Em seguida, a solução

filmogênica foi colocada em placas de acrílico na proporção de 0,28 g/cm² (Figura 3) e secas em estufa com circulação de ar (B5AFD, DeLeo, Brasil) a 30

Figura 3: Preparo da solução filmogênica e plaqueamento.



°C por 16 h. Depois de secos os filmes foram acondicionados em dessecador com umidade relativa de 58 % por 48 h antes das análises, exceto para propriedades antioxidantes e antimicrobianas em que os filmes foram analisados assim que ficaram prontos.

4.5 Caracterização dos filmes biodegradáveis

Os filmes foram caracterizados através das análises de umidade, espessura, solubilidade, propriedades mecânicas, permeabilidade a vapor de água, cor, opacidade, e propriedades térmicas, morfológicas, antioxidante e antibacteriana que serão descritas a seguir.

4.5.1 Umidade

O conteúdo de umidade foi determinado de acordo com a AOAC (2005). Pedacos de filmes com 2 cm de diâmetro de aproximadamente 0,1 g foram colocados em cápsulas previamente desumidificadas (estufa 105 °C/24h) e pesadas. Posteriormente, as amostras foram levadas para estufa a 105 °C até peso constante por 24 h. A umidade foi determinada através de gravimetria.

4.5.2 Espessura

A espessura foi obtida com um micrômetro digital (MDC-25, Mitutoyo Corp. Tokyo, Japão) com escala de 0-25 mm e precisão de 0,001mm (Figura 4). Foram realizadas 10 medidas de forma aleatória nos filmes e a média das medidas foi reportada como a espessura (mm).

Figura 4: Micrômetro digital usado para medir a espessura dos filmes.



4.5.3 Solubilidade

A solubilidade em água dos filmes (Figura 5) foi determinada em triplicata, de acordo com Medina Jaramillo et al. (2015) em que amostras dos filmes foram recortadas em discos de 2 cm de diâmetro e a porcentagem inicial da matéria seca de cada amostra foi determinada em estufa a 105 °C por 24 h. Após a primeira pesagem, foi adicionado aos recipientes 30 mL de água destilada, e então colocados sob agitação (mesa agitadora orbital NT 145, Piracicaba, SP. Brasil) constante por 24 h a 25 °C. Após este período, a água foi removida e os filmes foram secos novamente a 105 °C por 24 h para determinar a massa da matéria seca que não se dissolveu em água. A porcentagem de solubilidade foi obtida através da equação 1:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

Onde, m_i é o massa seca inicial e m_f é o massa seca final.

Figura 5: Análise da solubilidade dos filmes biodegradáveis.



4.5.4 Propriedades mecânicas

A resistência à tração e a porcentagem de alongação dos filmes foram determinadas de acordo com as normas da ASTM D882-09 (2009) com modificações, usando um texturômetro (TA-XT2i, Stable Micro Systems, Surrey, UK) (Figura 6). Foram recortadas 10 tiras de cada filme com 80 x 25 mm (comprimento x largura). A espessura das tiras foi medida usando um micrômetro em três pontos aleatórios. As tiras foram então colocadas entre as garras do equipamento com uma distância inicial de 50 mm e velocidade do probe de 0.8 mm s⁻¹.

Figura 6: Texturômetro usado para análise das propriedades mecânicas.



4.5.5 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada de acordo com ASTM E96 (2001) com modificações. Os filmes foram colocados sobre as cápsulas de permeabilidade contendo o sal cloreto de cálcio (0 % de umidade relativa), o conjunto foi pesado em balança analítica (AY, Shimadzu, Japão) e acondicionado em uma cuba de vidro com umidade relativa de 75% mantida por uma solução saturada de NaCl (Figura 7). A cuba foi então colocada em uma câmara com temperatura controlada de 25 °C durante 24 h. Após esse período

o conjunto foi pesado novamente. A permeabilidade ao vapor de água das amostras foi determinada em triplicata utilizando a Equação 2:

$$PVA = \frac{w \cdot L}{A \cdot t \cdot \Delta p} \quad (2)$$

onde w é a massa de água permeada através do filme (g); L é a espessura do filme (mm); A é a área de permeação (m^2); t é o tempo de permeação (h) e Δp é a diferença de pressão de vapor de água entre os dois lados do filme (kPa).

Figura 7: Cápsulas de permeabilidade com filmes (esquerda) e câmara de vidro usadas para análise de PVA dos filmes (direita).



4.5.6 Cor

A cor dos filmes foi determinada de acordo com Medina Jaramillo et al. (2015) usando um colorímetro (CR-300, Minolta Co. Ltd., Osaka, Japan), operando à luz do dia (Figura 8). Os parâmetros de cor CIE $L^*a^*b^*$ foram utilizados, onde L^* é a luminosidade, variando de 0 (preto) a 100 (branco); coordenada de cromaticidade a^* , do verde (-) ao vermelho (+); e coordenada de cromaticidade b^* , do azul (-) ao amarelo (+). Um disco branco (L_0^* : 97.5; a_0^* : 0.13 e b_0^* : 1.7) foi usado como padrão. A diferença de cor em comparação ao padrão foi dada pela Equação 3:

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

Onde: $\Delta L^* = L^* - L_0^*$, $\Delta a^* = a^* - a_0^*$, e $\Delta b^* = b^* - b_0^*$, em que L_0^* , a_0^* e b_0^* são os valores do disco branco usado como padrão e L^* , a^* e b^* são os valores de cores dos filmes.

Figura 8: Análise de cor dos filmes usando o colorímetro.



4.5.7 Opacidade

Os valores para opacidade dos filmes foram obtidos através de varredura (200 a 700 nm) usando um espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) em modo de absorbância conforme descrito por Santos et al. (2014). Pedacos de filme foram recortados (4 x 1 cm) e acondicionados em cubetas de quartzo. Cubetas vazias foram usadas como branco. A opacidade foi definida como a área abaixo da curva que foi calculada pelo método de integração trapezoidal utilizando o programa MatLab 2010 e expressa em absorbância x comprimento de onda (abs.nm).

4.5.8 Propriedade térmica

Os filmes de amido de mandioca foram submetidos a análise termogravimétrica (TGA) usando um analisador TGA-50 (Shimadzu, Japão) (Figura 9). As amostras foram aquecidas a partir da temperatura ambiente (25°C) até 800 °C a uma taxa de 20 °C.min⁻¹ em atmosfera inerte usando nitrogênio como gás de purga.

Figura 9: Equipamento usado para avaliar a estabilidade térmica dos filmes.



4.5.8 Propriedade morfológica

A morfologia da superfície dos filmes foi avaliada conforme descrito por Kampeerappun et al. (2007) com algumas modificações. As amostras foram coladas na superfície de um stub com ajuda de uma fita dupla face e metalizados com uma fina camada de ouro. As imagens foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM 6060) usando uma voltagem de 5 kV e ampliação de 500 a 1500 vezes (Figura 10).

Figura 10: Microscópio eletrônico de varredura (direita); filmes colados em stubs metalizados com ouro (meio); exemplo de imagem obtida com aumento de 1500 x da superfície de um filme.



4.5.9 Propriedade antioxidante

4.5.9.1 Atividade antioxidante (% de inibição do radical DPPH)

A atividade antioxidante dos filmes foi avaliada pela capacidade em capturar o radical DPPH baseado na metodologia descrita por Brand-Williams,

Cuvelier e Berset (1995) com adaptações. Foram pesados 0,016 g de filme e transferidos para tubos de ensaio com tampa. Em seguida 3,9 mL da solução de DPPH (0,06M) foi adicionada, os tubos foram tampados, agitados e abrigados da luz. Após 45 min de reação os tubos foram novamente agitados e foi realizada a leitura em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Japão) a 515 nm. A porcentagem de inibição do radical DPPH foi calculado usando a equação 4:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{Abs_{DPPH} - Abs_{filme}}{Abs_{DPPH}} \times 100 \quad (4)$$

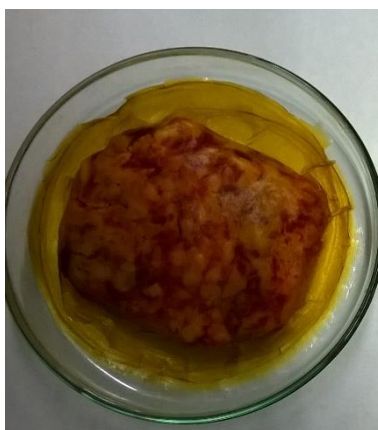
onde Abs_{DPPH} é a absorbância da solução metanólica de DPPH e Abs_{filme} é a absorbância da amostra.

4.5.9.2 TBARS

A atividade antioxidante dos filmes foi avaliada em triplicata usando o método TBARS descrito por Tarladgis, Watts e Younathan (1960) com modificações. Amostra de carne moída (25 g) foram embaladas utilizando os filmes e acondicionadas sob refrigeração (4 °C) por 9 dias (Figura 11). As análises foram realizada nos dias 0, 3, 6 e 9. No dia da análise, 5 g de carne foram trituradas em turrax com 0,5 mL de BHT (0,15 % em etanol) e 20 mL de TCA (5 % em água destilada), em seguida a mistura foi centrifugada a 10.000 x g. O sobrenadante foi filtrado, usando papel filtro, transferido para um balão de 25 mL e o volume foi completo com TCA 5 %. Para o branco foi adicionado 1 mL de BHT 0,15 % em balão volumétrico de 50 mL e o volume completo com TCA 5%. Uma alíquota de 1 mL foi retirada e transferida para tubos de ensaio com tampa, então 1 mL de TBA (0,08 M em água destilada) foi adicionado, sendo os tubos vedados e aquecidos em banho maria a 100 °C por 50 min. Em seguida foram resfriados a temperatura ambiente e realizada a leitura em espectrofotômetro a 531 nm zerado com o branco. A curva padrão foi construída a partir da solução estoque de TEP (1×10^{-3} M em água destilada). Foram transferidos 10 mL da solução estoque para um balão de 100 mL e o volume foi preenchido com TCA 5 %. A partir dessa solução foram retiradas alíquotas de 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1; 3; 5; 7; 9 e 10 mL, transferidas para balão de 50 mL e o

volume completo com TCA 5 %. Uma alíquota de 2 mL foi retirada e transferida para tubos de ensaio com tampa, então 2 mL de TBA 0,08 M foi adicionado, os tubos foram vedados e aquecidos em banho maria a 100 °C por 50 min. Em seguida foram resfriados à temperatura ambiente e realizada a leitura em espectrofotômetro a 531 nm zerado com o branco.

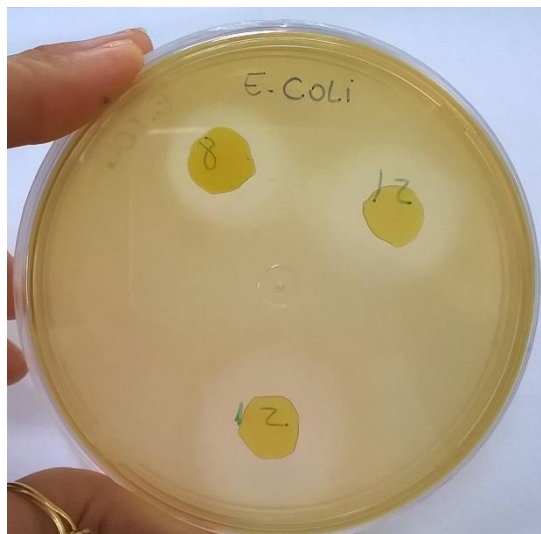
Figura 11: Filme usado para embalar carne moída para avaliar a atividade antioxidante do filme



4.5.10 Propriedade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos filmes foi avaliada pela medida do halo de inibição na multiplicação das seguintes bactérias: *Listéria monocytogens* (ATCC 15131), *Escherichia Coli* (ATCC 8739) e *Staphilococcus aureus* (ATCC1901). Placas com 10 mL de agar de cérebro e coração (BHA) solidificado foram inoculados com 200 µL de culturas bacterianas. Discos de 1 cm de diâmetro dos filmes foram colocados nas placas inoculadas com as bactérias (Figura 12). As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h em câmara de incubação apropriada. Posteriormente foi verificada a presença de "halo de inibição", sendo realizada a medida do diâmetro dos halos com um paquímetro digital. O diâmetro total do halo foi subtraído do diâmetro do disco de filme e esta diferença foi reportada como a "zona de inibição" (Seydim e Sarikus, 2006).

Figura 12: Discos de filmes apresentando halos de inibição em placa inoculada com *E. coli*.



4.6 Aplicação em carne moída

O filme que obteve os melhores resultados nas etapas anteriores (Formulação 12) foi aplicado em carne moída e verificada a sua eficiência através de análises de pH, cor e contagem de mesófilos e coliformes totais na carne armazenada durante 6 dias sob refrigeração (4 °C). A carne moída foi adquirida em mercado local e o corte utilizado foi paleta. A carne (Figura 13) apresentou $3,8 \pm 0,4$ % de lipídeos e $58,8 \pm 0,9$ % de umidade (AOAC, 2005).

Figura 13: Carne usada para aplicação do filme.



O teste foi realizado utilizando porções de 25 g de carne (em triplicata), sendo feitos os seguintes tratamentos: Controle (carne sem filme), Filme Controle (carne embalada com filme sem óleo de orégano e extrato de abóbora) e Filme Ativo (carne embalada com filme da Formulação 12) (Figura 14).

Figura 14: Carne embalada com os filmes.



O filme ativo foi produzido e avaliado novamente quanto à espessura, umidade, solubilidade, permeabilidade a vapor de água, propriedade antioxidante (DPPH) e morfológica, conforme descrito anteriormente. A carne utilizada foi caracterizada previamente em relação ao conteúdo de umidade e lipídeos de acordo com os métodos oficiais da AOAC (2005).

Em outro experimento foi realizada a inoculação de *Salmonella* Enteritidis S86 na carne e verificada a sobrevivência da mesma nas amostras de carne utilizando os tratamentos: aplicação de Filme Controle e aplicação de Filme Ativo (Formulação 12).

4.6.1 Análises de pH e cor das amostras

O pH e cor da carne foram avaliados nos dias 0, 3 e 6 para cada tratamento. Para determinação do pH, 5 gramas de carne foram pesadas e adicionado 50 mL de água destilada, após homogeneização o pH foi medido diretamente com pHmetro calibrado (AOAC, 2005). Para a análise de cor da carne, foi utilizado um colorímetro (CR-300, Minolta Co. Ltd., Osaka, Japan) seguindo a metodologia descrita no item 4.5.6.

4.6.2 Análises Microbiológicas

4.6.2.1 Contagem de Coliformes e Mesófilos

Para cada tratamento (Controle, Filme Controle e Filme Ativo) foi realizada a contagem de Coliformes e Mesófilos Totais nos dias 0, 3 e 6 de armazenamento. A análise de contagem de coliformes foi realizada pelo método descrito pela AOAC 2003.01 utilizando Petrifilm™ Enterobacteriaceae Count Plate Method (3M®) (Figura 15). Para isso, 5 g de carne foram pesadas em sacos plásticos estéreis e adicionado 45 mL de água peptonada 0,1 % e então homogeneizado. Em seguida, 1 mL foi transferido para um tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1 % para obtenção das diluições decimais. De cada diluição, 1 mL foi transferido para o Petrifilm™ que foi incubado em estufa bacteriológica a 37 ± 2 °C por 24 ± 2 h.

Figura 15: Petrifilm™ utilizado para contagem de Coliformes.



A análise de contagem de mesófilos nas amostras foi realizada pelo método descrito por APHA (2001). As diluições decimais foram obtidas como descrito anteriormente na análise de contagem de coliformes e, 1 mL de cada diluição foi inoculada pela técnica de *pour plate* em Plate Count Agar (PCA) e então incubado em estufa bacteriológica a 37 ± 2 °C por 48 ± 2 h.

4.6.2.2 Teste de sobrevivência de *Salmonella*.

Com o objetivo de verificar a atividade antimicrobiana do Filme Ativo contra *Salmonella* foi realizado um experimento inoculando previamente uma quantidade conhecida da bactéria *Salmonella* Enteritidis SE 86 na carne e avaliando a sobrevivência da mesma utilizando os tratamentos citados anteriormente (Filme Controle e Filme Ativo). A inoculação foi realizada de acordo com metodologia descrita por Delbeke et al. (2015) com modificações. Uma cepa de *Salmonella* Enteritidis SE 86, pertencente à coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos do ICTA (UFRGS) foi utilizada para o experimento. A cepa utilizada foi mantida sob armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em meio BHI adicionado de glicerol 30% até sua utilização. Para o inóculo, 100 μL do caldo de *Salmonella* foi resuspendida em 5 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid) a $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $24 \pm 2\text{ h}$. Após esse período, 1 mL do caldo BHI foi centrifugado por 5 min a $800 \times g$ utilizando uma centrífuga para microtubos (5414C; Hinz GmbH, Hamburg, Germany). Em seguida o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 1 mL de água destilada estéril. Foram realizadas diluições decimais (na proporção de 100 μL de inóculo para 900 μL de água destilada estéril) até atingir a concentração definida de 10^4 UFC/mL.

Após a obtenção do inóculo, cada amostra de carne foi inoculada utilizando 100 μL do mesmo. O teste foi realizado em triplicata para cada tratamento. As amostras de carnes foram analisadas nos dias 0, 1, 2, 3 e 6 para cada tratamento realizando a contagem de *Salmonella*. Para a análise, 10 g de carne foram pesadas em sacos plásticos estéreis contendo 90 mL de água peptonada 0,1% estéril e então homogeneizado. Em seguida, 1 mL foi transferido para tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1 % estéril para realização de diluições decimais, e então 100 μL de cada diluição foi inoculada em ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) (HiMedia) pela técnica de espalhamento. As placas foram então incubadas em estufa bacteriológica a $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $24 \pm 2\text{ h}$.

4.7. Análise estatística

A análise dos resultados do Planejamento Experimental foi feita através da metodologia de Superfície de Resposta (MSR) usando o programa Statistica 12.0 (Statsoft). A análise dos demais resultados foi feita por Análise de Variância

(ANOVA) e teste de comparação de médias Tukey ao nível de 5 % e 10 % de significância, através do programa Statistica 12.0 (Statsoft).

SEÇÃO 3: ARTIGOS CIENTÍFICOS

**ARTIGO 1: Active Biodegradable Films Developed with Cassava Starch,
Oregano Oil, and Pumpkin Residue Extract**

Submetido em: Industrial Crops and Products

Karine dos Santos Caetano ^a, Nathalie de Almeida ^a, LopesTania Maria Haas
Costa ^{a,b}, Adriano Brandelli ^a, Eliseu Rodrigues ^a, Simone Hickmann Flôres ^{a,*},
Florencia Cladera-Olivera ^a

^a Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Agronomia, 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^b Institute of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Agronomia, 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +5551 3308-9789; fax: +5551 3308-7048. E-mail address: simone.flores@ufrgs.br

Abstract

Biodegradable films with antioxidant and antimicrobial properties were developed from cassava starch with the addition of minimally processed pumpkin residue extract and oregano essential oil. The films were characterized regarding their physicochemical, mechanical, barrier, and antioxidant (DPPH and TBARS) properties. The films that had the best barrier, mechanical, and antioxidant properties were selected and further characterized for their optical, thermal, and antimicrobial properties. Oregano essential oil and glycerol contributed to increasing the elongation and reducing the tensile strength of the films. The films showed satisfactory antioxidant and antimicrobial activity *in vitro*. From these results, two formulations were selected to test the protection against oxidation in ground beef. It was observed that adding pumpkin residue extract was important to provide color and opacity to the films, but it was not effective in improving the antioxidant or antimicrobial activity when compared to adding oregano essential oil. When applied

to ground beef, the films protected the meat against lipid oxidation until the third day of storage.

Keywords: Pumpkin residue, oregano oil, cassava starch films

1. INTRODUCTION

The growing consumer demand for healthier food and the concern about environment pollution have motivated researchers to develop food packaging using biodegradable materials. Plastic is the most widely used material in the manufacture of packaging, but, due to the large environmental impact caused, new technologies have been investigated to replace non-biodegradable plastics.

Films produced from cassava starch have become more common because it is a widely available and cheap biopolymer (Gutiérrez et al., 2015; Moorthy, 2002) and, when compared to other starches, its extraction generates fewer impurities, which improves the efficiency of extraction (Auras et al., 2009). However, starch alone does not result in films with good mechanical and barriers properties (de Moraes et al., 2013); Substances such as plasticizers must be added, of which glycerol is the most commonly used (Auras et al., 2009). However, glycerol produces hygroscopic films with high permeability to water vapor. These properties can be improved by adding hydrophobic components such as lipids to the films (Santos et al., 2014).

Technologies to improve the shelf life and preservation of food characteristics are the main motivator for further research in new packaging (Martucci et al., 2015). In this way, active packaging offers conditions to improve safety and/or sensory properties and extend the shelf life of food (Vermeiren et al., 1999). Hence, substances with antioxidant and antimicrobial properties can be added to the polymer matrix to form active films (Muriel-Galet et al., 2015). Oregano essential oil is known for its antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory properties, and it is a natural alternative to food preservation (Almeida et al., 2013).

Some researchers also target the use of by-products and food waste from which to extract bioactive compounds to be added to the film or be used as base

material to produce films. Several studies show that these residues are sources of bioactive compounds with significant antioxidant activity (Galanakis, 2012; Martin-Sanchez et al., 2014; Oreopoulou and Tzia, 2007). The minimally processed-food industry generates large amounts of waste such as peels and seeds, among others. When processed, pumpkin seeds and skins are discarded, and these residues are sources of bioactive compounds such as carotenoids and phenolic compounds with relevant antioxidant activity. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of oregano essential oil and pumpkin residue extract on antioxidant, antimicrobial, physicochemical, barrier, mechanical, optical, structural, and thermal properties of biodegradable starch films.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Pumpkin residues (skin) derived from minimally processed crossbred *C. maxima* and *C. moschata* var. Tetsuka Buto were provided by Degasperi Atacadista (Rio Grande do Sul, Brazil); glycerol was purchased from Dinâmica (São Paulo, Brazil); oregano essential oil was purchased from Mundo dos Óleos (Brasília, Brazil); soy lecithin (Giro Verde) and cassava starch (Yoki) were purchased at a local market.

Chemicals: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) was purchased from Sigma-Aldrich; thiobarbituric acid (TBA) from JT Baker; trichloroacetic acid (TCA) from Neon; butyl hydroxyl toluene (BHT) from Dinâmica; 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) from Sigma-Aldrich; HPLC-grade methanol and methyl tert-butyl ether (MTBE) from Panreac.

2.2 Proximate Composition

Moisture, protein, lipids, fiber, and ash contents were analyzed according to the official methods of the AOAC (2005). The carbohydrate content of the samples was obtained by difference.

2.3 Pumpkin Residue Extract for Addition to Films and Carotenoid Identification

Pumpkin residues were ground in a food processor (Philips Walita, RI7762/91, Brazil), dried at 60 °C for 4 h in an oven with air circulation (model B5AFD, DeLeo, Brazil), vacuum-packed, and stored under refrigeration protected from light. The moisture content of the dry residue was $8.23 \pm 0.02\%$ (AOAC, 2005). To obtain the extract, 5 g of the dry residue with 20 mL ethanol were triturated in a Turrax dispersing instrument (model T 25 D S1, IKA, Germany) for 10 min and centrifuged at 10,000 g (CR21GIII, Hitachi Koki Co., Japan) for 10 min at 15 °C. The supernatant was collected and used immediately in the films. For carotenoid identification, the supernatant was collected and transferred to petroleum ether/ethyl ether (2:1). The next steps are described in item 2.4.

2.4 Extract for Carotenoid Identification in Pumpkin Residue

The carotenoids were exhaustively extracted with 20 mL of acetone from 0.5 g of dry residue and transferred to petroleum ether/diethyl ether (2:1). The solution was saponified overnight (~16 h) at room temperature with 10% (w/v) methanolic KOH. After that, the mixture was washed until alkali free and the solvent was evaporated in a rotary evaporator ($T < 30$ °C). The carotenoid extract was dissolved in petroleum ether. To determine the carotenoid composition, an aliquot of the stock solution was evaporated under N_2 flow, dissolved in a MeOH/MTBE mixture (70:30 (v/v)), and analyzed by HPLC–DAD (de Rosso and Mercadante, 2007).

2.4.1 Chromatographic Conditions

Carotenoids were determined by HPLC (Waters e2695, Singapore), a DAD detector (Waters e2998, Singapore), a degasser unit, and a Rheodyne injection valve with a 20 μ L loop. The carotenoids were separated in a C30 YMC column (5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm (internal diameter)) (Waters, Wilmington, DE) using as the mobile phase a linear gradient of a methanol/MTBE mixture from 95:5 (v/v) to 70:30

(v/v) over 30 min, followed by a 50:50 (v/v) ratio for 20 min, and maintaining this proportion for 15 min at 0.9 mL/min and with the column temperature set to 29 °C. The carotenoids were identified considering the combination of the following parameters: elution order in the C30 column and UV-vis spectral features (maximal absorption wavelength (λ_{max}), spectral fine structure, and peak area).

2.4 Film Preparation

Preliminary experiments were conducted based on the literature to evaluate the concentrations of additives that could be incorporated into the films. The choice of oregano essential oil was based on a previous study by Pagno et al. (2016). Different concentrations (w/v) of the pumpkin residue extract (PRE) (0 to 6%), oregano essential oil (OEO) (0 to 2%), and glycerol (GY) (0.85 to 2.55%) were used according to a central composite rotational experimental design. Cassava starch concentration was kept at 4% (w/v). Soy lecithin was used to mix the oil with the filmogenic solution at a proportion of one third of the amount of oil added to each formulation. The films were produced by the casting technique. First, starch, glycerol, and distilled water were heated to 80 °C in a water bath (Dubnoff NT 232, Piracicaba, SP, Brazil) with constant stirring for 10 min. When the temperature cooled down to 50 °C, the additives were added according to the experimental design as shown in Table 2 and manually homogenized to avoid bubble formation. The filmogenic solution was placed in acrylic plates at 0.28 g/cm². The cast film was dried for about 16 h at 30 °C. Finally, the films were conditioned in a desiccator with relative humidity of 58% for 48 h before analysis.

2.5 Film Characterization

2.5.1 Film Thickness Measurement

The thickness of the films was measured according to Versino and Gracia (2014) using a digital micrometer (model MDC-25, Mitutoyo Corp. Tokyo, Japan).

Ten measurements were randomly carried out in different parts of the film and the average values were reported.

2.5.2 Moisture Content

Moisture content was determined using the official methods of the AOAC (2005). Pieces of films of aprox 0.1 g were dried in an oven at 105 °C for 24 h, and then weighed on an analytical balance (AY 220, Shimadzu).

2.5.3 Water Solubility

Water solubility values were obtained following the method described by Jaramillo et al. (2015). Solubility was determined as:

$$\text{Solubility (\%)} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

where, m_i is the initial dry weight and m_f is the final dry weight. Initial dry weight values were determined by placing disks 2 cm in diameter in an oven at 105 °C for 24 h. Then, the disks were immersed in 30 mL of distilled water for 24 h at 25 °C under constant stirring. The water was discarded and films were dried at 105 °C for 24 h to obtain the final dry weight values.

2.5.4 Mechanical Properties

Tensile strength (MPa) and percent elongation at break (%) were measured using a texture analyzer (TA-XT2i, Stable Micro Systems, Surrey, UK) operating in accordance with ASTM D882-09 (2009). Ten film strips were cut (80 mm long and 25 mm wide). The thickness of the strips was measured using a micrometer at three random sites along each strip and each one was placed between the grips of the equipment, with the initial distance between the grips set to 50 mm and test speed, to 0.8 mm s⁻¹.

2.5.5 Water Vapor Permeability

Water Vapor Permeability (WVP) was determined according to ASTM E 96 (2001). The preconditioned film (58% relative humidity, 25 °C for 48 h) was placed on the circular permeability capsule with silicone grease to ensure that the humidity migration occurred only through the film. Anhydrous calcium salt (CaCl₂, 0% relative humidity) was added to the capsule and the system was placed in a desiccator containing a saturated sodium chloride solution (NaCl, 75% relative humidity). The desiccator containing the capsules was placed in a chamber at 25 °C for 24 h. The capsules were weighed at time 0 and after 24 h on an analytical balance (AY 220, Shimadzu). The water vapor permeability of the samples was determined in triplicate using Equation 2:

$$WVP = \frac{w \cdot L}{A \cdot t \cdot \Delta p} \quad (2)$$

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

2.5.6 Color

The color measurements of the films were taken at six random sites on their surface using a colorimeter (CR-300, Minolta Co. Ltd., Osaka, Japan) according to Jaramillo et al. (2015). The results were expressed in the CIELab scale, where L denotes lightness (L : 0 = black and 100 = white) and a^* and b^* denote chromaticity: $-a^*$ (greenness) to $+a^*$ (redness) and $-b^*$ (blueness) to $+b^*$ (yellowness). A white disc (L_0^* : 97.5; a_0^* : 0.13, b_0^* : 1.7) was used as standard. The color difference was compared to the standard by means of Equation 3:

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

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

2.5.7 Opacity

The opacity of cassava starch film was obtained on a UV spectrophotometer (Shimadzu UV-1800) with absorbance set at 200 to 700 nm. Films were cut into rectangular pieces and directly placed onto a spectrophotometer test cell. An empty test cell was used as reference. The opacity was defined as the area under the curve obtained calculated by trapezoidal integration and expressed in absorbance units (Abs) x wavelength (nm) (Santos et al., 2014).

2.5.8 Thermal Properties

The cassava starch film samples underwent thermogravimetric analysis (TGA) using a Shimadzu device (TGA-50, Brazil). The samples were heated from room temperature to 800 °C at a rate of 20 °C min⁻¹ using nitrogen atmosphere.

2.5.9 Film Morphology

Film surface morphology was analyzed using scanning electron microscopy (SEM) according to Kampeerapappun et al. (2007) with some modifications. The samples were placed onto a stub with double-sided adhesive tape and coated with a thin layer of gold. Images were taken with a scanning electron microscope (model Jeol JSM 6060) using accelerating voltage of 5 kV and magnification of 500 to 1,500 times the original specimen size.

2.5.10 Antioxidant Properties

2.5.10.1 DPPH Assay

The capacity of the films to capture the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was evaluated according to Brand-Williams et al. (1995) with adaptations. Film samples of 0.016 g were weighed in test tubes with screw-on caps and added to 3.9 mL of methanolic DPPH solution (0.06 M). After 45 min reacting in the dark at 23 °C, the absorbance at 515 nm was measured in a spectrophotometer (model UV-

1800, Shimadzu, Japan) using glass cuvettes. The percentage of DPPH radical-scavenging activity was calculated using Equation 4:

$$\text{DPPH Scavenging Activity (\%)} = \frac{Abs_{DPPH} - Abs_{film}}{Abs_{DPPH}} \times 100 \quad (4)$$

where Abs_{DPPH} is the absorbance of the methanolic solution of DPPH and Abs_{film} is the absorbance of the sample.

2.5.10.2 TBARS Assay

The antioxidant activity of the active packaging film was determined by 2-thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) analysis according to Tarladgis et al. (1960) with modifications. 30 g of ground beef were packaged using the film and placed in a refrigerator (4 °C) for nine days and the analysis was performed on days 0, 3, 6, and 9.

2.5.11 Antimicrobial Properties

The antimicrobial activity of the films was evaluated by examining the growth inhibition of *Listeria monocytogenes* (ATCC 15131), *Escherichia coli* (ATCC 8739), and *Staphylococcus aureus* (ATCC1901). Ten mL of molten brain-heart infusion (BHI) agar were inoculated with 200 µL of each bacterial culture, containing about 10^6 CFU/ml.. Film discs of 10 mm diameter were placed onto the plates. After incubation for 24 h at 37 °C, the plates were examined for zones of inhibition, which were measured with digital calipers. The diameter of the whole zone was measured, subtracted from the film disc diameter, and this difference in diameter was reported as the zone of inhibition (Seydim and Sarikus, 2006).

2.6 Statistical Analysis

A 2^3 central composite rotational experimental design with three repetitions of center points and six axial points for a total of 17 experiments was employed to evaluate the influence of different antioxidant concentrations, antimicrobial additive, and plasticizer incorporated into the starch-cassava-based films. Pumpkin residue extract (0 to 6%), oregano oil (0 to 2%), and glycerol (0.85 to 2.55%) were chosen

as independent variables. The antioxidant activity, physical, optical, barrier, and mechanical properties of the films were used as dependent variables. The data was analyzed by response surface methodology using the software Statistica 12.0 (StatSoft, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Characterization of the Pumpkin Residue and PRE

3.1.1 Proximate Composition of the Pumpkin Residue

The proximate composition of pumpkin residue is shown in Table 2. The contents of fiber (27.8 g/100 g dry basis), protein (19.2 g/100 g dry basis), and carbohydrates (43.3 g/100 g dry basis) were the most relevant, which shows this residue has the potential to be reused. A study by Kim et al. (2012) evaluated the proximate composition of pumpkin parts (skin, seed, and flesh) of the species *Cucurbita pepo*, *C. moschata*, and *C. maxima*. For *C. moschata* skin, a similar fiber content has been reported compared to the pumpkin residue of this study (26.8 g/100 g dry basis). The skin of *C. maxima* had the closest contents of ash and lipids (4.6 and 3.6 g/100 g dry weight basis, respectively) to that found in this study. For all species evaluated (*C. pepo*, *C. moschata*, and *C. maxima*), the protein content in the skin was lower than that found in this study (Tetsukabuto) (14.1, 8.8, and 6.8 g/100 g dry weight basis, respectively). It is known that variations in the chemical composition are affected by factors such as species, planting time, and soil quality, among others.

Table 1: Proximate composition of pumpkin residue

Nutrients	g/100g (dry basis)
Moisture	79.9±0.0
Carbohydrate	43.3±0.8
Fiber	27.8±2.2
Protein	19.2±0.3
Ash	5.8±0.3
Fat	2.9±0.1

Values are given as mean±standard deviation

3.1.2 Carotenoids in Pumpkin Residue and PRE

The carotenoids in pumpkin residue and extract (obtained from the residue) were identified as *cis*-violaxanthin, all-*trans*-luteoxanthin, 13-*cis*-lutein, 13'-*cis*-lutein, all-*trans*-lutein, all-*trans*-zeaxanthin, 15-*cis*- β -carotene, all-*trans*- α -carotene, 13-*cis*- β -carotene, all-*trans*- β -carotene, and 9-*cis*- β -carotene. 13-*cis*- β -carotene was observed only in the residue extract.

Murkovic et al. (2002) evaluated pumpkin flesh of the Tetsukabuto variety and found β -carotene, α -carotene, lutein, and zeaxanthin. A study by Kim et al. (2012) reported the carotenoids β -carotene and β -cryptoxanthin in pumpkin skin of *Cucurbita pepo*, *C. moschata*, and *C. maxima*. The isomers 13-*cis*- β -carotene and 9-*cis*- β -carotene have also been identified in two raw landrace pumpkin samples (*Cucurbita moschata*) evaluated by Carvalho et al. (2012). When evaluating the species *C. moschata* 'Menina Brasileira' and *C. maxima* 'Exposição', Provesi et al. (2011) found the carotenoids violaxanthin, lutein, α -carotene, all-*trans*- β -carotene, *cis*- β -carotene, zeaxanthin, and α -cryptoxanthin, the same ones found in this study.

3.2 Film Characterization

The results of thickness (T), moisture content (MC), DPPH scavenging activity (SA), tensile strength (TS), percent elongation at break (EB), and water vapor permeability (WVP) are presented in Table 2. In addition, the results of color (C) and opacity (O) are shown in Table 3.

Table 4 presents the regression coefficients and analysis of variance (ANOVA) for DPPH radical scavenging capacity, percent elongation at break, color, and opacity. ANOVA at 95% significance level of the measured values of thickness, moisture content, water vapor permeability, and tensile strength yielded R^2 values lower than 0.80, which means that, for the range studied, the model not was able to explain the quadratic behavior of the data.

Table 2: 2³ central composite rotational experimental design with repetitions of center points and responses for the following independent variables: thickness (T), moisture content (MC), DPPH scavenging activity (SA), tensile strength (TS), percent elongation at break (EB), and water vapor permeability (WVP)

Films	PRE (%)	OEO (%)	GY (%)	T (mm)	MC (%)	SA (%)	TS (MPa)	EB (%)	WVP*
F1	1.2 (-1)	0.4 (-1)	1.64 (-1)	0.126±0.005 ^h	27.37±0.36 ^b	21.3±1.1 ^{gh}	0.70±0.0 ^c	172.0±11.5 ^{ghi}	0.49±0.03 ^{defg}
F2	4.8 (1)	0.4 (-1)	1.64 (-1)	0.139±0.003 ^{fg}	27.50±0.25 ^b	29.5±0.4 ^f	0.66±0.01 ^{cd}	158.2±11.7 ^{gh}	0.65±0.04 ^{ab}
F3	1.2 (-1)	1.6 (1)	1.64 (-1)	0.185±0.009 ^{ab}	29.33±1.09 ^b	50.0±0.1 ^c	0.40±0.01 ^{fg}	114.0±8.0 ^j	0.50±0.00 ^{def}
F4	4.8 (1)	1.6 (1)	1.64 (-1)	0.152±0.009 ^{ef}	22.97±0.14 ^c	57.3±0.1 ^{ab}	0.50±0.03 ^{ef}	147.3±5.4 ⁱ	0.61±0.04 ^{abc}
F5	1.2 (-1)	0.4 (-1)	1.76 (1)	0.133±0.009 ^{gh}	28.78±0.84 ^b	29.5±0.8 ^f	0.60±0.02 ^{cde}	247.3±17.6 ^{abc}	0.66±0.02 ^a
F6	4.8 (1)	0.4 (-1)	1.76 (1)	0.143±0.010 ^{fg}	28.16±0.19 ^b	31.3±0.1 ^{ef}	0.63±0.03 ^{cd}	219.3±13.0 ^{ce}	0.43±0.03 ^{fgh}
F7	1.2 (-1)	1.6 (1)	1.76 (1)	0.152±0.010 ^{ef}	23.05±0.30 ^c	55.7±0.1 ^b	0.58±0.04 ^{de}	161.7±13.1 ^{gh}	0.62±0.01 ^{abc}
F8	4.8 (1)	1.6 (1)	1.76 (1)	0.164±0.007 ^{de}	23.72±0.61 ^c	55.9±1.4 ^b	0.60±0.04 ^d	188.6±12.7 ^{df}	0.41±0.01 ^{gh}
F9	0 (-1.68)	1 (0)	1.7 (0)	0.177±0.006 ^{bcd}	26.91±0.98 ^b	46.0±1.2 ^{cd}	0.38±0.00 ^{fg}	172.5±10.7 ^{fghi}	0.58±0.04 ^{abcd}
F10	6 (1.68)	1 (0)	1.7 (0)	0.181±0.006 ^{abc}	28.15±0.36 ^b	48.5±0.7 ^c	0.32±0.00 ^g	138.5±10.5 ^{ij}	0.53±0.00 ^{cde}
F11	3 (0)	0 (-1.68)	1.7 (0)	0.124±0.007 ^h	23.24±1.10 ^b	17.9±0.6 ^{gh}	1.02±0.06 ^b	258.8± 5.2 ^a	0.55±0.03 ^{bcde}
F12	3 (0)	2 (1.68)	1.7 (0)	0.193±0.007 ^a	22.48± 1.78 ^c	60.5±2.1 ^a	0.39±0.02 ^{fg}	143.7±11.8 ^{ij}	0.48±0.00 ^{efg}
F13	3 (0)	1 (0)	0.85 (-1.68)	0.131±0.007 ^{gh}	12.67±0.29 ^d	35.2±0.2 ^{ef}	1.08±0.05 ^b	183.8± 10.8 ^{fgh}	0.36±0.02 ^h
F14	3 (0)	1 (0)	2.55 (1.68)	0.170±0.004 ^{cd}	36.16±0.68 ^a	43.4±1.0 ^d	0.32±0.01 ^g	184.4±8.5 ^{dfgh}	0.61±0.06 ^{abc}
F15	3 (0)	1 (0)	1.7 (0)	0.155±0.007 ^{ef}	27.91±0.18 ^b	42.3±1.3 ^d	0.37±0.02 ^g	236.6± 16.5 ^{ab}	0.56±0.01 ^{abcde}
F16	3 (0)	1 (0)	1.7 (0)	0.154±0.009 ^{ef}	26.74±0.28 ^b	42.2±3.7 ^d	0.41±0.02 ^{fg}	222.0±3.6 ^{bcde}	0.55±0.01 ^{def}
F17	3 (0)	1 (0)	1.7 (0)	0.151± 0.010 ^{ef}	28.80±0.74 ^b	42.8±1.0 ^d	0.39±0.02 ^{fg}	222.5±14.5 ^{def}	0.50±0.01 ^{cdef}
Control (FC)	0	0	1.7	0.122± 0.005 ^h	27.59±1.04 ^b	13.6±0.4 ^h	1.74±0.01 ^a	136.8±0.2 ^{ij}	0.43±0.01 ^{fgh}

Encoded values in parenthesis. Values are given as mean±standard deviation. Different letters in the same column indicate significant difference ($p \leq 0.05$) when analyzed by Tukey's test. WVP* ($\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kpa}^{-1}$)

Table 3: 2³ central composite rotational experimental design with repetitions of center points and responses for the following independent variables: CIE parameters (L, a*, b*), color (C), and opacity (OP)

Films	CIE parameters							
	PRE (%)	OEO (%)	GY (%)	L	a*	b*	C (ΔE)	OP (Abs.nm)
F1	1.2 (-1)	0.4 (-1)	1.64 (-1)	83.23±0.36 ^b	-4.74±0.14 ^{cd}	25.33±1.05 ^h	28.06±0.54 ^h	305.9±9.5 ^j
F2	4.8 (1)	0.4 (-1)	1.64 (-1)	76.21±0.23 ^{gh}	-4.93±0.33 ^{cd}	76.41±1.46 ^{ab}	77.85±1.41 ^{abc}	459.5±20.0 ^{cd}
F3	1.2 (-1)	1.6 (1)	1.64 (-1)	82.90±1.03 ^{bc}	-6.04±0.23 ^{de}	44.64±3.65 ^f	48.81±1.72 ^f	538.5±1.6 ^a
F4	4.8 (1)	1.6 (1)	1.64 (-1)	74.65±1.43 ^{gh}	-4.71±1.08 ^c	73.96±1.56 ^{abc}	76.41±1.71 ^{bv}	502.2±6.1 ^{ab}
F5	1.2 (-1)	0.4 (-1)	1.76 (1)	81.12±0.77 ^{cde}	-6.04±0.32 ^{de}	32.35±1.98 ^g	35.83±1.69 ^g	318.2±6.4 ^{ij}
F6	4.8 (1)	0.4 (-1)	1.76 (1)	76.52±0.68 ^g	-5.54±0.74 ^{cde}	73.22±4.61 ^{bc}	76.51±1.54 ^c	387.7±1.6 ^{fg}
F7	1.2 (-1)	1.6 (1)	1.76 (1)	80.85±1.12 ^{cde}	-5.69±0.37 ^{cde}	32.48±2.73 ^f	36.66±1.33 ^g	427.8±11.1 ^{de}
F8	4.8 (1)	1.6 (1)	1.76 (1)	75.85±0.54 ^{gh}	-5.4±0.55 ^{cde}	69.38±5.68 ^{cd}	72.29±1.56 ^d	481.8±1.5 ^{bc}
F9	0 (-1.68)	1 (0)	1.7 (0)	89.36±0.38 ^a	-0.30±0.12 ^{cde}	8.24±0.86 ^j	8.24±0.20 ^j	353.5±12.8 ^{gh}
F10	6 (-1.68)	1 (0)	1.7 (0)	74.25±2.43 ^h	-1.51±1.79 ^{ab}	79.37±0.94 ^a	80.64±1.29 ^a	515.7±14.0 ^{ab}
F11	3 (0)	0 (-1.68)	1.7 (0)	80.66±0.72 ^{def}	-6.42±0.67 ^b	76.25±5.34 ^{ab}	79.96±2.13 ^{ab}	306.2±5.5 ^j
F12	3 (0)	2 (1.68)	1.7 (0)	78.79±1.21 ^f	-4.34±0.67 ^{cd}	56.27±4.25 ^{de}	69.53±1.78 ^d	461.3±1.5 ^{cd}
F13	3 (0)	1 (0)	0.85 (-1.68)	81.84±1.09 ^{bcd}	-6.5±0.17 ^e	62.27±2.35 ^e	64.05±1.10 ^e	482.3±17.2 ^{bc}
F14	3 (0)	1 (0)	2.55 (1.68)	79.31±0.42 ^{ef}	-5.65±0.24 ^{cde}	63.46±1.26 ^e	65.29±0.81 ^e	388.4±6.8 ^{fg}
F15	3 (0)	1 (0)	1.7 (0)	78.91±1.05 ^{def}	-5.68±0.31 ^{cde}	63.45±2.61 ^{de}	62.98±1.77 ^e	414.8±7.7 ^{ef}
F16	3 (0)	1 (0)	1.7 (0)	79.82±0.69 ^{def}	-5.54±0.33 ^{cde}	61.72±3.06 ^e	63.03±0.40 ^e	332.9±13.0 ^{hij}
F17	3 (0)	1 (0)	1.7 (0)	80.37±0.73 ^{def}	-5.80±0.41 ^{cde}	62.74±3.40 ^e	62.91±0.39 ^e	345.1±4.2 ^{hi}
Control (FC)	0	0	1.7	88.23±0.28 ^a	1.02±0.03 ^a	64.17±0.10 ⁱ	10.38±0.23 ⁱ	197.1±1.4 ^k

Encoded values in parenthesis. L*: luminosity; a*: red-green; b*: yellow-blue; and C (ΔE): color difference. Values are given as mean±standard deviation. Different letters in the same column indicate significant difference ($p \leq 0.05$) when analyzed by Tukey's test.

Table 4: Regression coefficients and analysis of variance (ANOVA) for DPPH radical scavenging capacity (SA), percent elongation at break (EB), color (C), and opacity (OP)

		κ	E	E²	O	O²	G	G²	I₁	I₂	I₃	F_c	F_t	R²
SA	Cf	42.39	1.58	1.60	13.11	-1.27	2.07	-1.23	-0.32	-1.67	-0.68	169.79	3.68	0.99
	p	0.00	0.00	<0.05	0.00	0.01	0.00	0.01	0.51	0.01	0.18			
EB	Cf	227.15	-2.84	-25.65	-27.75	-9.43	16.59	-15.50	12.75	-2.58	-5.93	5.14	3.68	0.87
	p	0.00	0.66	0.01	0.00	0.21	0.03	0.06	0.16	0.76	0.48			
C	Cf	63.28	20.18	-7.60	-0.12	3.14	-0.57	-0.43	-3.40	-0.13	-2.84	24.08	3.68	0.97
	p	0.00	0.00	0.00	0.94	0.10	0.72	0.80	0.13	0.95	0.19			
OP	Cf	363.84	37.62	26.36	54.21	8.33	-25.52	26.62	-25.68	0.78	-8.94	7.01	3.68	0.9
	p	0.00	0.01	<0.05	0.01	0.5	0.04	<0.05	0.09	0.95	0.51			

Cf: regression coefficient; p: p value; κ: constant; E: pumpkin residue extract (linear); E²: pumpkin residue extract (quadratic); O: oregano essential oil (linear); O²: oregano essential oil (quadratic); G: glycerol (linear); G²: glycerol (quadratic); I₁: interaction between pumpkin residue extract and oregano essential oil; I₂: interaction between pumpkin residue extract and glycerol; I₃: interaction between oregano essential oil and glycerol; F_c: F calculated; F_t: F tabulated; R²: coefficient of determination.

3.2.1 Film Thickness Measurement

In terms of films thickness (Table 3), only the variable oil was significant (Supplementary Figure 1a), which shows that the thickness increased from 0.124 to 0.193 mm when the amount of oil increased from 0 to 2%, respectively. In relation to FC, F11 thickness (0% OEO) showed an increase by 1.64%, whereas in F12 (2% OEO) it increased by 58.20%. Hosseini et al.(2016) also noted the thickness of active nanocomposite films (fish gelatin/chitosan nanoparticles) was strongly dependent on the amount of essential oil added. Jouki et al. (2014) found a similar result for quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil and attributed the increased film thickness to the protrusions in the film structure caused by the various chemical components present in OEO.

3.2.2 Moisture Content

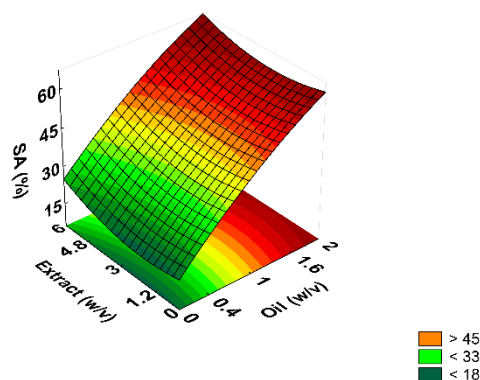
None of the variables in the tested ranges significantly influenced film moisture (Supplementary Figure 1b). However, when checking moisture values in Table 3, it can be observed that formulations with higher concentrations of glycerol exhibited higher moisture values. Jaramillo et al. (2015) obtained similar moisture values in films based on cassava starch. Gutiérrez et al. (2015) found high moisture values for films based on native and phosphated cush-cush yam and cassava starches plasticized with glycerol, which may be justified by the fact that glycerol strongly interacts with cassava starch and probably forms hydrogen-type bonds between amylose and glycerol. This interaction results in decreased intra and intermolecular interactions between starch macromolecules, thus the movement and rearrangement of its chains is increased, which facilitates water absorption.

3.2.3 DPPH Scavenging Activity

The films exhibit DPPH radical inhibition percentage ranging from 17.91 to 60.49%. The effects of OEO and PRE can be observed in Figure 1. It may be noted that the addition of oil was primarily responsible for the largest radical inhibition percentage, which proves that increasing oil concentration promoted higher film antioxidant activity (Supplementary Figure 1c). PRE addition contributed less effectively to antioxidant activity and this can be observed when

comparing formulation F11 (17.91% inhibition) without addition of OEO and formulation F12 (60.49% inhibition) with addition of 2% of OEO, both containing 3% of PRE. Similar antioxidant properties were reported for chitosan-based films incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract (Moradi et al., 2012). Noronha et al. (2014) also reported DPPH radical inhibition percentage similar to this study for methylcellulose film incorporated with alpha-tocopherol nanocapsules.

Figure 1: Response surface for DPPH scavenging activity (SA %) as a function of pumpkin extract and oregano essential oil.



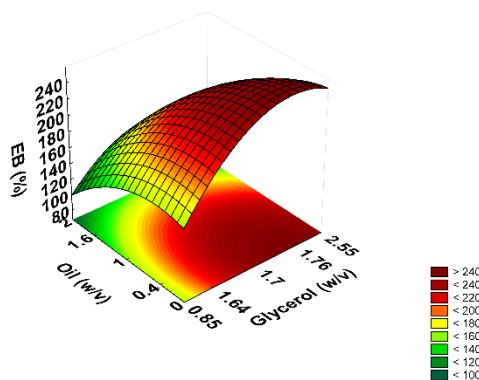
3.2.4 Mechanical Properties

The films' tensile strength (TS) ranged from 0.32 to 1.07 MPa. Similar TS results were reported by Bangyekan et al. (2006) and Chiumarelli and Hubinger (2014) for cassava starch films (0.36 to 4.28 MPa; 0.21 to 1.07 MPa, respectively). The films' elongation at a break (EB) ranged from 114.04 to 258.84% and the response surface is presented in Figure 2. Elongation at break indicates the films' flexibility and elongation capacity. Adding OEO to the films negatively impacted the TS of the films when compared to the result of the control film. Only F11 and F13 had similar TS values when compared to FC. The lowest glycerol concentration in F13 contributed to higher TS values since glycerol causes changes in the starch structure, making it more fragile. F11, in turn, does not contain OEO. Pelissari et al. (2009) reported in their study that the oregano oil added to films based on cassava starch-chitosan caused a reduction in the films' tensile strength and a significant increase in elongation, probably due to the plasticizer action the oil exerts. Aliheidari et al. (2013) and Matsakidou et al. (2013) also reported that the addition of lipids increased the films' elongation in casein-based film incorporated with *Matricaria recutita* essential oil and

composite sodium caseinate edible films incorporating naturally emulsified oil bodies respectively.

In a study by Parra et al. (2004), cassava starch films produced with more than 1 g of glycerol per 100 mL of filmogenic solution resulted in low tensile strength. High concentrations of glycerol reduces tensile strength, but increases elasticity (elongation) due to changes in the starch structure, since the matrix becomes less dense and, when stress is applied, the movement of the polymer chains is facilitated (Al-Hassan and Norziah, 2012; Chiumarelli and Hubinger, 2014). These changes are due to the interactions between adjacent starch chains in the film matrix (Mali et al., 2005).

Figure 2: Response surface for percentage elongation at break (EB %) as a function of oregano essential oil and glycerol.



3.3.5 Water Vapor Permeability

The water vapor permeability (WVP) results are presented in Table 2 and ranged from 0.36 to 0.66 g.mm.m⁻².h⁻¹.kPa⁻¹. It can be observed that the film with the lowest glycerol concentration (F13) had low WVP value. A similar result was found for film formulation F12, whose composition had the highest concentration of oil, which contributed to keeping the low WVP value even in this film with high glycerol content. Overall, the increase in glycerol led to higher WVP values and these results are in agreement with Bangyekan et al. (2006) and Alves et al. (2007).

According to Bangyekan et al. (2006), the role of glycerol is to reduce the density of polymers used in film production, thereby increasing the films' WVP. It is common to measure high WVP values in films in which the plasticizer is a highly hygroscopic compound such as glycerol. The addition of oils to the filmogenic matrix reduces water absorption by the films since these substances are complex

mixtures and highly hydrophobic. Thus, WVP will decrease with higher hydrophobic fraction added to the film. As water vapor transference occurs through the hydrophilic portion of the film, WVP depends on the hydrophilic:hydrophobic ratio of the film constituents (Rojas-Grau et al., 2006).

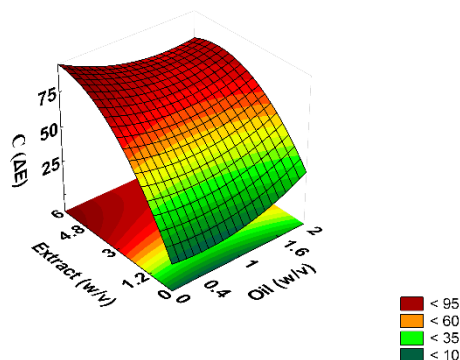
In general, incorporating OEO into films leads to a decrease in WVP values. A study by Benavides et al. (2012) reported a significant decrease in WVP only after the incorporation of 1% of OEO. Similar behavior can be observed in the results presented in this study, where only the films with more than 1% oil had lower WVP values. This behavior may be due to the porous microstructure produced by the internal cross-linking process and the addition of OEO to the films (Benavides et al., 2012).

3.3.6 Color

Table 3 shows the most relevant parameters of color in the films studied. All films have high values of L^* (Table 3), which indicates films with high luminosity.

The values for the parameter b^* varied with the addition of PRE and indicated yellowish films. This can be seen when comparing films F10 (6% PRE) with F9 (0% PRE), which shows an 89.6% increase in b^* value in the former compared to the latter. The values for parameter a^* did not vary widely, however, the values obtained indicate tendency to greenish film, which can be justified by the presence of chlorophyll in the PRE. Color difference (ΔE) greatly varied according to PRE addition. The film with the highest ΔE value was F10 (80.64), which, when compared to the film without PRE addition (F9), resulted in an increase by 89.8% in ΔE value. This can also be observed in the response surface for the parameter ΔE (Figure 3).

Figure 3: Response surface for color difference (ΔE) as a function of pumpkin residue extract and oregano essential oil.

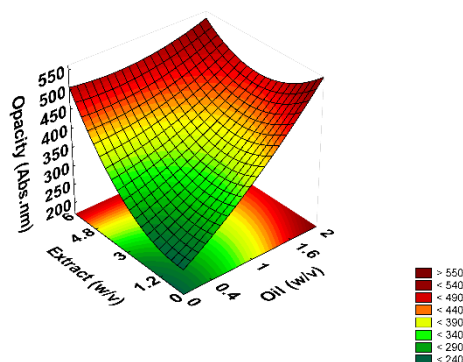


3.2.7 Opacity

The light barrier properties are important aspects for food packaging. The objective is to protect the food from light and UV radiation, which are powerful lipid-oxidizing agents. The opacity of the films was influenced by OEO, GLY, and PRE concentration (Supplementary Figure 2d). The opacity values ranged from 305.87 to 515.73 Abs.nm and the response surface is presented in Figure 4. Versino et al. (2014) found lower values in cassava starch films reinforced with natural fibrous filler. Pastor et al. (2013) reported that the films with additives had higher opacity due to the loss of homogeneity in the polymer matrix, which is caused by the presence of structural heterogeneities in the films with a different refractive index, thus promoting light-scattering phenomena.

The opacity of the films was significantly higher when PRE and OEO concentrations increased. Siripatrawan and Harte (2010) also noted an increase in opacity of chitosan-based films with green tea extract. The results obtained are probably due to the presence of carotenoids and phenolic compounds in PRE and OEO as observed by Gomez-Estaca et al. (2009) in gelatin-based films with added oregano or rosemary extract.

Figure 4: Response surface for opacity (OP Abs.nm) as a function of pumpkin residue extract and oregano essential oil.



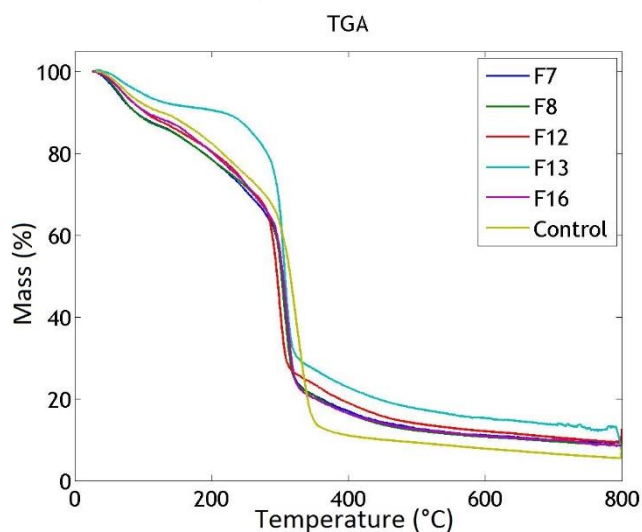
3.3 Selecting Film Formulations and Complementary Characterization

Based on the results of tensile strength, water vapor permeability, and antioxidant activity (DPPH scavenging activity), film formulations 7, 8, 12, 13, and 16 were selected for further studies regarding film morphology, solubility, and thermal, antimicrobial, and antioxidant (TBARS) properties. The chosen films had the best results for important characteristics for film application such as high antioxidant activity and tensile strength and low WVP.

3.3.1 Thermal Properties

Thermogravimetric analysis (TGA) was performed in order to evaluate the thermal stability of the films and the results can be seen in Figure 5:

Figure 5: Thermogravimetric analysis curves for the selected films (composition of the films according to Table 2).



The cassava starch films with pumpkin residue extract (PRE) and oregano essential oil (OEO) showed three stages of weight loss, which is common in starch-based films (García et al., 2009). The first stage corresponds to loss of water that has been absorbed by the starch and glycerol (~25 to 150 °C) (Pelissari et al., 2009). The second is related to the glycerol loss (150 to 290 °C), but a significant loss cannot be associated only with the glycerol content. Pica et al. (2012) report that the presence of glycerol can speed up the degradation of the starch. It can be observed that F13 (0.85% glycerol, 3% extract, 1% oil) shows different behavior in the second stage, probably due to the lower glycerol concentration. In the third stage, starch completely degrades (between 290 and 500 °C).

This behavior was also observed by Marques et al. (2006) in cassava starch films cross-linked with tetraethylene glycol diacrylate and by Pelissari et al. (2009) in starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil, in which starch degradation began at 250 °C. The films showed residual mass from 6.5% to 9.5%, with the highest percentage corresponding to F12, which contains the highest OEO concentration. According to Pelissari et al. (2009), this oil is highly stable due to the resonance of the benzene ring, thus the decomposition of these compounds occurs at higher temperatures (380 °C). According to Marques et al. (2006), the residual mass of the starch films is related to the starch impurities and inorganic components. Perazzo et al. (2014) also stated that the residual mass can be associated with the nature of the additives and the conditions for analysis in an inert atmosphere (N₂) and that complete combustion of any organic substance may not occur.

It can be concluded that the addition of OEO and PRE did not influence the thermal stability of the films. TGA allows obtaining information on the thermal stability, which was approximately 300 °C for cassava starch films added with OEO and PRE.

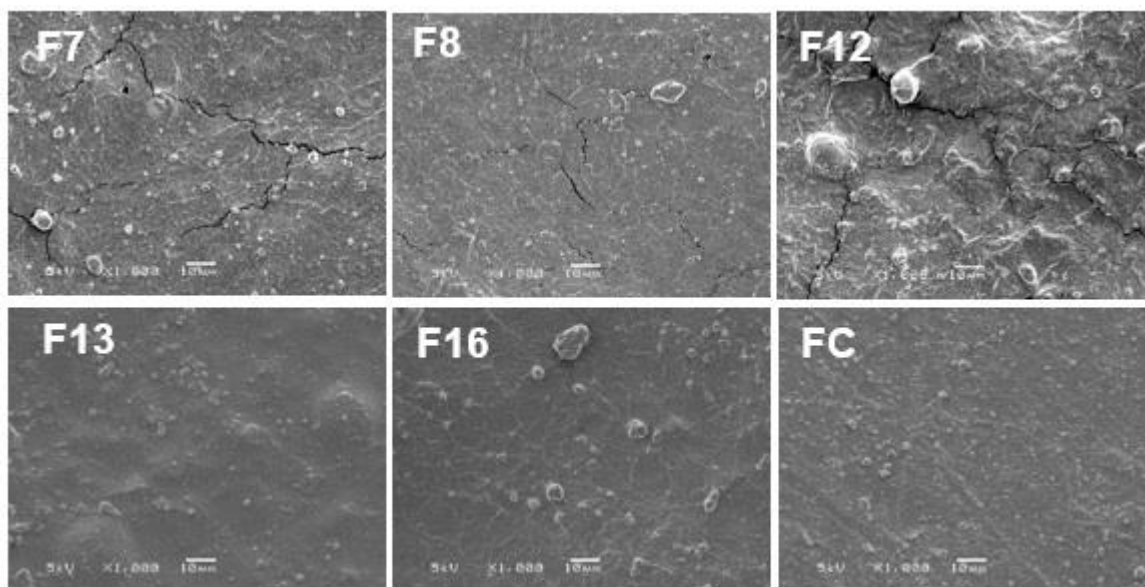
3.3.2 Film Morphology

The effects of adding OEO and PRE on the cassava starch film microstructure were evaluated by scanning electron microscopy (SEM), which can be seen in Figure 6. It can be observed that F7, F8, and F12 showed various cracks and lipid agglomerations. The results are in agreement with those

obtained by Chiumarelli and Hubinger (2014), who evaluated cassava starch, glycerol, carnauba wax, and stearic acid-based edible coatings/films and found that those films showed lipid aggregation that reduces tensile strength due to the formation of fragile points in the polymer matrix. Jiménez et al. (2010) report that the mechanical properties are impaired when lipids are added due to the promotion of discontinuities in the film matrix.

The films F13 and F16 had more regular surfaces, with fewer cracks, which contributed to the barrier properties of these films. FC had a homogeneous aspect, with a continuous phase in the polymer matrix. According to Tapia-Blácido et al. (2007), features as those observed in these films also result in films with higher elongation, which was verified in this study.

Figure 6: Images obtained by scanning electron microscopy of the surface of F7, F8, F12, F13, F16 and control (FC) films, enlarged x1000.



Villalobos et al. (2005) evaluated optical and microstructural properties of films prepared with hydroxypropyl methylcellulose and surfactant mixtures with different hydrophilic-lipophilic balance and reported that water evaporation causes changes in component concentration, leading to lipid aggregation, which affects the films surface and inner structure, therefore, its barrier, mechanical, and optical properties. Lipid aggregation contributes to the formation of a heterogeneous surface because it promotes the presence of lipid particles in the film-air interface. This phenomenon may occur when lipid aggregates are of a

large size and the aqueous phase is of low viscosity, according to the kinetics of the gravitational phase separation (Trezza and Krochta, 2000).

3.3.3 Water Solubility

Water solubility is an important property to select a film for applications in food. When water resistance and food integrity are required, low solubility percentages are desired (Ghasemlou et al., 2013). The results of water solubility are presented in Table 5.

Table 5: Results of the films' water solubility

Film	PRE (%)	OEO (%)	GLY (%)	Solubility (%)
F7	1.2	1.6	1.76	18.44±0.54 ^{ab}
F8	4.8	1.6	1.76	19.29±0.67 ^{ab}
F12	3.0	2.0	1.7	21.75±1.13 ^a
F13	3.0	1.0	0.85	17.74±0.14 ^b
F16	3.0	1.0	1.7	18.28±0.37 ^{ab}
FC	0.0	0.0	1.7	18.84±0.50 ^{ab}

Values are given as mean±standard deviation. Different letters in the same column indicate significant difference ($p \leq 0.05$) when analyzed by Tukey's test. PRE: pumpkin residue extract; OEO: oregano essential oil; GLY: glycerol.

Film solubility does not decrease with higher OEO concentration. It was observed that F12 had higher solubility ($p \leq 0.05$) than F13, probably because the former has higher glycerol concentration. This result is in agreement with a study by Müller et al. (2008) on cassava starch films which reported that films with higher glycerol concentrations are more soluble since the glycerol hydroxyl groups make the films more hygroscopic, thus increasing solubility values.

3.3.4 Antimicrobial Properties

The antimicrobial activity of the selected films was tested against *Escherichia coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* ATCC 15131, and *Staphylococcus aureus* ATCC1901 and the diameters of inhibition zones are shown in Table 6:

Table 6: Antimicrobial activity of selected films against the tested microorganisms.

Formulation	Zone of inhibition (mm)				
	PRE (%)	OEO (%)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
F7	1.2	1.6	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^b	0.0±0.0 ^b
F8	4.8	1.6	4.1±0.5 ^b	5.6±0.9 ^a	3.9±0.30 ^a
F12	3.0	2.0	10.5±0.3 ^a	10±0.6 ^a	6.9±0.2 ^a
F13	3.0	1.0	1.5±0.6 ^c	0.0±0.0 ^b	0.0±0.0 ^b
F16	3.0	1.0	0.6±0.2 ^c	0.0±0.0 ^b	0.0±0.0 ^b
FC	0.0	0.0	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^b	0.0±0.0 ^b

Values are given as mean±standard deviation. Different letters in the same column indicate significant difference ($p \leq 0.05$) by Tukey's test. PRE: pumpkin residue extract; OEO: oregano essential oil.

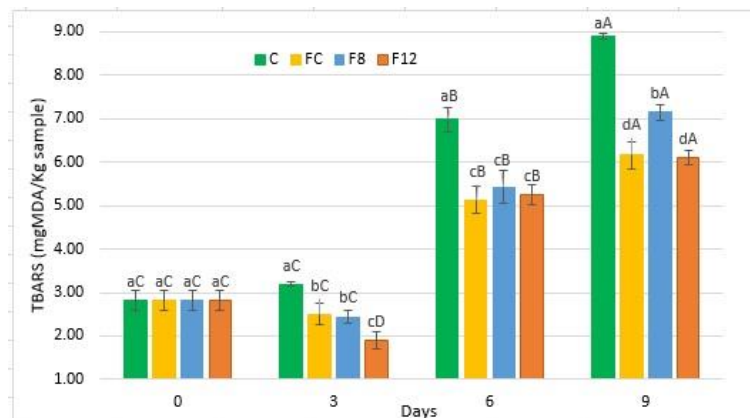
F8 and F12 had the highest zone of inhibition values for all microorganisms tested and it was possible to observe that the increase in oregano oil concentration significantly increased the inhibition diameter. F13 and F16 were effective only against *E. coli*. In a study by Debiagi et al. (2014), the films produced showed inhibition only against *E. coli* at concentrations higher than those used in this research. According to Zivanovic et al. (2005) and Burt (2004), the phenolic compounds present in OEO, such as carvacrol, are responsible for damaging the microbial phospholipid cell membrane, which increases cell permeability and causes leakage of the cytoplasm contents. Dadalioglu and Evrendilek (2004) also reported that the efficiency of OEO antimicrobial activity is attributed to the phenolic compound carvacrol and to the *p*-cymene monoterpene. Benavides et al. (2012), when evaluating alginate films incorporated with OEO, found larger zones of inhibition for *E. coli*, *S. aureus*, and *L. monocytogenes* using lower OEO concentrations. According to Sánchez-González et al. (2010), OEO compounds are rather volatile and a partial loss of these compounds may occur during film preparation, which may justify the smaller zones of inhibition in this study.

3.3.5 Antioxidant Properties (TBARS)

Lipid oxidation was evaluated on samples of ground meat packaged with selected films using the TBARS method. The meat was stored at 4 °C for 9 days. The analysis was performed in the meat without the film (C), with the control film

(FC), with film 8 (F8), and film 12 (F12). The changes in the concentration of malonaldehyde/kg sample of ground meat are shown in Figure 7.

Figure 7: Films antioxidant activity as packaging for ground beef.



Values are given as mean±standard deviation. Different lowercase letters in the same days indicate significant difference ($p\leq 0.05$) by Tukey's test. Different uppercase letters in the same sample indicate significant difference ($p\leq 0.05$) by Tukey's test.

Compared to unwrapped meat (C), all films protected the meat in terms of lipid oxidation (FC, F8, and F12). However, F12 protected meat from oxidation until the third day when compared to FC ($p\leq 0.05$). Note that the values increased significantly from the third day onwards ($p\leq 0.05$).

Despite the addition of compounds with antioxidant property, F8 did not provide protection against lipid oxidation, which can be justified by the presence of cracks and high water vapor permeability in this film compared to FC (Figure 6 and Table 2). Regarding day six, formulations F8 and F12 showed dryness that caused cracks and exposed the meat, while FC remained intact. However, TBARS values of all packaged samples were similar and significantly lower than those observed for the control (Figure 7).

Lorenzo et al. (2014) observed that active film based on polyethylene terephthalate, polyethylene, and ethylene-vinyl alcohol containing 2% of oregano essential oil was effective against lipid oxidation in foal meat as noted in this study. Barbosa-Pereira et al. (2014) evaluated the antioxidant activity in beef samples of low-density polyethylene (LDPE) films added with extract containing natural antioxidants and reported TBARS values similar to those found in this study, besides noting that the film with extract did not differ from the control film.

4 CONCLUSION

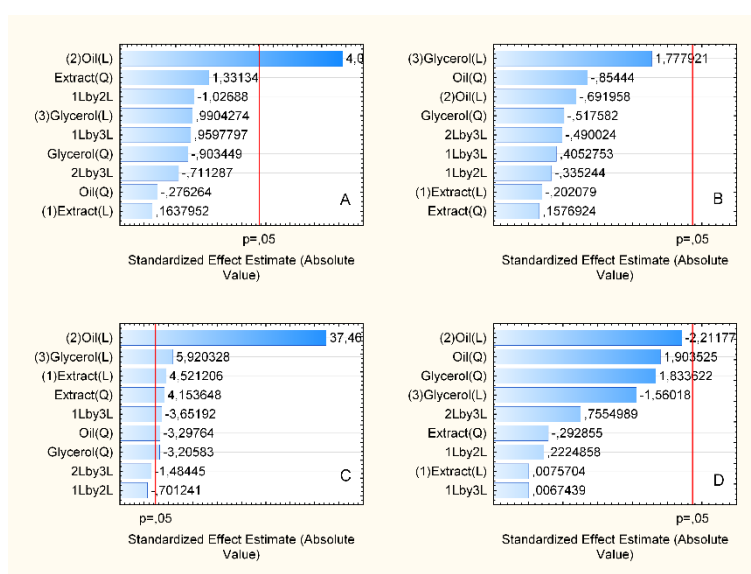
Pumpkin extract residue (PRE) and oregano essential oil (OEO) were added to starch films to improve antioxidant, antimicrobial, mechanical, and barrier properties. It was observed that PRE did not significantly contribute to the antioxidant activity when compared with films with addition of OEO (*in vitro* test), but it was essential for the color and opacity properties that can provide protection against light and UV radiation to the packaged food. OEO and glycerol significantly contributed to the film elongation parameter, but negatively impacted tensile strength when compared to the control film. The films produced with antioxidant and antimicrobial activity, when tested in meat, were effective in protecting against lipid oxidation until day three of the testing. Regarding antimicrobial activity *in vitro*, the films with higher OEO concentrations were effective against *E. coli*, *S. aureus*, and *L. monocytogenes*, suggesting that they can be used to prevent the multiplication of microorganisms in food.

ACKNOWLEDGEMENTS

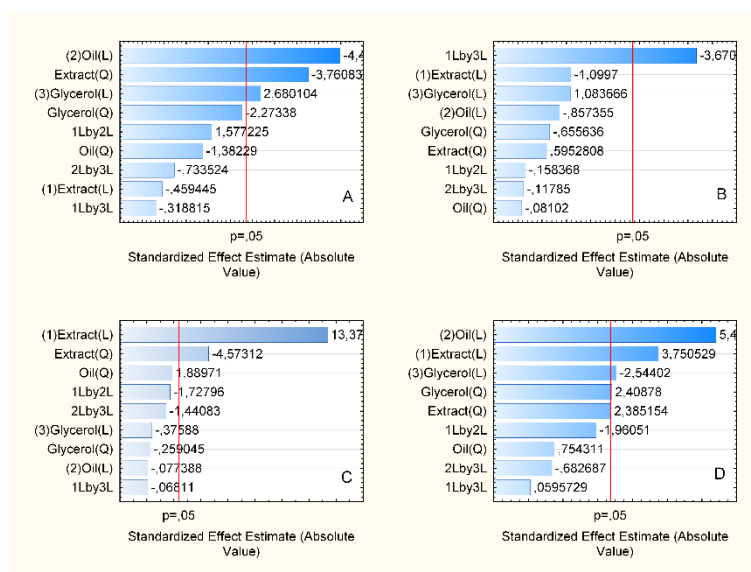
This research was financially supported by FAPERGS and CNPq. The authors thankfully acknowledge Degasperri Atacadista, from Rio Grande do Sul, Brazil, for supplying the raw material.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Figure 1: Pareto chart for thickness (a), moisture content (b), DPPH scavenging activity (c), and tensile strength (d)



Supplementary Figure 2: Pareto chart for percent elongation at break (a), water vapor permeability (b), color difference (ΔE) (c), and opacity (d)



REFERENCES

Al-Hassan, A.A., Norziah, M.H., 2012. Starch-gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocoll.* 26, 108-117.

Aliheidari, N., Fazaeli, M., Ahmadi, R., Ghasemlou, M., Emam-Djomeh, Z., 2013. Comparative evaluation on fatty acid and *Matricaria recutita* essential oil incorporated into casein-based film. *Int. J. Biol. Macromol.* 56, 69-75.

Almeida, A.P., Rodríguez-Rojo, S., Serra, A.T., Vila-Real, H., Simplicio, A.L., Delgadilho, I., Beirão da Costa, S., Beirão da Costa, L., Nogueira, I.D., Duarte, C.M.M., 2013. Microencapsulation of oregano essential oil in starch-based materials using supercritical fluid technology. *Innov. Food Sci. Emerg.* 20, 140-145.

Alves, V.D., Mali, S., Beleia, A., Grossmann, M.V.E., 2007. Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties. *J. Food Eng.* 78, 941-946.

AOAC. *Official Methods of Analysis*. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists 2005.

ASTM. Designation D882-09: Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Annual book of ASTM standards. Philadelphia: American Society for Testing and Materials. 2009.

ASTM. Standard methods of test for water vapor transmission of materials in sheet form, method ASTM E 96-00. Annual book of ASTM standards. Philadelphia: American Society for Testing and Material. 2001.

Auras, R., Arroyo, B., Selke, S., 2009. Production and Properties of Spin-Coated Cassava-Starch-Glycerol-Beeswax Films. *Starch-Starke* 61, 463-471.

Bangyekan, C., Aht-Ong, D., Srikulkit, K., 2006. Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films. *Carbohydr. Polym.* 63, 61-71.

Barbosa-Pereira, L., Angulo, I., Lagarón, J.M., Paseiro-Losada, P., Cruz, J.M., 2014. Development of new active packaging films containing bioactive nanocomposites. *Innov. Food Sci. Emerg.* 26, 310-318.

Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R., Reyes, J.E., 2012. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *J.Food Eng.* 110, 232-239.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, 25-30.

Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223-253.

Chiumarelli, M., Hubinger, M.D., 2014. Evaluation of edible films and coatings formulated with cassava starch, glycerol, carnauba wax and stearic acid. *Food Hydrocoll.* 38, 20-27.

Dadalioglu, I., Evrendilek, G.A., 2004. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *J. Agr. Food Chem.* 52, 8255-8260.

de Carvalho, L.M.J., Gomes, P.B., Godoy, R.L.d.O., Pacheco, S., do Monte, P.H.F., de Carvalho, J.L.V., Nutti, M.R., Neves, A.C.L., Vieira, A.C.R.A., Ramos, S.R.R., 2012. Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study. *Food Res. Int.* 47, 337-340.

de Moraes, J.O., Scheibe, A.S., Sereno, A., Laurindo, J.B., 2013. Scale-up of the production of cassava starch based films using tape-casting. *J. Food Eng.* 119, 800-808.

de Rosso, V.V., Mercadante, A.Z., 2007. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from amazonian fruits. *J. Agr. Food Chem.* 55, 5062-5072.

Debiagi, F., Kobayashi, R.K.T., Nakazato, G., Panagio, L.A., Mali, S., 2014. Biodegradable active packaging based on cassava bagasse, polyvinyl alcohol and essential oils. *Ind. Crop. Prod.* 52, 664-670.

Galanakis, C.M., 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends Food Sci. Tech.* 26, 68-87.

García, N.L., Famá, L., Dufresne, A., Aranguren, M., Goyanes, S., 2009. A comparison between the physico-chemical properties of tuber and cereal starches. *Food Res. Int.* 42, 976-982.

Ghasemlou, M., Aliheidari, N., Fahmi, R., Shojaee-Aliabadi, S., Keshavarz, B., Cran, M.J., Khaksar, R., 2013. Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. *Carbohydr. Polym.* 98, 1117-1126.

Gutiérrez, T.J., Morales, N.J., Pérez, E., Tapia, M.S., Famá, L., 2015. Physico-chemical properties of edible films derived from native and phosphated cush-cush yam and cassava starches. *Food Packaging and Shelf Life* 3, 1-8.

Gómez-Estaca, J., Bravo, L., Gómez-Guillén, M.C., Alemán, A., Montero, P., 2009. Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. *Food Chem.* 112, 18-25.

Hosseini, S.F., Rezaei, M., Zandi, M., Farahmandghavi, F., 2016. Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. *Food Chem.* 194, 1266-1274.

Jiménez, A., Fabra, M.J., Talens, P., Chiralt, A., 2010. Effect of lipid self-association on the microstructure and physical properties of hydroxypropyl-methylcellulose edible films containing fatty acids. *Carbohydr. Polym.* 82, 585-593.

Jouki, M., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A., Koocheki, A., 2014. Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocoll.* 36, 9-19.

Kampeepappun, P., Aht-ong, D., Pentrakoon, D., Srikulkit, K., 2007. Preparation of cassava starch/montmorillonite composite film. *Carbohydr. Polym.* 67, 155-163.

Kim, M.Y., Kim, E.J., Kim, Y.-N., Choi, C., Lee, B.-H., 2012. Comparison of the chemical compositions and nutritive values of various pumpkin (*Cucurbitaceae*) species and parts. *Nutr. Res. Pract.* 6, 21-27.

Lorenzo, J.M., Batlle, R., Gómez, M., 2014. Extension of the shelf-life of foal meat with two antioxidant active packaging systems. *LWT - Food Sci. Technol.* 59, 181-188.

Mali, S., Sakanaka, L.S., Yamashita, F., Grossmann, M.V.E., 2005. Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. *Carbohydr. Polym.* 60, 283-289.

Marques, P.T., Lima, A.M.F., Blanco, G., Laurindo, J.B., Borsali, R., Le Meins, J.F., Soldi, V., 2006. Thermal properties and stability of cassava starch films cross-linked with tetraethylene glycol diacrylate. *Polym. Degrad. Stabil.* 91, 726-732.

Martin-Sanchez, A.M., Cherif, S., Ben-Abda, J., Barber-Valles, X., Perez-Alvarez, J.A., Sayas-Barbera, E., 2014. Phytochemicals in date co-products and their antioxidant activity. *Food Chem.* 158, 513-520.

Martucci, J.F., Gende, L.B., Neira, L.M., Ruseckaite, R.A., 2015. Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. *Ind. Crop. Prod.* 71, 205-213.

Matsakidou, A., Biliaderis, C.G., Kiosseoglou, V., 2013. Preparation and characterization of composite sodium caseinate edible films incorporating naturally emulsified oil bodies. *Food Hydrocoll.* 30, 232-240.

Medina Jaramillo, C., Gonzalez Seligra, P., Goyanes, S., Bernal, C., Fama, L., 2015. Biofilms based on cassava starch containing extract of yerba mate as antioxidant and plasticizer. *Starch-Starke* 67, 780-789.

Moorthy, S.N., 2002. Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches: A review. *Starch-Starke* 54, 559-592.

Moradi, M., Tajik, H., Razavi Rohani, S.M., Oromiehie, A.R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J., Hadian, M., 2012. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT - Food Sci. Technol.* 46, 477-484.

Muriel-Galet, V., Cran, M.J., Bigger, S.W., Hernández-Muñoz, P., Gavara, R., 2015. Antioxidant and antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol copolymer films based on the release of oregano essential oil and green tea extract components. *J. Food Eng.* 149, 9-16.

Murkovic, M., Mülleder, U., Neunteufl, H., 2002. Carotenoid Content in Different Varieties of Pumpkins. *Food Compos. Anal.* 15, 633-638.

Müller, C.M.O., Yamashita, F., Laurindo, J.B., 2008. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. *Carbohydr. Polym.* 72, 82-87.

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 Chem.* 159, 529-535.

Oreopoulou, V., Tzia, C., 2007. Utilization of Plant By-Products for the Recovery of Proteins, Dietary Fibers, Antioxidants, and Colorants, in: Oreopoulou, V., Russ, W. (Eds.), *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*. Springer US, pp. 209-232.

Pagno, C.H., Klug, T.V., Haas Costa, T.M., Rios, A.d.O., Flores, S.H., 2016. Physical and antimicrobial properties of quinoa flour-based films incorporated with essential oil. *J. Appl. Polym. Sci.* 133.

Parra, D.F., Tadini, C.C., Ponce, P., Lugão, A.B., 2004. Mechanical properties and water vapor transmission in some blends of cassava starch edible films. *Carbohydr. Polym.* 58, 475-481.

Pastor, C., Sanchez-Gonzalez, L., Chiralt, A., Chafer, M., Gonzalez-Martinez, C., 2013. Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol. *Food Hydrocoll.* 30, 272-280.

Pelissari, F.M., Grossmann, M.V.E., Yamashita, F., Pineda, E.A.G., 2009. Antimicrobial, Mechanical, and Barrier Properties of Cassava Starch-Chitosan Films Incorporated with Oregano Essential Oil. *J. Agr. Food Chem.* 57, 7499-7504.

Perazzo, K., Conceicao, A.C.D., dos Santos, J.C.P., Assis, D.D., Souza, C.O., Druzian, J.I., 2014. Properties and Antioxidant Action of Actives Cassava Starch Films Incorporated with Green Tea and Palm Oil Extracts. *Plos One* 9, 13.

Pica, M., Donnadio, A., Casciola, M., 2012. Starch/zirconium phosphate composite films: Hydration, thermal stability, and mechanical properties. *Starch-Starke* 64, 237-245.

Provesi, J.G., Dias, C.O., Amante, E.R., 2011. Changes in carotenoids during processing and storage of pumpkin puree. *Food Chem.* 128, 195-202.

Rojas-Grau, M.A., Avena-Bustillos, R.J., Friedman, M., Henika, P.R., Martin-Belloso, O., McHugh, T.H., 2006. Mechanical, barrier, and antimicrobial properties of apple puree edible films containing plant essential oils. *J. Agr. Food Chem* 54, 9262-9267.

Santos, T.M., Pinto, A.M.B., de Oliveira, A.V., Ribeiro, H.L., Caceres, C.A., Ito, E.N., Azeredo, H.M.C., 2014. Physical properties of cassava starch-carnauba wax emulsion films as affected by component proportions. *Int. J. Food Sci. Technol.* 49, 2045-2051.

Seydim, A.C., Sarikus, G., 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Res. Int.* 39, 639-644.

Siripatrawan, U., Harte, B.R., 2010. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocoll.* 24, 770-775.

Sánchez-González, L., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M., 2010. Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil composite films. *J. Food Eng.* 98, 443-452.

Tapia-Blácido, D., Mauri, A.N., Menegalli, F.C., Sobral, P.J.A., Añón, M.C., 2007. Contribution of the Starch, Protein, and Lipid Fractions to the Physical, Thermal, and Structural Properties of Amaranth (*Amaranthus caudatus*) Flour Films. *J. Food Sc.* 72, E293-E300.

Tarladgis, B.G., Watts, B.M., Younathan, M.T., Dugan, L., 1960. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 37, 44-48.

Trezza, T.A., Krochta, J.M., 2000. The gloss of edible coatings as affected by surfactants, lipids, relative humidity, and time. *J. Food Sci.* 65, 658-662.

Vermeiren, L., Devlieghere, F., van Beest, M., de Kruijf, N., Debevere, J., 1999. Developments in the active packaging of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 77-86.

Versino, F., Alejandra Garcia, M., 2014. Cassava (*Manihot esculenta*) starch films reinforced with natural fibrous filler. *Ind. Crop. Prod.* 58, 305-314.

Villalobos, R., Chanona, J., Hernandez, P., Gutierrez, G., Chiralt, A., 2005. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. *Food Hydrocoll.* 19, 53-61.

Zivanovic, S., Chi, S., Draughon, A.F., 2005. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *J. Food Sci.* 70, M45-M51.

ARTIGO 2: Application of Active Cassava Starch Films Incorporated with Oregano Essential Oil and Pumpkin Residue Extract on Ground Beef

Submetido em: International Journal of Food Microbiology

Karine dos Santos Caetano ^a, Cláudia Titze Hessel ^a, Eduardo Cesar Tondo ^a,
Simone Hickmann Flôres ^{a,*}, Florencia Cladera-Olivera ^a

^a Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Agronomia, 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +5551 3308-9789; fax: +5551 3308-7048. E-mail address: simone.flores@ufrgs.br

Abstract

An antimicrobial and antioxidant film based on cassava starch incorporated with oregano essential oil (2% w/v) and pumpkin residue extract (3% w/v) was developed for application onto ground beef. A control film (without additives) was used for comparison. The film's physical, barrier, antioxidant (DPPH), and antimicrobial properties were analyzed. The addition of oil does not contribute to reducing the film's water vapor permeability or impact solubility values. Regarding the application of the film on ground beef, the addition of oregano oil demonstrated antimicrobial activity against mesophilic bacteria, coliforms, and *Salmonella*. The film also showed significant antioxidant activity. Meat color and pH were assessed and it was found that the film contributed to keeping the pH at low values until the sixth day of storage, but had no influence in maintaining color in the samples. Based on the results, the film may be used as an alternative to packaging because it can contribute to ground beef quality and safety.

Keywords: *Cassava starch films, oregano essential oil, pumpkin residue, ground beef*

1. INTRODUCTION

In recent times, edible films have attracted great attention for being biodegradable, not harming the environment, and improving food quality and safety (Zhong et al., 2014). Recently, the use of natural food additives with antimicrobial and antioxidant properties, which have no negative effects on human health, has become the focus of researches in order to reduce the use of chemical additives in the food industry (Alves-Silva et al., 2013). Essential oils are an attractive natural additive to be incorporated into films as these substances have antimicrobial and antioxidant activity (Viuda-Martos et al., 2010) and are Generally Recognized as Safe (GRAS) (Ruiz-Navajas et al., 2013). Oregano oil is made up of four main compounds, namely carvacrol, thymol, *p*-cymene and, *c*-terpinene, the former two being the main responsible compounds for the oil's antimicrobial activity (Burt, 2004). By-products and food waste are also used to extract bioactive compounds with significant antioxidant activity (Galanakis, 2012; Martin-Sanchez et al., 2014; Oreopoulou and Tzia, 2007). The minimally processed food industry generates large amounts of waste, composed of peels, seeds, and parings which have significant amounts of bioactive compounds, but are intended for animal feed or organic fertilization (Laufenberg et al., 2003). When, despite pumpkin peel being rich in carotenoids and phenolic compounds pumpkin is processed, its peels are removed to facilitate consumption compounds as demonstrated in studies conducted by Murkovic et al. (2002) and Dragovic-Uzelac et al. (2005). Carotenoids and phenolic compounds are substances with antioxidant capacity and some phenolic compounds also have antimicrobial properties (phenolic acids and flavonoids) (Jomova and Valko, 2013; Puupponen-Pimia et al., 2001).

Fresh ground meat is generally stored at refrigeration temperature (2 to 5 °C). This product is susceptible to rapid decomposition, physiological and chemical changes, and microbiological activity and usually spoils during storage due to two main reasons: oxidative rancidity and microbial multiplication. Ground meat undergoes disruption in the muscle membranes, which exposes lipid membranes to metal ions and facilitates interactions between unsaturated fatty acids and pro-oxidants, resulting in meat spoilage, reduction in quality, and economic loss (Kim et al., 2013; Sallam and Samejima, 2004; Østerlie and Lerfall, 2005). Antimicrobial and antioxidant packaging is an alternative that not only

provides a barrier but also inhibits pathogen multiplication and protects against lipid oxidation (Devatkal and Naveena, 2010; Wu et al., 2014).

The objective of this study is to apply an active film based on cassava starch added with pumpkin residue extract (PRE) and oregano essential oil (OEO) to ground beef and to evaluate the film's ability to reduce microbial contamination.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Pumpkin residues (skin) derived from minimally processed crossbred *Cucurbita maxima* and *Cucurbita moschata* var. Tetsuka Buto were provided by Degasperi Atacadista (Rio Grande do Sul, Brazil); glycerol was purchased from Dinâmica (São Paulo, Brazil); oregano essential oil was purchased from Mundo dos Óleos (Brasília, Brazil); and soy lecithin (Giro Verde), cassava starch (Yoki), and ground beef were acquired at a local market.

2.2 Film Preparation

Based on previous results, a film was developed using the following formulation: 4% cassava starch, 1.7% of glycerol, 3% pumpkin residue extract (PRE), and 2% of oregano essential oil (OEO). This film was called Active Film. A control film was also produced for comparison using the same concentrations of cassava starch and glycerol, but with no PRE or OEO. Both films were produced by casting. Starch, glycerol, and distilled water were homogenized and heated to 80 °C in a water bath (Dubnoff NT 232, Piracicaba, SP, Brazil) with constant stirring for 10 min. The additives were added when the temperature cooled down to 50 °C and the mix was homogenized manually. The amount of 0.28 g/cm² of the filmogenic solution was placed in acrylic plates and dried for about 16 h at 30 °C. Finally, the films were conditioned in a desiccator with relative humidity of 58% for 48 h before analysis, except for antioxidant and antimicrobial analysis.

2.3 Film Characterization

2.3.1 Film Thickness Measurement

The thickness of the films was measured using a digital micrometer (model MDC-25, Mitutoyo Corp., Tokyo, Japan), according to Versino and Gracia (2014). Three measurements were carried out at random sites and the average values were reported.

2.3.2 Moisture Content

Moisture content was determined according to official methods of the AOAC (2005). Film pieces of approximately 0.1 g were dried in an oven at 105 °C for 24 h.

2.3.3 Water Solubility

The films' water solubility was obtained following the method described by Medina Jaramillo et al. (2015) using the following equation:

$$\text{Solubility (\%)} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

where, m_i is the initial dry weight and m_f is the final dry weight. Initial dry weight values were determined by placing pieces of films of approximately 0.1 g in an oven at 105 °C for 24 h. Then, the dry films were immersed in 30 mL of distilled water for 24 h at 25 °C under constant stirring. The water was discarded and the films were dried at 105 °C for 24 h to obtain the final dry weight values.

2.3.4 Water Vapor Permeability

Water Vapor Permeability (WVP) was determined according to ASTM E 96-00 (2001). The films were placed on circular permeability capsules with silicone grease to ensure that the humidity migration occurred only through the film. Inside the capsule, anhydrous calcium salt (CaCl_2 , 0% relative humidity) was added and the capsules were placed in a desiccator containing a saturated sodium chloride solution (NaCl , 75% relative humidity). The desiccators containing the capsules were placed in a chamber at 25 °C for 24 h. The capsules were weighed at time 0 and after 24 h in an analytical balance (AY 220, Shimadzu). The samples' water vapor permeability was determined using Equation 2:

$$WVP = \frac{w.L}{A.t.\Delta p} \quad (2)$$

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 is the water vapor pressure difference between the two sides of the film (kPa).

2.3.5 Film Morphology

Film surface morphology was analyzed according to Kampeerapappun et al. (2007) with some modifications using scanning electron microscopy (SEM). The samples were placed on a stub with double-sided adhesive tape and coated with a thin layer of silver. Images were taken with a scanning electron microscope (model JSM 6060, Jeol, USA) using accelerating voltage of 5 kV and magnification of 500 to 1,000 times the original specimen size.

2.3.6 Antioxidant Properties

2.3.6.1 DPPH Assay

The capacity of the films to capture the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was evaluated according to Brand-Williams et al. (1995) with adaptations. For this analysis, 16 mg of film were weighed and transferred to test tubes with caps, 3.9 ml of methanolic DPPH solution (0.06 M) were added, and the mixture was agitated. Absorbance was measured in a spectrophotometer (model UV-1800, Shimadzu, Japan) using glass cuvettes at 515 nm after 45 min reacting in the dark at 23 °C. The percentage of DPPH radical-scavenging activity was obtained using Equation 3:

$$\text{DPPH Scavenging Activity (\%)} = \frac{Abs_{DPPH} - Abs_{film}}{Abs_{DPPH}} \times 100 \quad (3)$$

where Abs_{DPPH} is the absorbance of the methanolic solution of DPPH and Abs_{film} is the absorbance of the sample.

2.4 Application on Ground Beef

The film produced was applied onto ground beef and pH, color, mesophilic count, and total coliforms were analyzed in meat stored for six days under refrigeration (4 °C). The ground beef used was acquired at a local market. The test was performed using 25 g portions of ground beef as follows: control (C) (ground beef without film), Control Film (CF) (ground beef packaged with film without OEO or PRE), and Active Film (AF) (ground beef packaged with film containing 3% of PRE and 2% of OEO).

The ground beef used was previously characterized regarding moisture and lipid contents according to the AOAC (2005).

In another experiment, an important foodborne pathogen (*Salmonella* Enteritidis SE86) was chosen and inoculated into ground beef in order to verify its survival in ground meat samples packaged with CF and AF. *S. Enteritidis* SE86 is a specific strain responsible for several salmonellosis outbreaks between 1999 and 2013 in southern Brazil (Tondo et al., 2015).

2.4.1 Analysis of Ground Beef pH and Color

The pH and color of meat packaged with the films were measured on days 0, 3, and 6. pH was analyzed according to the official methods of the AOAC (2005). Color was measured using a colorimeter (model CR-300, Minolta Co. Ltd., Osaka, Japan) according to Medina Jaramillo et al. (2015). The results were expressed on the CIELab scale, where L denotes lightness (L: 0=black and 100 =white) and a* and b* denote chromaticity: -a* (greenness) to +a* (redness) and -b* (blueness) to +b* (yellowness). A white disc (L₀*: 97.5; a₀*: 0.12, b₀*: 1.7) was used as standard. The color difference was compared to the standard by means of Equation 4:

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

where $\Delta L^* = L - L_0^*$, $\Delta a^* = a^* - a_0^*$, and $\Delta b^* = b^* - b_0^*$; L₀*, a₀*, and b₀* are the color values of the standard; and L*, a*, and b* are the meat color values.

2.6.2 Coliform and Mesophilic Microorganism Counts

For each treatment (Control, Control Film, and Active Film), total coliform and mesophilic counts were performed on days 0, 3, and 6 of storage. Coliform counts were performed following the method described by AOAC 2003.01 using the Petrifilm™ Enterobacteriaceae Count Plate method (3M®). Samples of 5 g of meat were weighed in sterile plastic bags and homogenized with 45 mL of 0.1% peptone water. Following this, 1 mL was successively transferred to tubes containing 9 mL of 0.1% peptone water in order to obtain decimal dilutions. From each dilution, 1 mL was transferred to Petrifilm™ and incubated at 37 ± 2 °C for 24 ± 2 h.

Mesophilic microorganisms were counted according to the method described by the APHA (2001). The decimal dilutions were obtained as described above for coliforms and 1 mL of each dilution was inoculated by the pour plate technique on Plate Count Agar (PCA, Oxoid) and then incubated in a bacteriological oven at 37 ± 2 °C for 48 ± 2 h.

2.4.2 *Salmonella* Enteritidis SE86 Survival Test

In order to verify the antimicrobial activity of the active film against a food pathogen, *Salmonella* Enteritidis SE86 was artificially inoculated into ground beef packaged with CF or AF, and its survival was evaluated.

Inoculation was performed according to the methodology described by Delbeke et al. (2015) with modifications. A specific strain of *Salmonella* Enteritidis, SE86, was stored in Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid) with 30% of glycerol at -20 °C. For inoculum, 100 µL of *Salmonella* culture were resuspended in 5 mL of BHI (Oxoid) for 24 ± 2 h at 37 ± 2 °C. Then, 1 mL was centrifuged for 5 min at $800 \times g$, the supernatant was discarded, and the pellet was homogenized in 1 mL of sterile distilled water. Decimal dilutions were carried out by adding 100 µL of the bacterial suspension to 900 µL of sterile distilled water until a final concentration of 10^4 CFU/mL.

The ground beef (10 g) was inoculated with 100 µL of the *Salmonella* Enteritidis SE86 inoculum. *Salmonella* quantification was performed in ground beef samples on days 0, 1, 2, 3, and 6 for each treatment. For analysis, 10 g of meat were weighed in sterile plastic bags and homogenized in 45 mL of sterile 0.1% peptone water. Decimal dilutions were carried out as previously described,

0.1 mL of each dilution was plated on Xylose Lysine Desoxycholate agar (XLD) and incubated at 37 ± 2 °C for 24 ± 2 h.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Film Characterization

The results for thickness, moisture content, water solubility, water vapor permeability, and antioxidant activity (DPPH) of the films are shown in Table 1.

Table 1: Thickness (T), moisture content (MC), solubility (SO), DPPH scavenging activity (SA), and water vapor permeability (WVP) of films.

Film	T (mm)	MC (%)	SO (%)	SA (%)	WVP*
AF	0.169±0.009 ^a	21.3±0.5 ^b	21.9±0.8 ^a	58.4±0.3 ^a	0.94±0.03 ^a
CF	0.155±0.002 ^b	28.1±0.4 ^a	18.4±0.5 ^b	13.0±0.6 ^b	0.40±0.04 ^b

Values are given as mean±standard deviation. Different letters in the same column indicate significant difference ($p\leq 0.05$) by Tukey's test. WVP* ($\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$). **AF**=Active Film (3% PRE, 2% OEO, 1.7% glycerol, 4% starch), **CF**=control film (0% PRE, 0% OEO, 1.7% glycerol, 4% starch).

The thickness of AF was greater than that of CF ($p\leq 0.05$). Taqi et al. (2014) also found high thickness values for apple pectin/cassava starch composite films added with *Laurus nobilis* oil. Ghasemlou et al. (2013) reported similar values for corn starch films when *Zataria multiflora* Boiss or *Mentha* essential oils were added at concentrations of 1 to 3%.

CF showed higher moisture content than AF. Ghasemlou et al. (2013) also observed that moisture content in corn starch decreases with the addition of oil. The addition of hydrophobic essential oils can affect the ability of the film to retain water.

Contrary to what was expected, AF showed higher solubility than CF. Generally, hydrophobic compounds added to the film matrix decrease solubility values, whereas hydrophilic compounds increase these values. The effect of those two additives on the film solubility depends on the type of compound, the concentration, and their inherent hydrophilicity and hydrophobicity indices (Kavoosi et al., 2013). The amount of oil added to AF may have been insufficient to reduce solubility since that film has the same glycerol concentration as added to CF.

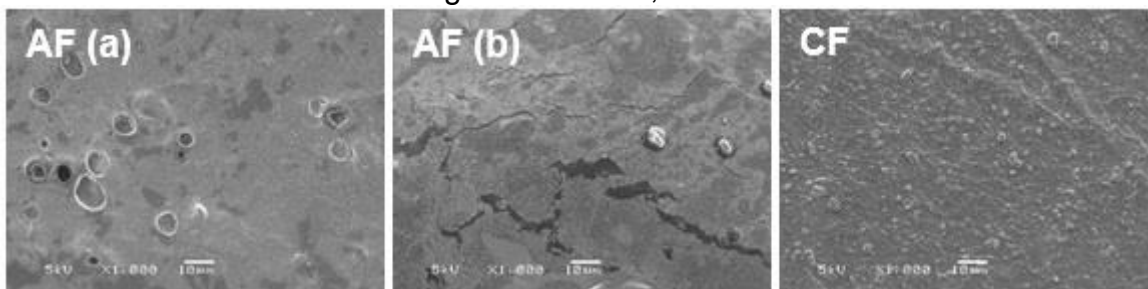
The films' water vapor permeability is an essential characteristic in order to prevent moisture loss in packaged food (Padrão et al., 2016). AF had higher

WVP than CF ($p \leq 0.05$) probably because of the cracks and holes in its structure (Figure 1). Glycerol is often the cause of increased WVP (Bangyekan et al., 2006; Rodriguez et al., 2006), however, both films have the same concentration of glycerol. Nevertheless, according to Benavides et al. (2012), adding OEO to the films may increase WVP due to the porous microstructure produced by the internal cross-linking process. Souza et al. (2013) observed that WVP values increased in films based on cassava starch added with cinnamon essential oil and found values similar to those in this study.

The films' antioxidant activity was expressed as a percentage of the free radical scavenging capacity and is shown in Table 1. AF exhibited 58% of DDPH radical inhibition. It can be noted that the addition of OEO and PRE was responsible for the greater radical inhibition percentage when compared to CF. Moradi et al. (2012) reported similar values (20 to 55%) for chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* essential oil and grape seed extract. This result shows that AF has high antioxidant properties and could be used to improve the shelf life of fatty foods, protecting them against lipid oxidation.

The effects of adding OEO and PRE to the microstructure of cassava starch films can be observed in Figure 1.

Figure 1: Images obtained by SEM of the surface of the AF and CF at magnification of 1,000x.



It can be observed that AF has several oil droplets on its surface (Figure 1a) and several cracks (Figure 1b). AF's cracks and irregular surface can be justified by the addition of a high concentration of oregano essential oil. According to Yang and Paulson (2000), adding lipids (beeswax or a 1:1 blend of stearic-palmitic acids) to the gellan film base may increase the surface roughness and cause cracks during drying. Those authors also reported that this characteristic of the film surface is proportional to the WVP values.

3.2 Application in Ground Beef

The results of ground beef moisture and lipid content were $58.83\pm 0.86\%$ and $3.79\pm 0.38\%$, respectively.

3.2.1 pH

The pH values of ground beef packaged with different films are shown in Table 2.

Table 2: pH values for ground beef stored at 4 ± 1 °C for six days.

	pH		
	Day 0	Day 3	Day 6
C	5.52 ± 0.02^{aC}	5.89 ± 0.09^{aB}	6.92 ± 0.01^{aA}
CF	5.52 ± 0.02^{aB}	5.61 ± 0.02^{bB}	6.02 ± 0.07^{bA}
AF	5.52 ± 0.02^{aA}	5.61 ± 0.05^{bAB}	5.67 ± 0.03^{cA}

Values are given as mean \pm standard deviation. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($p\leq 0.05$) by Tukey's test. Different uppercase letters in the same row indicate significant difference ($p\leq 0.05$) by Tukey's test.

Meat pH increased from the initial day until the sixth day, but AF maintained the lowest pH values ($p\leq 0.05$). A similar result was found by Ammor et al. (2009) in ground beef wrapped in active packaging containing oregano oil. Lavieri and Williams (2014) observed an increase in meat pH values packaged with polyvinyl chloride that can be caused by the production of alkaline by-products during the multiplication and stationary phase of microorganisms. Another factor that can contribute to increasing meat pH is the deamination of proteins (Biswas et al., 2004). Dehnad et al. (2014) found pH values similar to those of this study for ground meat packaged with films based on chitosan-nanocellulose biocomposites. Özvural et al. (2016) found similar behavior in pH results of hamburger patties coated with a solution made with chitosan, green tea extract, and sodium tripolyphosphate.

3.2.2 Color

Color is an important parameter for meat since visual acceptance influences consumers' purchasing decision. Color is also an indicator of quality and wholesomeness (Mancini and Hunt, 2005). Table 3 presents changes in color values of the ground beef packaged with active starch films containing PRE and OEO.

Table 3: Color properties of ground beef packaged with active starch films.

Meat Sample	Color Values		
	Storage (Days)		
	0	3	6
	L		
C	55.68±0.29 ^{aA}	33.85±2.37 ^{aB}	27.24±0.90 ^{aC}
CF	55.68±0.29 ^{aA}	37.25±0.70 ^{aB}	32.30±1.50 ^{aC}
AF	55.68±0.29 ^{aA}	37.43±0.02 ^{aB}	31.37±0.19 ^{aC}
	a*		
C	20.84±0.49 ^{aA}	11.05±0.18 ^{aB}	10.43±0.20 ^{aB}
CF	20.84±0.49 ^{aA}	12.36±1.06 ^{aB}	10.38±0.32 ^{aB}
AF	20.84±0.49 ^{aA}	13.46±0.78 ^{aB}	10.71±1.14 ^{aC}
	b*		
C	13.21±0.08 ^{aA}	13.23±0.61 ^{aA}	7.30±0.37 ^{abB}
CF	13.21±0.08 ^{aA}	10.85±0.52 ^{aA}	5.46±1.03 ^{bB}
AF	13.21±0.08 ^{aA}	11.49±0.06 ^{aA}	9.05±0.36 ^{aB}
	ΔE		
C	47.54±1.03 ^{aC}	60.62±2.35 ^{aB}	71.43±1.10 ^{aA}
CF	47.54±1.03 ^{aB}	62.32±0.37 ^{aA}	66.42±1.24 ^{aA}
AF	47.54±1.03 ^{aC}	62.29±0.01 ^{aB}	67.22±0.10 ^{aA}

Values are given as mean±standard deviation. Different lowercase letters in the same column and same parameters indicate significant difference ($p \leq 0.05$) by Tukey's test. Different uppercase letters in the same row indicate significant difference ($p \leq 0.05$) by Tukey's test.

L values changed between the initial and final days ($p \geq 0.05$). According to Tornuk et al. (2015), a^* is the most important color parameter for meat as it indicates the redness of the samples. In this study, the films did not influence this parameter, considering that there were no changes on days 3 and 6 ($p \geq 0.05$). At the end of storage, a^* values of the samples were lower than in the beginning and decreased by about 50% compared to the initial value ($p \leq 0.05$). This indicates that the active compounds present in the starch film matrix did not retard oxidation and metmyoglobin formation during the storage period and that the starch films did not contribute to preserving meat color.

Lower a^* values and similar b^* values were reported by Lavieri and Williams (2014) in ground beef packaged with polyvinyl chloride stored for seven days. Significant decreases occurred in b^* values on day 6 of storage ($p \leq 0.05$). This can be explained by the development or presence of metmyoglobin brown pigment causing a decrease in b^* values (Lavieri and Williams, 2014).

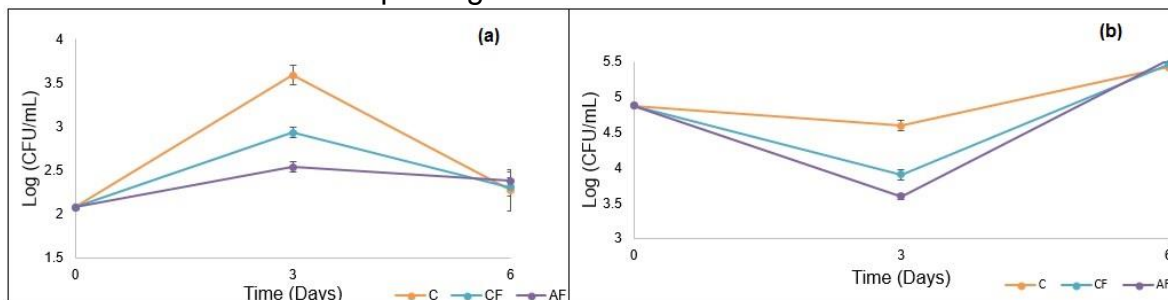
It was observed that ΔE values increased between days 0 and 3, which indicates a change from its original color ($p \leq 0.05$). Similar results were obtained

by Tornuk et al. (2015) in fresh beef packaged with active nanocomposite films containing thymol-, eugenol-, or carvacrol-grafted nanoclays.

3.2.3 Microbiological Analysis

Mesophilic bacteria counts and coliform counts in ground beef packaged with active films are shown in Figure 2.

Figure 2: Coliform count (a) and mesophilic count (b) in ground beef packaged with active films.



Values are given as mean±standard deviation. Control (C) (ground beef without film), Control Film (CF) (ground beef packaged with film with no oregano oil or pumpkin extract), and Active Film (AF)

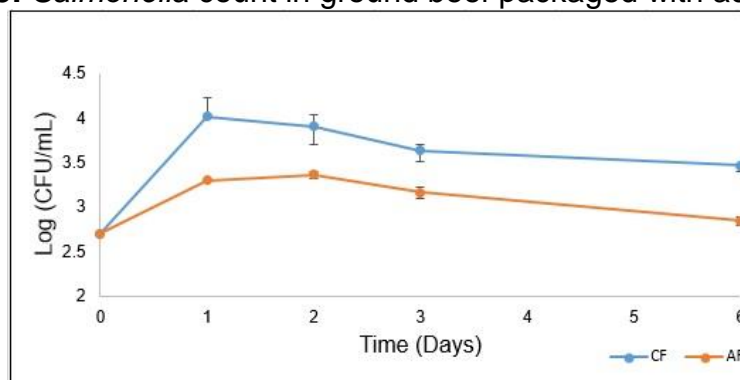
Initial counts of coliforms (Figure 2a) and mesophilic microorganisms (Figure 2b) were 4.78 and 2.08 log CFU/g, respectively. Until the third day, AF was able to control the multiplication of mesophilic microorganisms and no difference was observed compared to CF ($p \geq 0.05$). However, the AF and CF treatments differed from C ($p \leq 0.05$), which demonstrated that the use of biodegradable films, even without additives, contributed to the reduction in microorganisms. A reduction by 1.28 log CFU/g was observed compared to the value on the first day for AF. On day 6, the count increased and there was no difference among treatments ($p \geq 0.05$). Bacterial counts obtained on day 6 are in accordance with the study by Özvural et al. (2016), who found higher mesophilic count values in hamburger patties and observed no difference between the control treatment (chitosan coverage) and the treatment with the addition of green tea extract and sodium tripolyphosphate. The increase in count on day 6 matches the increase in meat pH previously mentioned.

The coliform count values on day 0, shown in Figure 2a, were approximately 2 log CFU/g. On the third day, AF was able to decrease coliform counts by 1.05 log CFU/g when compared to sample C ($p \leq 0.05$). It can be observed that, from day 3 onwards, AF was not effective in reducing coliform and

mesophilic counts. Emiroglu et al. (2010) observed a significant reduction in coliform counts in beef patties using soy-protein edible films added with oregano, thyme, or a mixture of both. Similar results were reported by Alboofetileh et al. (2014) in alginate/clay nanocomposite films enriched with essential oils when tested against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes* determined by an agar diffusion test. Sánchez-González et al. (2011) reported that the loss in oil efficiency can be explained by the evaporation of volatile compounds of the oil responsible for the antimicrobial activity.

Salmonella Enteritidis was inoculated into ground beef and results are shown in Figure 3.

Figure 3: *Salmonella* count in ground beef packaged with active films.



Values are given as mean \pm standard deviation. Control Film (CF) (ground beef packaged with film with no oregano oil or pumpkin extract) and Active Film (AF).

Salmonella Enteritidis SE86 was inoculated into ground beef and showed initial counts of 2.70 log CFU/g. An increase by 1.31 log CFU/g was observed from day 0 to day 1 for C, while AF exhibited a lower increase by 0.59 log CFU/g. On day 6, AF was able to reduce *Salmonella* counts (0.62 log CFU/g) when compared with CF ($p \leq 0.10$). Note also that AF was able to maintain the same counts between day 0 and day 6 ($p \leq 0.10$), thus demonstrating its effectiveness against this microorganism. Controlling *Salmonella* Enteritidis SE86 is an important property of AF because this strain was identified as responsible for several salmonellosis outbreaks from 1999 to 2013 (Tondo et al., 2015). Govaris et al. (2010) demonstrated that the direct addition of 0.6% oregano oil to a 25 g meat sample reduced by 2.43 log CFU/g the counts on the 2nd day in minced sheep meat inoculated with *S. Enteritidis* with oregano oil direct addition.

Friedman et al. (2004) reported in their study that carvacrol, oregano, and cinnamaldehyde were effective against *Salmonella enterica*. The antimicrobial effects of essential oils are different for each type of microorganism. Some factors may influence the oil's effectiveness, among which the plant species, the period when they were harvested, and the amount of active substances present (Chorianopoulos et al., 2004; Kavas et al., 2015).

4. CONCLUSION

It can be concluded that films based on cassava starch added with oregano oil and pumpkin residue extract showed *in vitro* antioxidant activity and antimicrobial properties against coliforms and *Salmonella* Enteritidis. For mesophilic microorganisms, the active film (AF) did not differ from the control film (CF), however, both contributed to the reduction of these microorganisms until day 3 since they differed from meat without film (C). The films showed high WVP values, however, their application on ground beef improved the food's microbiological quality. Thus, the film can be used to package ground beef and may contribute to its quality and safety.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by FAPERGS and CNPq. The authors thankfully acknowledge Degasperri Atacadista, from Rio Grande do Sul, Brazil, for supplying the raw material.

REFERENCES

Alboofetileh, M., Rezaei, M., Hosseini, H., Abdollahi, M., 2014. Antimicrobial activity of alginate/clay nanocomposite films enriched with essential oils against three common foodborne pathogens. *Food Control* 36, 1-7.

Alves-Silva, J.M., Dias dos Santos, S.M., Pintado, M.E., Perez-Alvarez, J.A., Fernandez-Lopez, J., Viuda-Martos, M., 2013. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal. *Food Control* 32, 371-378.

Ammor, M.S., Argyri, A., Nychas, G.-J.E., 2009. Rapid monitoring of the spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Meat Sci.* 81, 507-514.

AOAC. Official Methods of Analysis. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists 2005.

AOAC. Official Methods of Analysis 2003.01 . **Enterobacteriaceae in Selected Foods**. Petrifilm™ Enterobacteriaceae Count Plate Method.

APHA (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods p.600 (4th ed.). Washington, DC: American Public Health Association.

ASTM. Standard methods of test for water vapor transmission of materials in sheet form, method ASTM E 96-00. Annual book of ASTM standards. Philadelphia: American Society for Testing and Material. 2001.

Bangyekan, C., Aht-Ong, D., Srikulkit, K., 2006. Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films. *Carbohydr. Polym.* 63, 61-71.

Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R., Reyes, J.E., 2012. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and organo essential oil concentration. *J. Food Eng.* 110, 232-239.

Biswas, A.K., Keshri, R.C., Bisht, G.S., 2004. Effect of enrobing and antioxidants on quality characteristics of precooked pork patties under chilled and frozen storage conditions. *Meat Sci.* 66, 733-741.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28, 25-30.
Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223-253.

Chorianopoulos, N., Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, S., Nychas, G.J., Haroutounian, S.A., 2004. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: Chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *J. Agr. Food Chem.* 52, 8261-8267.

Dehnad, D., Mirzaei, H., Emam-Djomeh, Z., Jafari, S.-M., Dadashi, S., 2014. Thermal and antimicrobial properties of chitosan–nanocellulose films for extending shelf life of ground meat. *Carbohydr. Polym.* 109, 148-154.

Delbeke, S., Ceuppens, S., Jacxsens, L., Uyttendaele, M., 2015. Survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on Strawberries, Basil, and Other Leafy Greens during Storage. *J. Food Protect.* 78, 652-660.

Devatkal, S.K., Naveena, B.M., 2010. Effect of salt, kinnow and pomegranate fruit by-product powders on color and oxidative stability of raw ground goat meat during refrigerated storage. *Meat Sci.* 85, 306-311.

Dragovic-Uzelac, V., Delonga, K., Levaj, B., Djakovic, S., Pospisil, J., 2005. Phenolic profiles of raw apricots, pumpkins, and their purees in the evaluation of apricot nectar and jam authenticity. *J. Agr. Food Chem.* 53, 4836-4842.

Emiroglu, Z.K., Yemis, G.P., Coskun, B.K., Candogan, K., 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Sci.* 86, 283-288.

Friedman, M., Buick, R., Elliott, C.T., 2004. Antibacterial activities of naturally occurring compounds against antibiotic-resistant *Bacillus cereus* vegetative cells and spores, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. *J. Food Protect.* 67, 1774-1778.

Galanakis, C.M., 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends Food Sci. Tech.* 26, 68-87.

Ghasemlou, M., Aliheidari, N., Fahmi, R., Shojaee-Aliabadi, S., Keshavarz, B., Cran, M.J., Khaksar, R., 2013. Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. *Carbohydr. Polym.* 98, 1117-1126.

Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A., Chatzopoulou, P.S., 2010. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella Enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. *Int. J. Food Microbiol.* 137, 175-180.

Jomova, K., Valko, M., 2013. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *Eur. J. Med. Chem.* 70, 102-110.

Kampeeraappun, P., Aht-ong, D., Pentrakoon, D., Srikulkit, K., 2007. Preparation of cassava starch/montmorillonite composite film. *Carbohydr. Polym.* 67, 155-163.

Kavas, G., Kavas, N., Saygili, D., 2015. The effects of thyme and clove essential oil fortified edible films on the physical, chemical and microbiological characteristics of kashar cheese. *J. Food Quality* 38, 405-412.

Kavoosi, G., Dadfar, S.M.M., Purfard, A.M., 2013. Mechanical, Physical, Antioxidant, and Antimicrobial Properties of Gelatin Films Incorporated with Thymol for Potential Use as Nano Wound Dressing. *J. Food Sci.* 78, E244-E250.
Kim, S.J., Min, S.C., Shin, H.J., Lee, Y.J., Cho, A.R., Kim, S.Y., Han, J., 2013. Evaluation of the antioxidant activities and nutritional properties of ten edible plant extracts and their application to fresh ground beef. *Meat Sci.* 93, 715-722.

Laufenberg, G., Kunz, B., Nystroem, M., 2003. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementation. *Bioresource Technol.* 87, 167-198.

Lavieri, N., Williams, S.K., 2014. Effects of packaging systems and fat concentrations on microbiology, sensory and physical properties of ground beef stored at 4 ± 1 °C for 25 days. *Meat Sci.* 97, 534-541.

- Mancini, R.A., Hunt, M.C., 2005. Current research in meat color. *Meat Sci.* 71, 100-121.
- Martin-Sanchez, A.M., Cherif, S., Ben-Abda, J., Barber-Valles, X., Perez-Alvarez, J.A., Sayas-Barbera, E., 2014. Phytochemicals in date co-products and their antioxidant activity. *Food Chem.* 158, 513-520.
- Medina Jaramillo, C., Gonzalez Seligra, P., Goyanes, S., Bernal, C., Fama, L., 2015. Biofilms based on cassava starch containing extract of yerba mate as antioxidant and plasticizer. *Starch-Starke* 67, 780-789.
- Moradi, M., Tajik, H., Razavi Rohani, S.M., Oromiehie, A.R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J., Hadian, M., 2012. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT - Food Sci. Technol.* 46, 477-484.
- Murkovic, M., Mülleder, U., Neunteufl, H., 2002. Carotenoid Content in Different Varieties of Pumpkins. *J. Food Compos. Anal.* 15, 633-638.
- Oreopoulou, V., Tzia, C., 2007. Utilization of Plant By-Products for the Recovery of Proteins, Dietary Fibers, Antioxidants, and Colorants, in: Oreopoulou, V., Russ, W. (Eds.), *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*. Springer US, pp. 209-232.
- Padrão, J., Gonçalves, S., Silva, J.P., Sencadas, V., Lanceros-Méndez, S., Pinheiro, A.C., Vicente, A.A., Rodrigues, L.R., Dourado, F., 2016. Bacterial cellulose-lactoferrin as an antimicrobial edible packaging. *Food Hydrocoll.* 58, 126-140.
- Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Meier, C., Kahkonen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman-Caldentey, K.M., 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J. Appl. Microbiol.* 90, 494-507.
- Rodriguez, M., Oses, J., Ziani, K., Mate, J.I., 2006. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Res. Int.* 39, 840-846.
- Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J.A., Fernandez-Lopez, J., 2013. In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. *Food Control* 30, 386-392.
- Sallam, K.I., Samejima, K., 2004. Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. *Lebensm-Wiss. Technol.* 37, 865-871.
- 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 Sci. Technol.* 54, 346-352.

Sánchez-González, L., Cháfer, M., Hernández, M., Chiralt, A., González-Martínez, C., 2011. Antimicrobial activity of polysaccharide films containing essential oils. *Food Control* 22, 1302-1310.

Taqi, A., Mutihac, L., Stamatina, I., 2014. Physical and barrier properties of apple pectin/cassava starch composite films incorporating laurus nobilis l. Oil and oleic acid. *J. Food Process. Pres.* 38, 1982-1993.

Tondo, E.C., Ritter, A.C., Casarin, L.S., 2015. Involvement in Foodborne Outbreaks, Risk Factors and Options to Control *Salmonella* Enteritidis SE86: An Important Food Pathogens in Southern Brazil. In Christopher B. Hackett (Ed.), *Salmonella*, New York, pp. 65 – 77

Tornuk, F., Hancer, M., Sagdic, O., Yetim, H., 2015. LLDPE based food packaging incorporated with nanoclays grafted with bioactive compounds to extend shelf life of some meat products. *LWT - Food Sci. Technol.* 64, 540-546.

Versino, F., Alejandra Garcia, M., 2014. Cassava (*Manihot esculenta*) starch films reinforced with natural fibrous filler. *Ind. Crop. Prod.* 58, 305-314.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., 2010. Effect of orange dietary fibre, oregano essential oil and packaging conditions on shelf-life of bologna sausages. *Food Control* 21, 436-443.

Wu, J., Ge, S., Liu, H., Wang, S., Chen, S., Wang, J., Li, J., Zhang, Q., 2014. Properties and antimicrobial activity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin-chitosan films incorporated with oregano essential oil for fish preservation. *Food Packaging and Shelf Life* 2, 7-16.

Yang, L., Paulson, A.T., 2000. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. *Food Res. Int.* 33, 571-578.

Zhong, Y., Cavender, G., Zhao, Y., 2014. Investigation of different coating application methods on the performance of edible coatings on Mozzarella cheese. *LWT - Food Sci. Technol.* 56, 1-8.

Özvural, E.B., Huang, Q., Chikindas, M.L., 2016. The comparison of quality and microbiological characteristic of hamburger patties enriched with green tea extract using three techniques: Direct addition, edible coating and encapsulation. *LWT - Food Sci. Technol.* 68, 385-390.

Østerlie, M., Lerfall, J., 2005. Lycopene from tomato products added minced meat: Effect on storage quality and colour. *Food Res. Int.* 38, 925-929.

CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES E PERSPECTIVA

DISCUSSÃO GERAL

Embalagens plásticas, provenientes do petróleo, são amplamente utilizadas por serem baratas e cumprirem a função de proteger os alimentos do meio externo. No entanto a grande quantidade gerada de plástico tornou-se uma preocupação ambiental e uma motivação para a realização de estudos relacionados com o desenvolvimento de alternativas mais sustentáveis, utilizando biopolímeros para a confecção de embalagens biodegradáveis. Dentre as matérias-primas utilizadas na produção de filmes, o amido de mandioca tem-se destacado por ser uma fonte abundante e barata.

Diante disso, o presente trabalho desenvolveu filmes biodegradáveis ativos a base de amido de mandioca com adição de óleo essencial de orégano e extrato do resíduo de abóbora. A partir dos experimentos realizados foram elaborados dois artigos intitulados: “*Active Biodegradable Films Developed with Cassava Starch, Oregano Oil, and Pumpkin Residue Extract*” e “*Application of Active Cassava Starch Films Incorporated with Oregano Essential Oil and Pumpkin Residue Extract on Ground Beef*”

Foi avaliada a influência da adição de óleo de orégano (O), extrato do resíduo de abóbora (E) e glicerol (G) nas características físicas, mecânicas, de barreira, óticas e antioxidantes (DPPH) do filme. Nas formulações que apresentaram melhores propriedades mecânicas, de barreira e antioxidante foram também realizadas análises de propriedades térmicas, morfológicas, antimicrobianas e avaliada a solubilidade em água. Posteriormente, duas formulações foram selecionadas para avaliar a capacidade antioxidante do filme, utilizando carne moída.

Os aditivos (extrato e óleo) não contribuíram para melhorar as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes (como era esperado), e o óleo também foi responsável por causar rachaduras na estrutura do filme. A adição do extrato teve o propósito de contribuir com a atividade antioxidante dos filmes, porém ficou evidente que a adição de óleo de orégano desempenhou melhor essa função. No entanto a adição do extrato foi importante para os resultados de opacidade e cor dos filmes, tornando-os amarelados, que pode colaborar com a proteção do alimento contra a luz UV e visível. A adição do glicerol influenciou principalmente o teor de umidade e solubilidade dos filmes. A porcentagem de alongação também foi influenciada pela adição de glicerol e óleo, que

desempenharam papel de plastificante tornando as interações intermoleculares da matriz do filme menos densas e facilitaram o movimento das cadeias poliméricas quando aplicado alguma força sobre ele.

O óleo de orégano incorporado à matriz do filme afetou a espessura e contribuiu para que a solubilidade dos filmes se mantivesse mais baixa, mesmo nos filmes com maiores concentrações de glicerol. Também foi responsável por promover atividade antimicrobiana e antioxidante nos filmes que se mostraram efetivos contra *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* no teste do halo de inibição e ainda contribuíram para reduzir os valores de TBARS na carne, comprovando sua capacidade de proteção da oxidação lipídica.

Através dos testes realizados foi possível selecionar uma formulação para realizar a aplicação do filme em carne. A formulação 12 [AF] (3 % de E; 2 % de O; 1,7 % de G e 4 % de amido) foi aplicada em carne moída para avaliar a atividade antimicrobiana do filme contra a multiplicação de Coliformes, Mesófilos e *Salmonella* Enteretidis. As características de permeabilidade a vapor de água, solubilidade, umidade, porcentagem de inibição do radical DPPH e morfológicas foram novamente avaliadas e os resultados foram semelhantes aos já obtidos. A Tabela 1 apresenta um resumo dos principais resultados.

Tabela 1: Formulações e propriedades dos filmes produzidos a base de amido de mandioca com extrato de resíduo de abóbora e óleo essencial de orégano.

Propriedade do Filme	Continua				
	F7 (1.2E;1.6O;1.76G)	F8 (4.8E;1,6O;1,76G)	F12 (3E;2O;1,7G)	F13 (3E;1O;0.85G)	F16 (3E;1O;1,7G)
Espessura (mm)	0,152 ^d	0,164 ^c	0,193 ^a	0,131 ^b	0,154 ^{cd}
Umidade (%)	23,05 ^b	23,72 ^{ab}	22,48 ^b	12,67 ^c	26,74 ^a
Solubilidade (%)	18,44 ^{ab}	19,29 ^{ab}	21,75 ^a	17,74 ^b	18,28 ^{ab}
Opacidade (Abs.nm)	427,81 ^b	481,83 ^a	461,30 ^{ab}	482,28 ^a	345,11 ^c
Inibição de DPPH (%)	55,73 ^a	55,89 ^a	60,49 ^a	35,19 ^b	42,81 ^c
Resistência a Tração*	0,58 ^b	0,60 ^b	0,39 ^c	1,07 ^a	0,39 ^c
Elongação (%)	161,74 ^{cd}	188,58 ^b	143,69 ^d	183,80 ^b _c	222,53 ^a
PVA*	0,62 ^a	0,41 ^{ab}	0,48 ^{ab}	0,36 ^b	0,50 ^a

Tabela 1: Formulações e propriedades dos filmes produzidos a base de amido de mandioca com extrato de resíduo de abóbora e óleo essencial de orégano.

Propriedade do Filme	Continuação				
	F7 (1.2E;1.6O;1.76G)	F8 (4.8E;1,6O;1,76G)	F12 (3E;2O;1,7G)	F13 (3E;1O;0.85G)	F16 (3E;1O;1,7G)
Atividade antimicrobiana (Halo de inibição)	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
Proteção a oxidação da carne (TBARS)	N.A	Não	Sim	N.A	N.A
Atividade antimicrobiana na carne	N.A	N.A	Sim	N.A	N.A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p \leq 0.05$) pelo Teste de Tukey

N.A. = não aplicável. *PVA (Permeabilidade ao Vapor de Água): g mm/ h m² kPa. Resistência à tração: MPa

Em relação à aplicação dos filmes em carne, para a análise de cor, os filmes não contribuíram em manter os valores do parâmetro a^* na carne embalada, sendo o mais importante para carnes bovinas, já que está relacionado à cor vermelha. O filme com formulação 12 (AF) manteve o menor pH da carne até o sexto dia de armazenamento, o aumento do pH da carne está relacionado com multiplicação de bactérias e desaminação das proteínas da carne, sendo assim a aplicação do filme ativo foi importante para manter a qualidade da carne.

O filme ativo (AF) foi efetivo contra a multiplicação de coliformes e mesófilos até o terceiro dia de armazenamento, sendo que para mesófilos o AF não diferiu do filme controle (filme sem aditivos) (CF) ($p \geq 0.05$). No entanto pode-se considerar que a aplicação de filme, mesmo sem aditivos, foi relevante para reduzir a multiplicação de mesófilos na carne, pois tanto CF como AF diferiram do tratamento sem filme (C) $p \leq 0.05$. Foi também realizado um teste inoculando uma quantidade conhecida de *Salmonella* na carne e embalando a mesma com o filme controle (CF) e com o filme ativo (AF). Foi verificado que a carne embalada com o AF apresentou a menor contagem nos seis dias de armazenamento e diferiu do filme controle (CF) nos dias 1, 3 e 6 ($p < 0.10$).

Com base nos resultados apresentados, pode-se afirmar que os filmes produzidos atingiram os objetivos propostos, no entanto suas propriedades

mecânicas e de barreira comprometem a estrutura do filme, que provavelmente poderia ter apresentado melhores resultados se essas características fossem melhoradas. Mesmo assim, a aplicação dos filmes mostrou-se promissora para manter a qualidade do alimento embalado e reduzir o uso de embalagens plásticas, cooperando dessa forma com práticas sustentáveis e redução dos danos ambientais.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos nos dois artigos apresentados, foi possível produzir filmes ativos a partir de amido de mandioca com adição de óleo essencial de orégano e extrato obtido a partir de resíduos de abóbora da indústria de minimamente processados. Os aditivos adicionados não contribuíram positivamente para as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes, no entanto, a adição do extrato promoveu cor amarelada aos filmes, que desempenha importante papel na proteção do alimento embalado contra luz UV e visível.

Contudo, o objetivo de produzir filmes antioxidantes e antimicrobianos foi alcançado, visto que os filmes mostraram-se efetivos na proteção da oxidação lipídica da carne e na redução da multiplicação de coliformes e *Salmonella* em relação ao filme controle. Os filmes produzidos foram efetivos na manutenção da qualidade microbiológica de carne moída e devido suas características podem colaborar com a redução do uso de plásticos de fontes não renováveis, e na substituição da aplicação de aditivos sintéticos em alimentos.

PERSPECTIVAS

Trabalhos futuros com a substituição da matriz polimérica e/ou adição de fibras serão realizados com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes, mantendo e/ou melhorando suas características antioxidante e antimicrobiana.

Pretende-se também realizar a aplicação dos filmes em outros produtos como queijo ou peixe e testar sua efetividade contra a multiplicação de microrganismos relacionados a estes alimentos.

REFERÊNCIAS

AGUIRRE, A.; BORNEO, R.; LEÓN, A. E. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. **Food Bioscience**, v. 1, n. 0, p. 2-9, 2013. ISSN 2212-4292. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212429212000028> >.

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, 2010. ISSN 0023-6438. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364381000040X> >.

AL-HASSAN, A. A.; NORZIAH, M. H. Starch-gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 108-117, 2012. ISSN 0268-005X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000293731800013 >.

ALINKINA, E. S.; MISHARINA, T. A.; FATKULLINA, L. D. Antiradical properties of oregano, thyme, and savory essential oils. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 73-78, 2013. ISSN 0003-6838. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000312492300012 >.

ALMEIDA, A. P. et al. Microencapsulation of oregano essential oil in starch-based materials using supercritical fluid technology. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 20, n. 0, p. 140-145, 2013. ISSN 1466-8564. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856413001240> >.

AMARAL, S. P. J. D. **Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), 2000. Disponível em: < <https://doaj.org/article/98190ce14bea485eb470afbab0a75b99> >.

AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, A. C. E. S.; FARO, Z. P. D. Aceitabilidade de flocos desidratados de abóbora. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 39-45, 2006. ISSN 1415-5273. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732006000100004&nrm=iso >.

ARRUDA, S. F.; DE ALMEIDA SIQUEIRA, E. M.; DE VALENCIA, F. F. Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat. **Nutrition**, v. 25, n. 4, p. 472-478, 2009. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000264280800014 >.

AMORIM-CARRILHO, K. T. et al. Review of methods for analysis of carotenoids. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 56, n. 0, p. 49-73, 2014. ISSN 0165-9936. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993614000193> >.

AOAC. Official Methods of Analysis. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists 2005.

AOAC. Official Methods of Analysis 2003.01 . **Enterobacteriaceae in Selected Foods**. Petrifilm™ Enterobacteriaceae Count Plate Method

APHA (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods p. 600 (4th ed.). Washington, DC: American Public Health Association.

AREVALO, K. et al. Properties and biodegradability of cast films based on agroindustrial residues, pectin and polyvinilic alcohol (PVA). **New Biotechnology**, v. 25, Supplement, n. 0, p. S287-S288, 2009. ISSN 1871-6784. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678409008164> >.

ARFA, A. B. et al. Coating papers with soy protein isolates as inclusion matrix of carvacrol. **Food Research International**, v. 40, n. 1, p. 22-32, 2007. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996906001165> >.

ARVANITOYANNIS, I.; BILIADERIS, C. G. Physical properties of polyol-plasticized edible blends made of methyl cellulose and soluble starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, n. 1, p. 47-58, 1999. ISSN 0144-8617. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000078074300007 >.

ASTM. Designation D882-09: Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Annual book of ASTM standards. Philadelphia: American Society for Testing and Materials. 2009.

ASTM. Standard methods of test for water vapor transmission of materials in sheet form, method ASTM E 96-00. Annual book of ASTM standards. Philadelphia: American Society for Testing and Material. 2001.

ASTORG, P. Food carotenoids and cancer prevention: An overview of current research. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 12, p. 406-413, 1997. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000071305200004 >.

AURAS, R.; ARROYO, B.; SELKE, S. Production and Properties of Spin-Coated Cassava-Starch-Glycerol-Beeswax Films. **Starch-Starke**, v. 61, n. 8, p. 463-471, 2009. ISSN 0038-9056. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269715800005 >.

AVILA-SOSA, R. et al. Fungal Inactivation by Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) Essential Oil Added to Amaranth, Chitosan, or Starch Edible Films. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, p. M127-M133, 2010. ISSN 0022-1147. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000276353000011 >.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in

plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605006242> >.

BERGO, P.; FREITAS MORAES, I. C.; DO AMARAL SOBRAL, P. J. Effects of moisture content on structural and dielectric properties of cassava starch films. **Starch-Starke**, v. 64, n. 10, p. 835-839, 2012. ISSN 0038-9056. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000309459300012 >.

BHARGAVA, K. et al. Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. **Food Microbiology**, v. 47, p. 69-73, 2015. ISSN 0740-0020. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000347621700008 >.

BISOGNIN, D. A. Origin and evolution of cultivated cucurbits. **Ciência Rural**, v. 32, p. 715-723, 2002. ISSN 0103-8478. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782002000400028&nrm=iso >.

BOLUMAR, T.; ANDERSEN, M. L.; ORLIEN, V. Antioxidant active packaging for chicken meat processed by high pressure treatment. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1406-1412, 2011. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611007850> >.

BONILLA, J. et al. Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 2, p. 208-213, May 2012. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000301273300008 >.

_____. Properties of wheat starch film-forming dispersions and films as affected by chitosan addition. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 3, p. 303-312, 2013. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000312172800003 >.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995. ISSN 0023-6438. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643895800085> >.

BRAVIN, B.; PERESSINI, D.; SENSIDONI, A. Development and application of polysaccharide-lipid edible coating to extend shelf-life of dry bakery products. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 280-290, 2006. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000237770200003 >.

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, 2004. ISSN 0168-1605. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222888700001 >.

CAMO, J. et al. Display life of beef packaged with an antioxidant active film as a function of the concentration of oregano extract. **Meat Science**, v. 88, n. 1, p. 174-178, 2011. ISSN 0309-1740. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174010004493> >.

CAMPOS, C.; GERSCHENSON, L.; FLORES, S. Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 6, p. 849-875, 2011. ISSN 1935-5130. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-010-0434-1> >.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 23, n. 7, p. 1273-1335, 1998. ISSN 0079-6700. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670097000397> >.

CHUN, S.-S. et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 809-816, 2005. ISSN 1359-5113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959204001189> >.

COMA, V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. **Meat Science**, v. 78, n. 1-2, p. 90-103, 2008. ISSN 0309-1740. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174007002574> >. Accessed on: 2008/2//.

CROMPTON, T. R. **Thermal methods of polymer analysis**. Smithers Rapra Technology, 2013. ISBN 9781847356611 (hardback)9781847356628 (softback)9781847356635 (ebook). Disponível em: < [http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=561955\(=pt-br&site=ehost-live&ebv=EB&ppid=pp_Cover](http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=561955(=pt-br&site=ehost-live&ebv=EB&ppid=pp_Cover) >.

CUQ, B. et al. Functional properties of myofibrillar protein-based biopackaging as affected by film thickness. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 3, p. 580-584, 1996. ISSN 0022-1147. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996UQ36700027 >.

CUTTER, C. N. Opportunities for bio-based packaging technologies to improve the quality and safety of fresh and further processed muscle foods. **Meat Science**, v. 74, n. 1, p. 131-142, 2006. ISSN 0309-1740. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000239349600012 >.

DALLA COSTA, A. P.; ROSSATTO, E. R. P.; RIOS, A. O.; FLÔRES, S. H.; "SUBPRODUTOS DE ABÓBORA COMO FONTE DE CAROTENOIDES E ANTIOXIDANTES", p. 4134-4139 . Em: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014 [Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2]**. São Paulo: Blucher, 2015. ISSN 2359-1757, DOI 10.5151/chemeng-cobeq2014-0979-21941-144635

DE MORAES, J. O. et al. Scale-up of the production of cassava starch based films using tape-casting. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 4, p. 800-808,

2013. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000324444500013 >.

DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from amazonian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5062-5072, 2007. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247366500024 >.

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J. A.; VOILLEY, A. Edible films and coatings: Tomorrow's packagings: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 4, p. 299-313, 1998. ISSN 1040-8398. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000074033300002 >.

DELBEKE, S. et al. Survival of Salmonella and Escherichia coli O157:H7 on Strawberries, Basil, and Other Leafy Greens during Storage. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 4, p. 652-660, 2015. ISSN 0362-028X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000352463600003 >.

DENG, Q. **Chemical Composition of Dietary Fiber and Polyphenols of Wine Grape Pomace Skins and Development of Wine Grape (cv. Merlot) Pomace Extract Based Films**. 2011. 145 Oregon State University.

DRAGOVIC-UZELAC, V. et al. Phenolic profiles of raw apricots, pumpkins, and their purees in the evaluation of apricot nectar and jam authenticity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4836-4842, 2005. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000229720700030 >.

DUNDAR, E. et al. The effects of intra-rectal and intra-peritoneal application of Origanum onites L. essential oil on 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in the rat. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 59, n. 6, p. 399-408, 2008. ISSN 0940-2993. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000255508800008 >.

FALGUERA, V. et al. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 6, p. 292-303, 2011. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224411000318> >.

FAOSTAT. Top production cassava - 2012. Available at: < <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> >.

FERREIRA, C. O. et al. Characterization of chitosan–whey protein films at acid pH. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 807-813, 2009. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996909000830> >.

FINLEY, J. W. Proposed criteria for assessing the efficacy of cancer reduction by plant foods enriched in carotenoids, glucosinolates, polyphenols and selenocompounds. **Annals of Botany**, v. 95, n. 7, p. 1075-1096, 2005. ISSN 0305-7364. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000229583500002 >.

FISHMAN, M. L. et al. Extrusion of pectin/starch blends plasticized with glycerol. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, n. 4, p. 317-325, 2000. ISSN 0144-8617. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000084721900001 >.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; LEVIN, C. E. Antimicrobial activities of red wine-based formulations containing plant extracts against Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enterica serovar Hadar. **Food Control**, v. 50, n. 0, p. 652-658, 2015. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514005775> >.

GALANAKIS, C. M. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 26, n. 2, p. 68-87, 2012. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224412000532> >.

GARCIA-PEREZ, E. et al. Micropropagation Effect on the Anti-carcinogenic Activity of Polyphenolics from Mexican Oregano (*Poliomintha glabrescens* Gray) in Human Colon Cancer Cells HT-29. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, n. 2, p. 155-162, 2013. ISSN 0921-9668. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000319294200010 >.

GIMÉNEZ, B. et al. Release of active compounds from agar and agar-gelatin films with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 264-271, 2013. ISSN 0268-005X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X12001142> >.

GOMEZ, E. F.; MICHEL, F. C., JR. Biodegradability of conventional and bio-based plastics and natural fiber composites during composting, anaerobic digestion and long-term soil incubation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 98, n. 12, p. 2583-2591, 2013. ISSN 0141-3910; 1873-2321. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000329379800023 >.

GOMEZ-ESTACA, J. et al. Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 18-25, 2009. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000259837200004 >.

GONNET, M.; LETHUAUT, L.; BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*, v. 146, n. 3, p. 276-290, 2010. ISSN 0168-3659. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365910004402> >.

GONTARD, N. et al. Edible composite films of wheat gluten and lipids - water-vapor permeability and other physical-properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 29, n. 1, p. 39-50, Feb 1994. ISSN 0950-5423. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994NF71600006 >.

GRONDONA, E. et al. Bio-efficacy of the Essential Oil of Oregano (*Origanum vulgare* Lamiaceae. Ssp *Hirtum*). **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, n. 4, p. 351-357, 2014. ISSN 0921-9668. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000346058300010 >.

GUILBERT, S.; CUQ, B.; GONTARD, N. Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials. **Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**, v. 14, n. 6-7, p. 741-751, 1997. ISSN 1944-0049. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997XW84600024 >.

GUSTAVSSON, J. Global food losses and food waste extent, causes and prevention. 2011.

HERNANDEZ-IZQUIERDO, V. M.; KROCHTA, J. M. Thermoplastic processing of proteins for film formation - A review. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 2, p. R30-R39, 2008. ISSN 0022-1147. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000253313600003 >.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000208863600066 >.

INTERNATIONAL, A. Annual book of ASTM standards. **Annual book of ASTM standards**, 2002.

JASWIR, I. et al. Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 5, n. 33, p. 7119-7131, 2011. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84856022008&partnerID=40&md5=56ae185bd338575bfc5b188d014a520c> >.

JEON, Y. J.; KAMIL, J.; SHAHIDI, F. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 18, p. 5167-5178, 2002. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000177659300027 >.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 70, n. 0, p. 102-110, 2013. ISSN 0223-5234. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523413006351> >.

JORGENSEN, K.; SKIBSTED, L. Carotenoid scavenging of radicals. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 196, n. 5, p. 423-429, 1993. ISSN 0044-3026. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF01190806> >.

KAMPEERAPAPPUN, P. et al. Preparation of cassava starch/montmorillonite composite film. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 2, p. 155-163, 2007. ISSN 0144-8617. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000242877000002 >.

KHOO, H.-E. et al. Carotenoids and Their Isomers: Color Pigments in Fruits and Vegetables. *Molecules*, v. 16, n. 2, p. 1710-1738, Feb 2011. ISSN 1420-3049. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000287745400047 >.

KORDALI, S. et al. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 8788-8795, 2008. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000259888700041 >.

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. chap. 4, p.113-134. ISBN 978-0-387-92823-4.

KRINSKY, N. I. THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF CAROTENOIDS. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n. 5, p. 1003-1010, 1994. ISSN 0033-4545. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994NT83700011 >.

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

KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 633-640, 2004. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814603003741> >.

LACROIX, M. Mechanical and Permeability Properties of Edible Films and Coatings for Food and Pharmaceutical Applications. In: HUBER, K. C. e EMBUSCADO, M. E. (Ed.). **Edible Films and Coatings for Food Applications**: Springer New York, 2009. chap. 13, p.347-366. ISBN 978-0-387-92823-4.

LAFARGUE, D.; LOURDIN, D.; DOUBLIER, J.-L. Film-forming properties of a modified starch/kappa-carrageenan mixture in relation to its rheological behaviour. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, n. 1, p. 101-111, 2007. ISSN 0144-8617. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248994800014 >.

LAKSHMINARAYANA, R. et al. Determination of major carotenoids in a few Indian leafy vegetables by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 8, p. 2838-2842, Apr 20 2005. ISSN 0021-8561. Available at: < <Go to ISI>://WOS:000228408600008 >.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical

implementation. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 167-198, 2003. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000181369700005 >.

LI, J. H. et al. Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 166-173, 2014. ISSN 0268-005X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000330176800021 >.

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, 2007. ISSN 1541-4337. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248257400001 >.

LOZANO-ALEJO, N. et al. Physical properties and carotenoid content of maize kernels and its nixtamalized snacks. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 3, p. 385-389, 2007. ISSN 1466-8564. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856407000422> >.

MALI, S. et al. Microstructural characterization of yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, n. 4, p. 379-386, 2002. ISSN 0144-8617. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000178012500008 >.

MARCOS, B. et al. Active packaging containing nisin and high pressure processing as post-processing listericidal treatments for convenience fermented sausages. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 325-330, 2013. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095671351200415X> >.

_____. Development of biodegradable films with antioxidant properties based on polyesters containing α -tocopherol and olive leaf extract for food packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 1, n. 2, p. 140-150, 2014. ISSN 2214-2894. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214289414000350> >.

MARSH, K.; BUGUSU, B. Food packaging - Roles, materials, and environmental issues. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 3, p. R39-R55, 2007. ISSN 0022-1147. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000245896000002 >.

MARTELLI, M. R. et al. Effect of Chitosan Nanoparticles and Pectin Content on Mechanical Properties and Water Vapor Permeability of Banana Puree Films. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 1, p. N98-N104, 2013. ISSN 0022-1147. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000313700900016 >.

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

MARTIN-SANCHEZ, A. M. et al. Phytochemicals in date co-products and their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 158, p. 513-520, 2014. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000335805600072 > .

MARTUCCI, J. F. et al. Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. **Industrial Crops and Products**, v. 71, n. 0, p. 205-213, 2015. ISSN 0926-6690. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669015002691> > .

MEDINA JARAMILLO, C. et al. Biofilms based on cassava starch containing extract of yerba mate as antioxidant and plasticizer. **Starch-Starke**, v. 67, n. 9-10, p. 780-789, 2015. ISSN 0038-9056. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000361053100009 > .

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, 2013. ISSN 0141-8130. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181301300086X> > .

MIGUEL, A. C. A. et al. Agroindustrial use for the solids wastes deriving from minimally processed melon. **Ciência e Tecnologia De Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 733-737, 2008. ISSN 0101-2061. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000260051600034 > .

MOTARJEMI, Y. M. G. T. E. C. D. Encyclopedia of food safety. 2014. ISSN 9780123786135 0123786134. Disponível em: < <http://public.eblib.com/EBLPublic/PublicView.do?ptilD=1578356> > .

MURIEL-GALET, V. et al. Antioxidant and antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol copolymer films based on the release of oregano essential oil and green tea extract components. **Journal of Food Engineering**, v. 149, n. 0, p. 9-16, 2015. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877414004270> > .

MURKOVIC, M.; MÜLLEDER, U.; NEUNTEUFL, H. Carotenoid Content in Different Varieties of Pumpkins. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, n. 6, p. 633-638, 2002. ISSN 0889-1575. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157502910525> > .

NASCIMENTO, W. M. et al. Efficiency of Cucurbita maxima accessions as pollinators in the commercial production of pumpkin ('Tetsukabuto' type). **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 540-542, 2008. ISSN 0102-0536. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000264011300024 > .

NOBREGA, M. M.; BONA, E.; YAMASHITA, F. An artificial neural network model for the prediction of mechanical and barrier properties of biodegradable films. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 7, p. 4331-4336, 2013. ISSN 0928-4931. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493113003871> > .

OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1-2, p. 543-555, 2000. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000087787000046 >.

OREOPOULOU, V.; TZIA, C. Utilization of Plant By-Products for the Recovery of Proteins, Dietary Fibers, Antioxidants, and Colorants. In: OREOPOULOU, V. e RUSS, W. (Ed.). **Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry**: Springer US, v.3, 2007. chap. 11, p.209-232. ISBN 978-0-387-33511-7.

PADMAJA, G. Uses and Nutritional Data of Sweetpotato. In: LOEBENSTEIN, G. e THOTTAPPILLY, G. (Ed.). **The Sweetpotato**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. p.189-234. ISBN 978-1-4020-9475-0.

PARK, S.; ZHAO, Y. Y. Development and characterization of edible films from cranberry pomace extracts. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 2, p. E95-E101, 2006. ISSN 0022-1147. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000236445200021 >.

PASTOR, C. et al. Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 272-280, 2013. ISSN 0268-005X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000309554100032 >.

PEDROSA, M. W. et al. Produção e qualidade da moranga híbrida em resposta a doses de nitrogênio. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 355-358, 2012. ISSN 0102-0536. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362012000200029&nrm=iso >.

PELLISSARI, F. M. et al. Antimicrobial, Mechanical, and Barrier Properties of Cassava Starch-Chitosan Films Incorporated with Oregano Essential Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7499-7504, 2009. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269042900049 >.

PENG, Y.; WU, Y.; LI, Y. F. Development of tea extracts and chitosan composite films for active packaging materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 282-289, 2013. ISSN 0141-8130. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000321229000039 >.

PEREZ G, S. et al. Anti-inflammatory Activity of Some Essential Oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, n. 5, p. 38-44, 2011. ISSN 1041-2905. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000295246900009 >.

PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K.; SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 38, n. 8, p. 859-865, 2005. ISSN 0023-6438. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000231749900008 >.

PREEDY, V. R. Processing and impact on active components in food. 2015. ISSN 9780124047099 0124047092 0124046991 9780124046993. Disponível em: < <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=1699258> >.

PROVESI, J. G.; DIAS, C. O.; AMANTE, E. R. Changes in carotenoids during processing and storage of pumpkin puree. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 195-202, 2011. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611004080> >.

RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 3, p. 207-216, 2007. ISSN 1043-6618. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661807000357> >.

RATTO, J. A. et al. Processing, performance and biodegradability of a thermoplastic aliphatic polyester/starch system. **Polymer**, v. 40, n. 24, p. 6777-6788, 1999. ISSN 0032-3861. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000082267700015 >.

RAZAVI, S. M. A.; MOHAMMAD AMINI, A.; ZAHEDI, Y. Characterisation of a new biodegradable edible film based on sage seed gum: Influence of plasticiser type and concentration. **Food Hydrocolloids**, n. 0, p. 1-9, 2014. ISSN 0268-005X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X14002239> >.

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**, n. 0, 2014. ISSN 0960-3085. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308514000558> >. Rojas-Grau et al., 2006).

ROJAS-GRAÜ, M. A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 10, p. 438-447, 2009. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224409001769> >.

SAAVEDRA, M. J. et al. Evaluation of the potential of squash pumpkin by-products (seeds and shell) as sources of antioxidant and bioactive compounds. **Journal of Food Science and Technology-Mysore**, v. 52, n. 2, p. 1008-1015, 2015. ISSN 0022-1155. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000351878600040 >.

SANTOCONO, M. et al. Lutein, zeaxanthin and astaxanthin protect against DNA damage in SK-N-SH human neuroblastoma cells induced by reactive nitrogen species. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 88, n. 1, p. 1-10, 2007. ISSN 1011-1344. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134407000620> >.

SANTOS, T. M. et al. Physical properties of cassava starch-carnauba wax emulsion films as affected by component proportions. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 9, p. 2045-2051, 2014. ISSN 0950-5423. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000340533500011 > .

SCHIEBER, A.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, n. 11, p. 401-413, 2001. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224402000122> > .

SCHMID, M. et al. Properties of Whey-Protein-Coated Films and Laminates as Novel Recyclable Food Packaging Materials with Excellent Barrier Properties. **International Journal of Polymer Science**, 2012. ISSN 1687-9422. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000307638200001 > .

SEO, K.-W. et al. The effects of thickness on the electrical, optical, structural and morphological properties of Al and Ga co-doped ZnO films grown by linear facing target sputtering. **Vacuum**, v. 101, n. 0, p. 250-256, 2014. ISSN 0042-207X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042207X13003230> > .

SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, v. 39, n. 5, p. 639-644, 2006. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996906000159> > .

SHAH, B.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Nanocapsular Dispersion of Thymol for Enhanced Dispersibility and Increased Antimicrobial Effectiveness against Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes in Model Food Systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 23, p. 8448-8453, 2012. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000310915300032 > .

SHEN, Y. et al. Solid-phase extraction of carotenoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 30, p. 5763-5768, 2009. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967309008723> > .

SHETTY, A. A. et al. Waste Utilization in Cucurbits: A Review. **Waste and Biomass Valorization**, v. 3, n. 3, p. 363-368, 2012. ISSN 1877-2641. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000209197100012 > .

SHI, X. et al. Effect of modifier on the composition and antioxidant activity of carotenoid extracts from pumpkin (*Cucurbita maxima*) by supercritical CO₂. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 2, p. 433-440, 2013. ISSN 0023-6438. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643812004513> > .

SILVA, E. B.; SILVA, E. S. **Aproveitamento integral de alimentos: avaliação sensorial de bolos com coprodutos da abóbora (*Cucurbita moschata*, L.)**. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável. 7: 11 p. 2012.

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, 2013. ISSN 1866-7910. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000326290900002 >.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. **Journal of Food Engineering**, v. 50, n. 3, p. 149-155, 2001. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877400002375> >.

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, 2013. ISSN 0023-6438. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364381300234X> >.

SOUZA, B. W. S. et al. Influence of electric fields on the structure of chitosan edible coatings. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 4, p. 330-335, 2010. ISSN 0268-005X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000274082200010 >.

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, 2011. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf1040405> >. Accessed on: 2014/08/12.

TARLADGIS, B. G. et al. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 37, n. 1, p. 44-48, 1960. ISSN 0003-021X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1960WW92700017 >.

TAVARES, C. A. M. Abóbora tetsukabuto. **Seed News, Pelotas**, n. 13, p. 24, 1999.

ÜNALAN, İ. U. et al. Application of active zein-based films with controlled release properties to control *Listeria monocytogenes* growth and lipid oxidation in fresh Kashar cheese. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 20, n. 0, p. 208-214, 2013. ISSN 1466-8564. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856413001306> >.

VANDERMEERSCH, T. et al. Environmental sustainability assessment of food waste valorization options. **Resources Conservation and Recycling**, v. 87, p. 57-64, 2014. ISSN 0921-3449. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000337775900006 >.

VIEIRA, J. A. B. R. **Valorization of Pumpkin Residue by Supercritical Extraction of Added-Value Compounds**. 2014. (Dissertação). Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

WAN, V. C. H.; KIM, M. S.; LEE, S. Y. Water vapor permeability and mechanical properties of soy protein isolate edible films composed of different plasticizer combinations. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 6, p. E387-E391, 2005. ISSN 0022-1147. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000231229100015 >.

WANG, S. et al. Fortification of dietary biopolymers-based packaging material with bioactive plant extracts. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 80-91, 2012. ISSN 0963-9969. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912002669 >.

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, 2013. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000312172800002 >.

ZINOVIADOU, K. G.; KOUTSOUMANIS, K. P.; BILIADERIS, C. G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. **Meat Science**, v. 82, n. 3, p. 338-345, 2009. ISSN 0309-1740. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174009000436 >.