



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

RENATO QUEIROZ ASSIS

FILMES ATIVOS À BASE DE ACETATO DE CELULOSE COM ADIÇÃO DE  
LICOPENO, NORBIXINA OU ZEAXANTINA

Porto Alegre

2021

RENATO QUEIROZ ASSIS

FILMES ATIVOS À BASE DE ACETATO DE CELULOSE COM ADIÇÃO DE  
LICOPENO, NORBIXINA OU ZEAXANTINA

Tese 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 Doutor em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Florencia Cladera Olivera

Co-orientador: Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Assis, Renato Queiroz

Filmes ativos à base de acetato de celulose com  
adição de licopeno, norbixina ou zeaxantina / Renato  
Queiroz Assis. -- 2021.

122 f.

Orientadora: Florencia Cladera Olivera Olivera.

Coorientador: Alessandro de Oliveira Rios.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de  
Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Acetato de celulose. 2. Embalagem ativa. 3.  
Carotenoides. 4. Atividade antioxidante. 5. Filmes  
biodegradáveis. I. Olivera, Florencia Cladera Olivera,  
orient. II. Rios, Alessandro de Oliveira, 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

Autor: Renato Queiroz Assis (Engenheiro de Alimentos – UFMT)

Título da tese: Filmes ativos à base de acetato de celulose com adição de licopeno, norbixina  
ou zeaxantina

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

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

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Florencia Cladera Olivera  
Orientadora  
Docente do Instituto de Ciência e  
Tecnologia de Alimentos  
PPGCTA/UFRGS

---

Prof. Dr. Eliseu Rodrigues  
Coordenador do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos  
PPGCTA/UFRGS

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Hickmann Flôres  
Diretora do Instituto de Ciência e  
Tecnologia de Alimentos  
ICTA/UFRGS

---

Banca: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elessandra da Rosa  
Zavareze  
Doutora em Engenharia e Ciência de  
Alimentos - FURG  
PPGCTA/UFPEL

---

Banca: Prof. Dr. Eliseu Rodrigues  
Doutor em Ciência de Alimentos -  
UNICAMP  
PPGCTA/UFRGS

---

Banca: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jordana Corralo Spada  
Doutora em Engenharia Química - UFRGS  
DEQUI/UFRGS

*Dedico este trabalho aos meus pais, Walter e Eleuza, e ao meu irmão Danilo. Obrigado por todo apoio, carinho, incentivo e compreensão.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre estar presente em minha vida, me guiar pelos melhores caminhos e me dar forças todos os dias.

Aos meus pais, Walter e Eleuza, meus maiores exemplos de força e persistência. Obrigado por nunca medirem esforços para que eu pudesse chegar cada vez mais longe. Principalmente por entender minha ausência durante esse período, ausência que era somente física pois sempre estavam comigo em pensamento e mandando energia positiva. Ao meu irmão Danilo, meu maior exemplo de força e superação, obrigado por sempre estar ao meu lado! Essa conquista é nossa! Amo vocês!

À minha orientadora Prof. Florencia Cladera Olivera, que aceitou me orientar nesse trabalho e me recebeu muito bem. Não tenho palavras para agradecer toda orientação e disponibilidade; principalmente por exercer além da função de orientadora e sempre me incentivar, compreender e confiar no meu trabalho.

Ao meu orientador Prof. Alessandro de Oliveira Rios, que aceitou a parceria desde o mestrado e sempre esteve disponível para alguns minutos de conversa. Sou muito grato por todo o conhecimento compartilhado, apoio, paciência e compreensão. Obrigado por me confiar esse trabalho desafiador e me apresentar o “mundo das embalagens”, área que aprendi a amar e fazer parte. Vou te seguir como exemplo de Prof. Muito obrigado!

À Prof. Simone Hickmann Flôres, que também faz parte dessa minha caminhada e que aceitou o desafio de me orientar lá no mestrado. Obrigado por todo incentivo, paciência, compreensão e ensinamentos compartilhados. E principalmente por sempre nos acolher muito bem no Lab. 211, vou levar comigo todo o aprendizado e sobretudo a parte da estatística (pois sempre me pergunto o que a Prof. vai achar da análise dos resultados). E uma vez orientadora, sempre orientadora!

À Prof. Polliana D’Angelo Rios, por todo suporte e contribuição para a realização desse trabalho.

Aos queridos amigos que fiz durante essa jornada, em especial: Médelin, Camila, Van, Carlos, Carol Assumpção, Alex Sandra, Mariel, Suiane e Natália. Muito obrigado por estarem ao meu lado, tornar a caminhada mais leve, ouvir meus desabafos, dividir conhecimentos e principalmente compartilhar bons momentos dentro e fora da área acadêmica. Do Laboratório 211 para a vida!

Aos amigos de sempre, Marcus, Isabel e Marco, pela amizade e incentivo, que mesmo longe sempre estiveram presentes durante esse tempo.

Aos colegas do laboratório 211, pela parceria, apoio, por dividir a bancada e principalmente o conhecimento.

Ao meu bolsista de iniciação científica, Anderson, por todo empenho e ajuda no desenvolvimento desse trabalho. Agradeço também ao Matheus Pechina, pela amizade e por sempre estar disponível para uma extração de carotenoides.

À UFRGS, ao PPGCTA e técnicos por todo suporte e contribuição para o desenvolvimento desse trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

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

À todos que de maneira direta ou indireta me auxiliaram.

**Muito obrigado!**

## RESUMO

O desenvolvimento de filmes a partir de diferentes biopolímeros vem sendo estudado para substituir ou diminuir o uso de polímeros sintéticos e embalagens plásticas convencionais, associado ao interesse de aumentar a estabilidade dos alimentos a partir da adição de compostos bioativos à matriz polimérica. Nesse contexto, o acetato de celulose foi utilizado para produzir filmes ativos com diferentes carotenoides (licopeno, norbixina e zeaxantina). Os filmes foram obtidos a partir da técnica de *casting* e avaliou-se a influência da incorporação de diferentes concentrações dos carotenoides (0,03%; 0,05% e 0,1% em relação ao peso do polímero seco) em suas propriedades. Independente do pigmento adicionado os filmes apresentaram espessura média de 0,0405 mm, com aspecto visual uniforme, flexível e cor variando entre amarelo e laranja. As concentrações de 0,05% e 0,1% de licopeno ou zeaxantina modificaram as propriedades mecânicas (aumento da resistência à tração e alongamento na ruptura) e conferiu maior barreira ao vapor de água. Este comportamento foi associado ao efeito plastificante à matriz polimérica e caráter hidrofóbico destes dois carotenoides, quando comparados à adição de norbixina. Contudo, a adição de 0,1% de todos os carotenoides proporcionou filmes com maior intensidade de cor, opacidade e barreira à transmissão de luz. Assim, a maior concentração (0,1%) para os três carotenoides foi a selecionada para a caracterização dos filmes. O efeito plastificante do licopeno e da zeaxantina à matriz polimérica também foi observado através da mudança da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). Além disso, todos os filmes ativos aumentaram a estabilidade oxidativa do óleo de girassol armazenado sob condições aceleradas para degradação, com destaque para a adição de norbixina que mostrou menor velocidade para a formação de produtos primários e secundários de oxidação. Os resultados obtidos mostraram que as condições de armazenamento (luz e temperatura) podem influenciar nos parâmetros cinéticos e de estabilidade dos antioxidantes naturais, assim como nas propriedades dos filmes. A estabilidade entre os carotenoides se deu na seguinte ordem: norbixina > licopeno > zeaxantina. A difusão dos antioxidantes para o simulante de alimentos (etanol 95%) foi modificada de acordo com a temperatura avaliada (25 °C e 40 °C), com liberação rápida e sustentada durante 10 dias em ambos os tratamentos. A elevada intensidade de cor dos filmes proporcionou maior barreira à fotodegradação e melhor estabilidade da riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>) quando armazenada sob alta intensidade de luz. O uso de acetato de celulose como polímero e a adição de carotenoides possibilitaram a obtenção de embalagens



biodegradáveis ativas com potencial aplicação para aumentar a vida útil de alimentos susceptíveis às reações de degradação induzidas por diferentes fatores.

**Palavras-chaves:** acetato de celulose; embalagem ativa; carotenoides; *casting*; liberação; atividade antioxidante; propriedades de barreira.

## ABSTRACT

The development of films from different biopolymers has been studied to replace or reduce the use of synthetic polymers and conventional plastic packaging, associated with the addition of bioactive compounds to the polymer matrix to increase food stability. In this context, cellulose acetate was used to produce active films with different carotenoids (lycopene, norbixin and zeaxanthin). The films were obtained using the *casting* technique and the influence of the incorporation of different concentrations of carotenoids (0.03 %, 0.05 % and 0.1 % in relation to the dry polymer weight) on their properties was evaluated. Regardless of the pigment added, the films had an average thickness of 0.0405 mm, with a uniform visual appearance, flexible and color ranging from yellow to orange. Concentrations of 0.05% and 0.1% of lycopene or zeaxanthin modified the mechanical properties (increased tensile strength and elongation at break) and provided a greater barrier to water vapor permeability. This behavior was associated with the plasticizer effect on the polymer matrix and hydrophobic character of these two carotenoids, when compared to the addition of norbixin. However, the addition of 0.1% of all carotenoids provided films with greater color intensity, opacity and barrier to light transmission. Thus, the highest concentration (0.1%) for the three carotenoids was selected for the characterization of the films. The plasticizing effect of lycopene and zeaxanthin to the polymeric matrix was also observed by changing the glass transition temperature ( $T_g$ ). In addition, all active films increased the oxidative stability of sunflower oil stored under accelerated conditions for degradation, with emphasis on the addition of norbixin, which showed lower speed for the formation of primary and secondary oxidation products. The results obtained showed that storage conditions (light and temperature) can influence the kinetic and stability parameters of natural antioxidants, as well as the properties of the films. The stability between the pigments has been described in the following order: norbixin > lycopene > zeaxanthin. The diffusion of antioxidants to the food simulant (95% ethanol) was modified according to the evaluated temperature (25 °C and 40 °C), with rapid and sustained release for 10 days in both treatments. The high color intensity of the films provided a greater barrier to photodegradation and better stability of riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) when stored under high light intensity. The use of cellulose acetate and the incorporation of carotenoids made it possible to obtain active biodegradable packaging with potential application to increase the shelf life of foods susceptible to degradation reactions induced by different factors.

**Keywords:** cellulose acetate; active packaging; carotenoids; *casting*; release; antioxidant activity; barrier properties.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1 – Processo de biossíntese de carotenoides: (1) dessaturação, (2) ciclização, (3) hidroxilação, (4) epoxidação e (5) rearranjo de epóxido.....	25
Figura 2 – Estrutura química da bixina (A) e da norbixina (B).....	27
Figura 3 – Estrutura química do licopeno. ....	27
Figura 4 – Estrutura química da zeaxantina. ....	28
Figura 5 – Mecanismos de formação e desativação do oxigênio singlete na presença de carotenoides.....	29
Figura 6 – Mecanismos de reação dos carotenoides com radicais: (a) adição do radical ao anel e (b) adição do radical à estrutura poliênica. ....	30
Figura 7 – Estrutura química da celulose. ....	36
Figura 8 – Estrutura do acetato de celulose e o grupo substituinte. ....	37

### CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 9 – Cuba para secagem dos filmes de acetato de celulose. ....	46
Figura 10 – Óleo de girassol armazenado em diferentes embalagens: sem embalagem (A), frasco plástico (B), polietileno de baixa densidade (C), filme controle (D), filme com 0,1 % de norbixina (E), filme com 0,1 % de zeaxantina (F) e filme com 0,1 % de licopeno (G).....	49
Figura 11 – Aparência do líquido simulante (etanol 95%) e filmes ao final da análise de migração sob temperatura de 25 °C. ....	51
Figura 12 – Avaliação da estabilidade de vitamina B2 em diferentes embalagens: (A) vidro, (B) filme controle, (C) filme com 0.1 % de zeaxantina, (D) filme com 0.1 % de licopeno e (E) filme com 0.1 % de norbixina.....	52

### CAPÍTULO III: ARTIGOS CIENTÍFICOS

#### **ARTIGO 1: Biodegradable packaging of cellulose acetate incorporated with norbixin, lycopene or zeaxanthin**

Figure 1. Cellulose acetate films with incorporated of different concentrations of norbixin, zeaxanthin or lycopene. ....	64
Figure 2. Light transmission of cellulose acetate films with norbixin (A), lycopene (B), and zeaxanthin (C).....	66

Figure 3. Thermogravimetric analysis TGA (A) and DTG (B) of cellulose acetate films incorporated with different carotenoids.....	68
Figure 4. DSC curves for cellulose acetate films: Control (A), 0.1% norbixin (B), 0.1% zeaxanthin (C) and 0.1% lycopene (D). .....	69
Figure 5. Dynamic mechanical thermal analysis: (a) E' (b) E'' (c) Tan delta.....	70
Figure 6. Scanning electron microscopy of the surface: (A) control film, (B) 0.1% NB, (C) 0.1%ZEA, (D) 0.1%LC films.....	72
Figure 7. Peroxide index of sunflower oil stored in different packaging.....	73
Figure 8. Color of the films: L* (A), a* (B), b* (C) during storage of sunflower oil and light transmission (D) at the end of storage.....	74
Figure 9. Conjugated dienes (a) and conjugated trienes (b) during storage of sunflower oil. .	75

**ARTIGO 2: Active food packaging of cellulose acetate: storage stability, protective effect on oxidation of riboflavin and release in food simulants**

Figure 1 – Retention of carotenoids in active cellulose acetate films under different storage conditions: (A) 25 °C and (B) 40 °C.....	90
Figure 2 – Color parameters of active cellulose acetate films under different storage conditions: 25 °C and 40 °C.....	93
Figure 3 – Mechanical properties of active cellulose acetate films under different storage conditions: 25 °C and 40 °C.....	96
Figure 4 – (A) Riboflavin stability during exposure to light and (B) light transmission through cellulose acetate films with different carotenoids. ....	97
Figure 5 – (A) Release of different carotenoids from the cellulose acetate films at 25 °C and (B) 40 °C in ethanol 95%.....	99
Figure S1 - Evaluation of the stability of vitamin B2 in different packages: (A) glass, (B) control film, (C) film with zeaxanthin, (D) film with lycopene, and (E) film with norbixin.....	106
Figure S2 - Cellulose acetate films and molecular structure of carotenoids: (A) control film, (B) film with norbixin, (C) film with lycopene, and (D) film with zeaxanthin.....	106

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

Tabela 1 – Biopolímeros, técnica e compostos bioativos utilizados para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis. ....34

### **CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS**

Tabela 2 – Parâmetros para quantificação dos carotenoides em espectrofotômetro. ....52

### **CAPÍTULO 3: ARTIGOS CIENTÍFICOS**

#### **ARTIGO 1: Biodegradable packaging of cellulose acetate incorporated with norbixin, lycopene or zeaxanthin**

Table 1. Mechanical properties (tensile strength and elongation at break) and water vapor permeability of the cellulose acetate films with different carotenoids. ....62

Table 2. Color analysis of biodegradable cellulose acetate films with the addition of different concentrations of norbixin, zeaxanthin, or lycopene. ....65

#### **ARTIGO 2: Active food packaging of cellulose acetate: storage stability, protective effect on oxidation of riboflavin and release in food simulants**

Table 1 – Reaction rate constants ( $k$ ) and half-life time ( $t_{1/2}$ ) values of degradation kinetics of carotenoid content in active cellulose acetate films under different storage conditions. ....91

### **CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS**

Tabela 3 – Caracterização das propriedades dos filmes selecionados: controle e com adição de 0,1 % de diferentes carotenoides. ....102

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	21
2.1 Objetivo geral .....	21
2.2 Objetivos específicos .....	21
<b>CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> ....	22
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	23
3.1 Carotenoides .....	23
Figura 1 – Processo.....	25
3.1.1 Norbixina, licopeno e zeaxantina: características e atividade antioxidante.....	26
Figura 2 – Estrutura .....	27
Figura 3 .....	27
Figura 4 .....	28
Figura 5 .....	29
3.2 Filmes biodegradáveis ativos.....	31
Tabela 1 – Biopolímeros, técnica .....	34
3.2.1 Celulose: biopolímero aplicado em filmes .....	36
3.2.2 Acetato de celulose: características e utilização em filmes biodegradáveis .....	37
<b>CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	42
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	43
4.1 Materiais .....	43
4.2 Extração de licopeno.....	44
4.3 Extração da bixina e conversão em norbixina .....	44
4.4 Extração de zeaxantina .....	45
4.5 Processo de obtenção dos filmes ativos à base de acetato de celulose .....	45
4.6 Caracterização dos filmes biodegradáveis .....	46
4.6.1 Espessura e propriedades mecânicas .....	46
4.6.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	46
4.6.3 Propriedades ópticas .....	47
4.6.3.1 Cor .....	47
4.6.3.2 Transmissão de luz.....	47
4.6.4 Propriedades morfológicas .....	48
4.6.5 Propriedades térmicas .....	48
4.6.6 Propriedades termomecânicas.....	48

4.6.7 Atividade antioxidante .....	48
4.6.7.1 Índice de peróxidos .....	49
4.6.7.2 Dienos e trienos conjugados .....	50
4.6.8 Ensaio de liberação dos antioxidantes naturais a partir dos filmes biodegradáveis ...	50
4.6.9 Estabilidade dos filmes durante o armazenamento .....	51
4.6.10 Avaliação da barreira à transmissão de luz através dos filmes: estabilidade de vitamina B <sub>2</sub> (riboflavina) durante o armazenamento sob condição controlada para degradação .....	52
4.7 Análise estatística .....	53
<b>CAPÍTULO 3: ARTIGOS CIENTÍFICOS</b> .....	54
<b>ARTIGO 1: Biodegradable packaging of cellulose acetate incorporated with norbixin, lycopene or zeaxanthin</b> .....	55
<b>Abstract</b> .....	55
<b>1. Introduction</b> .....	56
<b>2. Materials and methods</b> .....	57
2.1. Materials .....	57
2.2. Extraction of carotenoids .....	57
2.2.1 Norbixin .....	57
2.2.2 Lycopene .....	58
2.2.3 Zeaxanthin .....	58
2.3. Preparation of cellulose acetate films .....	58
2.4. Mechanical properties .....	59
2.5. Water vapor permeability (WVP) .....	59
2.6 Optical properties .....	60
2.7 Morphological properties .....	60
2.8 Thermal properties .....	60
2.9 Thermomechanical properties .....	60
2.10 Antioxidant activity: stability of the sunflower oil under oxidation conditions .....	61
2.11 Statistical analyses .....	61
<b>3. Results and discussion</b> .....	61
3.1 Mechanical properties and water vapor permeability .....	61
3.2 Optical properties .....	63
3.3 Selection of the better formulation of cellulose acetate film with carotenoids .....	66
3.4 Thermal properties .....	67
3.5 Differential scanning calorimetry (DSC) .....	68



3.6 Dynamic mechanical thermal analysis (DMA) .....	70
3.7 Scanning Electron Microscopy (SEM) .....	71
3.8 Antioxidant activity .....	72
<b>4. Conclusion</b> .....	<b>76</b>
<b>References</b> .....	<b>77</b>
<b>ARTIGO 2: Active food packaging of cellulose acetate: storage stability, protective effect on oxidation of riboflavin and release in food simulants</b> .....	<b>83</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>83</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>84</b>
<b>2. Materials and methods</b> .....	<b>85</b>
2.1 Materials .....	85
2.2. Obtaining natural antioxidants.....	85
2.2.1 Norbixin.....	85
2.2.2 Lycopene.....	86
2.2.3 Zeaxanthin .....	86
2.3. Production of active cellulose acetate films with different carotenoids .....	86
2.4 Stability of films during storage .....	87
2.5 Release of carotenoids in food simulants.....	88
2.6 Protective effect of active films on the oxidation of vitamin B <sub>2</sub> .....	88
2.7 Statistical analyses .....	89
<b>3. Results and discussion</b> .....	<b>89</b>
3.1 Stability of films under different storage conditions .....	89
3.1.1 Carotenoid content.....	89
Table 1 – Reaction rate constants ( <i>k</i> ) and half-life time ( <i>t</i> <sub>1/2</sub> ) values of degradation kinetics of carotenoid content in active cellulose acetate films under different storage conditions. 91	
3.1.2 Color .....	92
3.1.3 Mechanical properties.....	94
3.2 Protective effect of active films on stability of vitamin B <sub>2</sub> under light exposure.....	97
3.3 Release of carotenoids .....	98
<b>4. Conclusion</b> .....	<b>100</b>
<b>References</b> .....	<b>101</b>
<b>Supplementary material</b> .....	<b>106</b>
<b>CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>107</b>

<b>4 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	108
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	113
<b>6 PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	114
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	115

## 1 INTRODUÇÃO

Há um crescente interesse no estudo de polímeros para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis, que surge como uma alternativa para substituir parcialmente as embalagens tradicionais em algumas aplicações. Com o aumento do uso de materiais plásticos e o descarte inadequado, associado à formulação de produtos com menor concentração de aditivos sintéticos, há diversos estudos que avaliam a elaboração de embalagens biodegradáveis para alimentos com características semelhantes às convencionais, mas que atuem como carreadoras de compostos naturais (antioxidantes e/ou antimicrobianos). A incorporação desses aditivos apresenta interação e auxilia na manutenção da estabilidade dos alimentos, relacionada à demanda do mercado consumidor que busca produtos com maior qualidade desde a produção, armazenamento e consumo.

Filmes ou coberturas com antioxidantes naturais apresentam vantagens em relação à adição direta nos alimentos, como menor concentração a ser adicionada, liberação controlada ao longo do armazenamento e maior interação com a superfície do produto, uma vez que de modo geral as reações de deterioração tem início na superfície dos alimentos (BOLUMAR; ANDERSEN; ORLIEN, 2011; MARTINS; CERQUEIRA; VICENTE, 2012). Entre os diversos bioativos que podem ser utilizados encontram-se os carotenoides, classe de compostos que geralmente são avaliados para o uso como corantes naturais, como a norbixina, o licopeno e a zeaxantina.

A norbixina tem despertado o interesse de pesquisadores e da indústria de alimentos, encontrada somente em sementes de urucum (*Bixa orellana* L.). Este pigmento ainda é pouco avaliado como antioxidante natural e como aditivo para adição em embalagens ativas. O licopeno é um dos carotenoides mais conhecidos, encontrado em alta concentração em tomate (*Solanum lycopersicum*), seus derivados ou resíduos do processamento do mesmo (CATALKAYA; KAHVECI, 2019; NUNES; MERCADANTE, 2004; POOJARY; PASSAMONTI, 2015). Por sua vez, a zeaxantina é um dos principais pigmentos encontrados na mácula e que está relacionada ao efeito protetor contra a degeneração macular, sendo o goji berry (*Lycium barbarum* L.) uma das fontes com alta concentração e que pode ser utilizada para sua obtenção (FRATIANNI et al., 2018; LANDRUM; BONE, 2001; PEDRO et al., 2018).

Em relação aos biopolímeros utilizados como base para obtenção de filmes biodegradáveis, diversos materiais têm sido avaliados. A celulose tem recebido grande atenção relacionada à sua biodegradabilidade, fácil obtenção e modificação química (GONZÁLEZ et al., 2015; LÖBMANN; SVAGAN, 2017; WANG; JUNG; ZHAO, 2017). Um de seus derivados

é o acetato de celulose, polímero biodegradável e insolúvel em água, obtido através do processo de acetilação e que geralmente é estudado para o desenvolvimento de filmes com atividade antimicrobiana (DANNENBERG et al., 2017; DO SOCORRO ROCHA BASTOS et al., 2016; POLA et al., 2016). Entretanto, podem apresentar diferentes características quando comparados com as embalagens convencionais, como as propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água ou gás e estabilidade térmica. Contudo, algumas das vantagens é que são obtidos a partir de fontes renováveis e apresentam menor tempo para biodegradação.

Neste contexto, a norbixina, o licopeno e a zeaxantina podem representar excelentes antioxidantes naturais para adição em filmes biodegradáveis à base de acetato de celulose.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar filmes ativos à base de acetato de celulose com adição de licopeno, norbixina ou zeaxantina e avaliar sua potencial aplicação como embalagem para alimentos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obter os extratos contendo os carotenoides licopeno, norbixina e zeaxantina.
- Desenvolver filmes à base de acetato de celulose com diferentes concentrações dos carotenoides.
- Determinar as propriedades físico-químicas, mecânicas e de barreira dos filmes desenvolvidos.
- Avaliar a influência da concentração dos carotenoides sob o biopolímero utilizado nas propriedades físico-químicas, mecânicas e de barreira dos filmes desenvolvidos.
- Determinar a atividade antioxidante dos filmes que apresentaram as melhores características, através do armazenamento de óleo de girassol sob condições controladas para oxidação.
- Determinar a estabilidade dos carotenoides e a manutenção das propriedades dos filmes durante o armazenamento.
- Verificar a possível migração dos carotenoides a partir dos filmes de acetato celulose em simulante de alimentos lipídicos.
- Avaliar o efeito protetor à transmissão de luz ultravioleta-visível (UV-Vis) dos filmes ativos através da determinação da estabilidade de uma solução padrão de vitamina B<sub>2</sub> (Riboflavina).

## **CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

---

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O uso de polímeros para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis pode ser uma alternativa às embalagens não biodegradáveis, associado à adição de compostos antioxidantes naturais que podem atuar na manutenção da qualidade e estabilidade de alimentos durante o armazenamento. Diversos carotenoides têm sido avaliados para adição em filmes, sendo que a norbixina, o licopeno e a zeaxantina apresentam potencial aplicação como antioxidantes naturais. Para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis são utilizados polímeros obtidos a partir fontes renováveis e a celulose representa um biopolímero de fácil obtenção, baixo custo e que através da sua modificação química podem ser obtidos produtos derivados, como o acetato de celulose.

Nesta revisão bibliográfica será apresentada a fundamentação teórica utilizada no embasamento desta pesquisa, com uma visão geral sobre os carotenoides (norbixina, licopeno e zeaxantina), sua atividade antioxidante, utilização de biopolímeros no desenvolvimento de embalagens biodegradáveis e adição de compostos bioativos naturais.

#### 3.1 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis amplamente distribuídos na natureza e quem podem ser encontrados em plantas, micro-organismos, algas, alguns crustáceos, frutas e vegetais. Sua estrutura básica é obtida a partir da junção de oito unidades de isopreno, com cadeia linear e simétrica, chamados de tetraterpenos (C<sub>40</sub>). Estes compostos são responsáveis por conferir cor amarela, laranja ou vermelha, característica associada à presença de ligações duplas conjugadas ao longo de sua estrutura, chamada de cromóforo. A estrutura dos carotenoides além de conter o conjunto de ligações duplas conjugadas também podem apresentar diferenças em sua cadeia, como ciclização, hidrogenação, desidrogenação, encurtamento ou extensão, o que permite a obtenção de compostos com diferentes características (NAGARAJAN et al., 2017; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Os carotenoides são formados a partir da condensação de duas moléculas de geranyl-geranyl-difosfato, um precursor dos carotenoides que apresenta vinte átomos de carbono em sua estrutura. A partir da união dessas duas moléculas e a ação da enzima fitoeno sintase ocorre a formação do fitoeno, chamado de 15-*cis*-fitoeno, primeiro composto a ser formado na rota de biossíntese dos carotenoides. Com o processo de dessaturação e isomerização do fitoeno ocorre a formação do licopeno, com cadeia poliênica composta por 11 ligações duplas conjugadas,

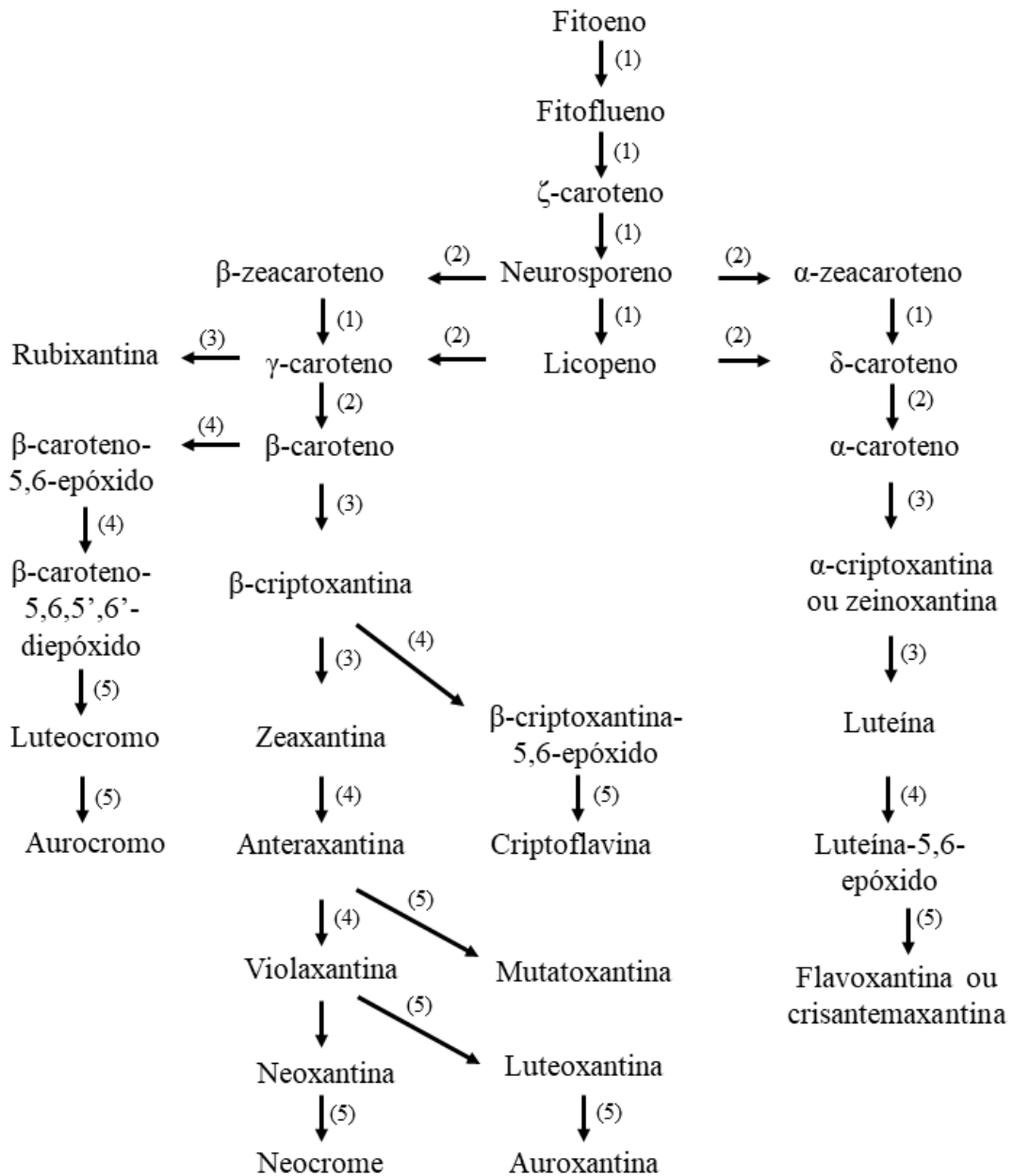
estrutura básica que dá origem aos diversos carotenoides após inúmeras etapas de rearranjo, hidroxilação, ciclização e epoxidação (Figura 1) (NAGARAJAN et al., 2017; RODRIGUEZ-CONCEPCION; STANGE, 2013; SHUMSKAYA; WURTZEL, 2013).

Os carotenoides apresentam absorção no espectro visível entre 400 nm e 500 nm, com três máximos de absorção, característica associada ao cromóforo que cada pigmento apresenta. A absorção em um comprimento de onda específico é utilizada como base para identificação e quantificação destes compostos, em que um aumento no número de ligações duplas conjugadas aumenta a banda de absorção (maior comprimento de onda) e faz com que o composto apresente maior intensidade da cor vermelha (CUTTRISS et al., 2011; NAGARAJAN et al., 2017; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Outra característica comum dos carotenoides é que são compostos de caráter hidrofóbico, com alta solubilidade em solventes orgânicos como clorofórmio, acetona e acetato de etila. De acordo com sua estrutura química esses pigmentos naturais podem ser classificados em dois grupos, os carotenos (estrutura composta apenas por carbono e hidrogênio) e as xantofilas (estrutura composta por carbono, hidrogênio e grupos funcionais oxigenados) (GOMES, 2007; REINHOLD; SCHWEIGGERT, 2016; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).



Figura 1 – Processo de biossíntese de carotenoides: (1) dessaturação, (2) ciclização, (3) hidroxilação, (4) epoxidação e (5) rearranjo de epóxido.



Fonte: Adaptado de Rodriguez-Amaya (2001)

Além de serem classificados em dois grandes grupos (carotenos e xantofilas), os carotenoides também podem ser divididos de acordo com sua funcionalidade: primários ou secundários. Quando classificados como compostos primários, os carotenoides são caracterizados por atuar diretamente na fotossíntese, como por exemplo o β-caroteno, zeaxantina e a luteína. Neste grupo os pigmentos são responsáveis pela transmissão de luz absorvida para a clorofila, necessária no processo fotossintético. Os carotenoides secundários

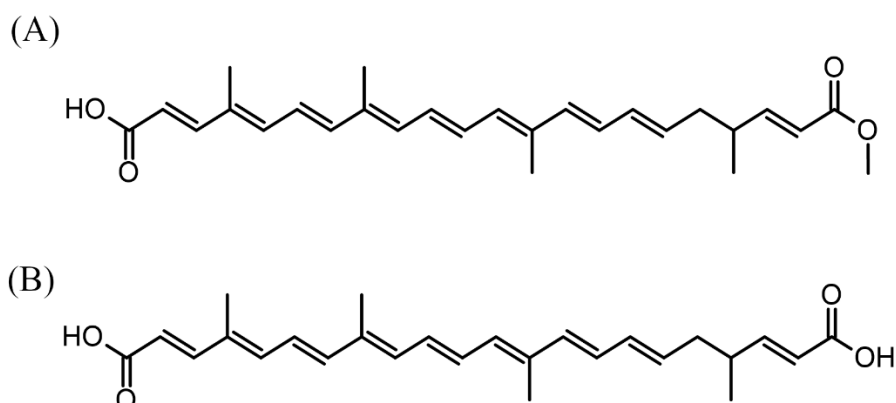
não estão diretamente relacionados a este processo, como o licopeno e o  $\alpha$ -caroteno, que exercem efeito antioxidante através da transferência de energia do oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) que pode ser formado durante a etapa de fotossíntese das plantas (AMORIM-CARRILHO et al., 2014; LERFALL, 2016; MATTEA; MARTÍN; COCERO, 2009; NAGARAJAN et al., 2017).

Os carotenoides desempenham diversas funções importantes, como pigmento acessório durante a fotossíntese, atividade de pró-vitamina A ( $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina) e de forma paralela podem apresentar atividade antioxidante e atuar como corante natural. Há um grande interesse no estudo e na aplicação destes compostos como antioxidantes e pigmentos naturais, associado à substituição de antioxidantes sintéticos artificiais geralmente utilizados pela indústria de alimentos. Existem diversos estudos que avaliam a extração, estabilidade, encapsulamento ou mesmo a adição de diferentes carotenoides em diversos produtos, como o licopeno,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, bixina, luteína e astaxantina (ASSIS et al., 2017, 2018; DA SILVA et al., 2016; KARABULUT, 2010; MONTERO et al., 2016; PAGNO et al., 2016; SIWACH; TOKAS; SETH, 2016). Contudo, ainda não há trabalhos disponíveis sobre a adição de norbixina, zeaxantina ou licopeno como antioxidantes naturais no desenvolvimento de filmes biodegradáveis ativos à base de acetato de celulose.

### 3.1.1 Norbixina, licopeno e zeaxantina: características e atividade antioxidante

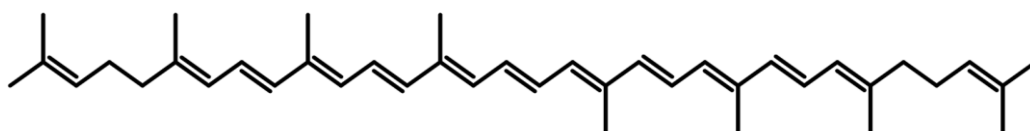
Entre os diferentes carotenoides encontra-se a norbixina ( $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_4$ ), pigmento obtido a partir da bixina e um dos responsáveis pela cor característica das sementes de *Bixa orellana* L., conhecida como urucum. A bixina ( $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_4$ ) é o principal pigmento encontrado na semente de urucum, geralmente denominada de *cis*-bixina e que corresponde aproximadamente a 80 % do conteúdo de carotenoides. A estrutura da bixina é composta por nove ligações duplas conjugadas capaz de conferir cor laranja e apresenta solubilidade em diversos solventes orgânicos (clorofórmio, éter de petróleo, etanol e acetato de etila), mas que pode ser convertida para sua forma *trans* devido à sua baixa estabilidade quando encontra-se em solução. A obtenção da norbixina é realizada através do processo de saponificação da bixina, o que proporciona a hidrólise do grupamento éster metílico na presença de uma base forte (NaOH ou KOH) e a obtenção do pigmento com solubilidade em água. Ao contrário da maioria dos carotenoides que apresentam estrutura básica  $\text{C}_{40}$ , a bixina e a norbixina apresentam cadeias menores, com 25 e 24 átomos de carbonos cada, respectivamente (Figura 2) (KOVARY et al., 2001; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; SANTOS et al., 2002; SCOTTER, 2009; SOLYMOSI et al., 2015).

Figura 2 – Estrutura química da bixina (A) e da norbixina (B).



Outro carotenoide de grande importância é o licopeno ( $C_{40}H_{56}$ ), um pigmento acíclico com estrutura simétrica composta por oito unidades de isopreno ligadas entre si e que apresenta 11 ligações duplas conjugadas e 2 ligações duplas não conjugadas (Figura 3). A presença desse conjunto de ligações, chamado de cromóforo, o torna capaz de absorver luz na região ultravioleta-visível (UV-Vis) e conferir cor vermelha às fontes deste carotenoide (CÁMARA et al., 2013; RANVEER, 2018).

Figura 3 – Estrutura química do licopeno.



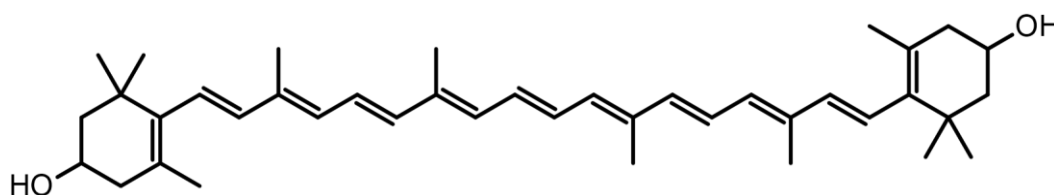
Assim como a maioria dos carotenoides, o licopeno não é solúvel em água, apresenta baixa solubilidade em etanol e metanol, mas alta solubilidade em solventes orgânicos como acetona, éter de petróleo e clorofórmio. Quando presente em uma solução de éter de petróleo ( $A_{1cm}^{1\%}$ : 3450) este pigmento apresenta espectro de absorção em comprimentos de onda mais elevado ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ : 444 nm, 470 nm e 502 nm), associado à presença do conjunto de 11 ligações duplas conjugadas (HADLEY; SCHWARTZ, 2004; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Uma das fontes mais conhecidas e que apresenta alta concentração de licopeno é o tomate, mas também pode ser encontrado em melancia, mamão e goiaba (NAGARAJAN et al., 2019; OBEROI; SOGI, 2017; SUWANARUANG, 2016). Este pigmento é normalmente encontrado em sua maior parte na forma *all-trans*, mas com o elevado número de ligações

duplas conjugadas em sua estrutura é capaz de se apresentar também na forma de *cis*-isômeros, principalmente quando exposto às reações de oxidação e isomerização como luz, altas temperaturas, oxigênio, ácidos e íons metálicos. A forma *cis* pode diminuir a termoestabilidade deste pigmento, que se apresenta na seguinte ordem: *all-trans* > *5-cis* > *9-cis* > *11-cis* > *13-cis* > *15-cis* > *7-cis*, em que essas formas de *cis*-isômeros são as mais conhecidas (PRASAD; MISHRA, 2014; RANVEER, 2018).

Por sua vez, a zeaxantina (Figura 4) é um dos principais pigmentos encontrados na macula ocular, como a luteína e meso-zeaxantina, que conferem uma coloração amarela típica dessa região da retina. A zeaxantina é um isômero da luteína, sendo carotenoides que apresentam estrutura C<sub>40</sub> básica, mas que diferem quanto à presença de grupos cíclicos na cadeia. A posição da dupla ligação no anel  $\epsilon$  diferencia a luteína do seu isômero, enquanto essa apresenta um anel  $\beta$ -ionona e outro  $\epsilon$ -ionona, a zeaxantina apresenta um anel  $\beta$ -ionona em cada extremidade. A mudança da posição da dupla ligação no anel faz com que a luteína apresente 10 ligações duplas conjugadas, enquanto a zeaxantina apresenta 11 ligações duplas conjugadas, pequena diferença no cromóforo que faz com que apresentem cores semelhantes ou que a diferença de cor seja sutil, mas que a mudança na estrutura pode alterar a reatividade da cadeia destes compostos (LANDRUM; BONE, 2001; SHEGOKAR; MITRI, 2012; SPARROW; KIM, 2010). Outra característica que contribui para a diferenciação destes dois pigmentos é a obtenção de formas isoméricas, em que a luteína pode apresentar 8 formas e a zeaxantina 3, relacionada a presença de centros quirais nos carbonos 3, 3' e 6' e nos carbonos 3 e 3' presentes em ambas cadeias poliênica, respectivamente (ABDEL-AAL et al., 2013; LANDRUM; BONE, 2001; STRAUB, 1987). Uma das fontes em que este pigmento pode ser encontrado em alta concentração é o *goji berry*, que tem sido avaliado para extração e obtenção com alto grau de pureza deste carotenoide (DE CAMPO et al., 2018; FRATIANNI et al., 2018; PEDRO et al., 2018).

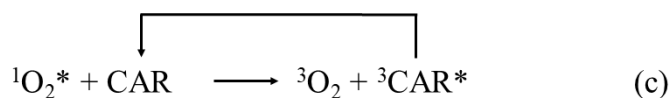
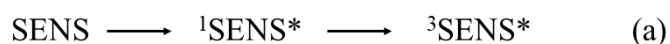
Figura 4 – Estrutura química da zeaxantina.



O licopeno, a norbixina e a zeaxantina, apesar de não apresentarem atividade pró-vitamina A, são caracterizados como pigmentos com atividade antioxidante. Essa característica

está associada ao conjunto de ligações duplas conjugadas presentes em sua estrutura, capazes de desativar espécies reativas de oxigênio (ROS), como o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ). Os ROS são gerados constantemente no organismo, mas uma superprodução e o acúmulo destes radicais pode levar ao estresse oxidativo, que podem reagir com enzimas, ácidos nucleicos, células e ácidos graxos presentes em membranas celulares (LERFALL, 2016). Um dos mecanismos para a formação do oxigênio singlete é através da fotoxidação, em que um sensitizer é capaz de absorver luz na região do visível e passar da sua forma estável ( $^1\text{SENS}^*$ ) para seu estado excitado ou triplete ( $^3\text{SENS}^*$ ) (Figura 5). Através da transferência de energia do sensitizer ( $^3\text{SENS}^*$ ) pode ocorrer a formação do oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), que passa do seu estado triplete estável ( $^3\text{O}_2$ ) para sua forma mais reativa. A desativação do oxigênio singlete por carotenoides, como a luteína e norbixina, ocorre através da transferência de energia entre o  $^1\text{O}_2$  e o carotenoide, com a formação do estado triplete estável do carotenoide ( $^3\text{CAR}^*$ ) e oxigênio ( $^3\text{O}_2$ ). Após a formação do  $^3\text{CAR}^*$ , este consegue retornar ao seu estado fundamental a partir da dissipação da energia através de interações rotacionais e vibratórias da sua cadeia poliênica (FOOTE; DENNY, 1968; KRINSKY, 1989; KRINSKY; JOHNSON, 2005; LERFALL, 2016).

Figura 5 – Mecanismos de formação e desativação do oxigênio singlete na presença de carotenoides.

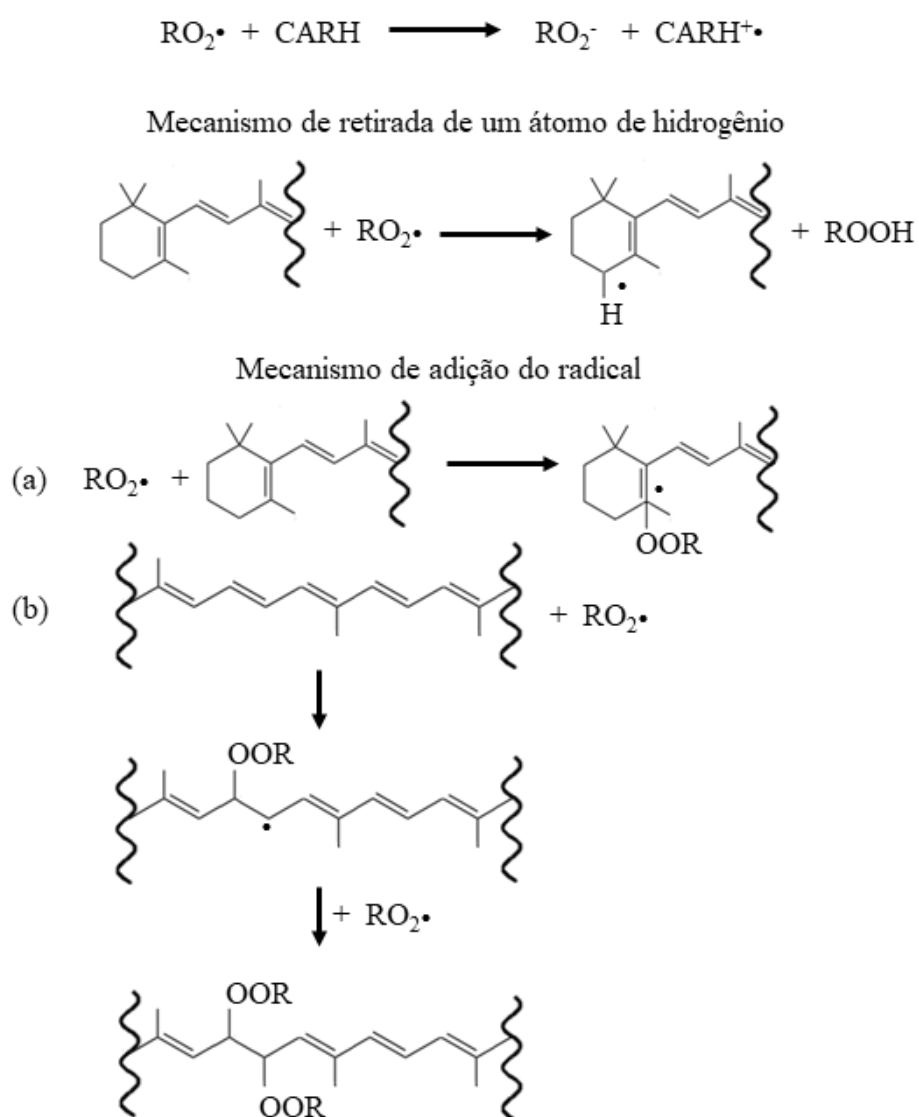


Fonte: Edge, Mcgarvey e Truscott (1997)

De um modo geral, o mecanismo de desativação de radicais por carotenoides pode ocorrer basicamente através da adição do radical à cadeia poliênica, transferência de elétron para o radical formado ou a retirada do hidrogênio presente na estrutura do antioxidante natural (Figura 6). A retirada do hidrogênio geralmente ocorre perto de uma ligação dupla, que são mais susceptíveis à reação com radicais, o que leva a formação e continuidade da propagação do radical. No mecanismo de adição do radical ( $\text{ROO}\cdot$ ) à cadeia poliênica ocorre a oxidação do carotenoide, com a formação de um radical inibidor e estabilizado por ressonância, que reage

facilmente com o oxigênio e leva a obtenção de um radical peroxila. Quando a geração de espécies radicais excede a taxa em que o antioxidante as remove, observa-se o processo de auto oxidação (CARDOSO, 1997; KONG et al., 2010; KRINSKY; JOHNSON, 2005; LERFALL, 2016; MONEGO; DA ROSA; DO NASCIMENTO, 2017; XAVIER; PÉREZ-GÁLVEZ, 2016).

Figura 6 – Mecanismos de reação dos carotenoides com radicais: (a) adição do radical ao anel e (b) adição do radical à estrutura poliênica.



Fonte: Adaptado de Xavier e Pérez-Gálvez (2016)

A presença de ligações duplas conjugadas na estrutura dos carotenoides faz com que estes pigmentos apresentem atividade antioxidante, mas também os tornam susceptíveis às

reações de oxidação e isomerização, o que pode diminuir sua estabilidade e aplicação em diferentes matrizes, assim como sua característica hidrofóbica.

### 3.2 Filmes biodegradáveis ativos

Os alimentos são tradicionalmente armazenados em embalagens plásticas, obtidas em sua maioria a partir de fontes não renováveis, como o petróleo. O aumento do uso deste material está relacionado a sua alta aplicabilidade em diferentes matrizes alimentares, baixa permeabilidade a gases, boas propriedades mecânicas (resistência à tração e alongamento na ruptura), baixo custo e fácil obtenção. A utilização de embalagens plásticas para a proteção de alimentos associada à adição de compostos químicos durante sua formulação (como antioxidantes e antimicrobianos) podem auxiliar na manutenção da estabilidade e da qualidade dos alimentos desde o transporte ao armazenamento.

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria do Plástico (ABIPLAST), os principais tipos de resinas plásticas mais consumidas são o polipropileno (PP) (21%), polícloreto de vinila (PVC) (13,6%), polietileno de alta densidade (PEAD) (12,7%), polietileno de baixa densidade linear (PEBDL) (11,8%), plástico reciclado (10,6%), polietileno de baixa densidade (PEBD) (8,8%); sendo que os principais setores consumidores de produtos plásticos são a construção civil (22,5%) e a indústria de alimentos (20,3%) (ABIPLAST, 2018).

Paralela à utilização de embalagens não biodegradáveis surge a maior preocupação aos impactos relacionados ao uso destes materiais. Em 2017 a ONU Meio Ambiente lançou no Brasil a campanha “Mares Limpos – O mar não está para plásticos”, que de acordo com um estudo recente, o alto consumo de embalagens plásticas junto com o descarte inadequado deste material, provocaria a possibilidade ter mais plásticos do que peixes no mar até 2050.

Outro problema relacionado aos impactos ambientais são os canudos plásticos, produto que geralmente não é reciclado e pode levar mais de cem anos para se degradar, que junto com as embalagens compõem os principais itens que cobrem os oceanos, em que se estima que até 13 milhões de toneladas de plásticos chegam aos mesmos (ONU, 2018). Associada ao menor uso de embalagens plásticas também se busca a diminuição do uso de produtos plásticos como os canudos, em que algumas cidades do Brasil estabeleceram leis que obrigam os estabelecimentos comerciais a utilizar canudos fabricados com produtos biodegradáveis, como o Rio de Janeiro (Lei número 1691 de 2015), Santa Catarina (Lei número 17.727 de 2019), São Paulo e Porto Alegre (Lei número 12.514 de 2019).

Desta forma, há o interesse no estudo de biopolímeros e obtenção de novas técnicas que auxiliem no desenvolvimento de embalagens biodegradáveis com características semelhantes às embalagens convencionais. Entre os diversos biopolímeros que são estudados, encontram-se os amidos (milho, mandioca e arroz), quitosana, gelatina, acetato de celulose, poliácido láctico (PLA), metilcelulose, entre outros (Tabela 1), utilizados de forma isolada ou em combinação para o desenvolvimento de filmes com características específicas.

Os filmes biodegradáveis geralmente são obtidos através da técnica de *casting* ou mistura dos biopolímeros com plastificantes e termoprensagem do material ou extrusão. A primeira técnica se baseia na solubilização do biopolímero em um solvente adequado para obtenção da solução filmogênica, como por exemplo a solubilização e gelatinização do amido em água, vertida em placas e submetida à secagem para evaporação do solvente (PIÑEROS-HERNANDEZ et al., 2017; SELIGRA et al., 2016; VARGAS et al., 2017). Já na técnica de termoprensagem, os biopolímeros são submetidos à câmara de mistura para homogeneização do material, sob temperatura, tempo e rotação controlados. Após essa etapa, o produto obtido é triturado e moldado em películas finas através de um sistema de compressão com controle de temperatura e pressão (ARRIETA et al., 2013; MÜLLER et al., 2016; ORTEGA-TORO et al., 2015).

Os filmes biodegradáveis além de apresentar as funções básicas também podem atuar como carreadores de compostos ativos, sendo neste caso chamados de embalagens ativas. Esse tipo de embalagem apresenta interação desejável com o alimento ou ambiente ao redor para aumentar a segurança e vida útil (BRASIL, 2001), não atuando apenas como uma barreira inerte entre o alimento e o ambiente. Ao considerar o uso de compostos bioativos para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis ativos, há diversos trabalhos que avaliam a adição destes compostos em sua forma livre, encapsulados ou mesmo a adição de produtos que tenham esses compostos em sua composição, como a adição de extratos, óleos essenciais, farinhas ou resíduos obtidos do processamento de alimentos (Tabela 1).

A adição de compostos naturais, como antioxidantes ou antimicrobianos, pode ser uma alternativa ao uso de aditivos sintéticos e a menor adição destes compostos na formulação de alimentos. Filmes e coberturas antioxidantes podem auxiliar na estabilidade à oxidação lipídica (PAGNO et al., 2016; PHOOPURITHAM et al., 2012; REIS et al., 2015), enquanto filmes com adição de compostos antimicrobianos podem atuar como barreira ao desenvolvimento de microorganismos patogênicos e deteriorantes (DANNENBERG et al., 2017; POLA et al., 2016; SÁNCHEZ-ORTEGA et al., 2016; SANCHÍS et al., 2016), principais problemas relacionados a qualidade e estabilidade de alimentos.



Estudos demonstram que filmes biodegradáveis com adição de compostos bioativos, como antioxidantes naturais, são capazes de apresentar maior atividade antioxidante e barreira à transmissão de luz UV-Visível de acordo com o aumento da concentração do aditivo adicionado. Outra vantagem, é que apresentam migração controlada ao longo do armazenamento, o que auxilia no aumento da vida útil, manutenção da qualidade e estabilidade à oxidação lipídica (MARTINS; CERQUEIRA; VICENTE, 2012; NORONHA et al., 2014; PAGNO et al., 2016).

As características dos filmes biodegradáveis são dependentes do método de obtenção, concentração do biopolímero e aditivos utilizados, como a adição de agentes plastificantes para obtenção de filmes com melhores propriedades mecânicas (MALI et al., 2008; SOUZA et al., 2012). A adição de compostos bioativos também pode modificar as propriedades dos filmes, resultado da compatibilidade do aditivo com a matriz polimérica, como a estrutura na formação dos filmes, permeabilidade ao vapor de água, propriedades mecânicas (resistência à tração, alongamento e módulo de elasticidade), espessura, propriedades ópticas, biodegradabilidade, estabilidade térmica e atividade antioxidante/antimicrobiana (BARBOSA-PEREIRA et al., 2013; MEDINA JARAMILLO et al., 2016; MURIEL-GALET et al., 2015; SOUZA et al., 2012).

A caracterização das propriedades dos filmes é de grande importância, capaz de estabelecer os requisitos necessários para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis e a sua potencial aplicação como embalagem de acordo com as características dos alimentos que se pretende armazenar. Para desenvolvimento deste estudo serão utilizados o acetato de celulose e nanocristais de celulose, escolha relacionada à boa capacidade de formar filmes com estrutura contínua, caráter hidrofóbico destes materiais e fácil obtenção, em que muitas vezes o fator limitante para aplicação de filmes biodegradáveis obtidos a partir de biopolímeros hidrofílicos é a alta solubilidade ou afinidade com água. Assim, a utilização destes materiais pode auxiliar e ampliar o uso destes filmes biodegradáveis como embalagem para diferentes alimentos.

Tabela 1 – Biopolímeros, técnica e compostos bioativos utilizados para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis.

<b>Biopolímero</b>	<b>Técnica de obtenção</b>	<b>Composto bioativo</b>	<b>Espessura (mm)</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referência</b>
Acetato de celulose	<i>Casting</i>	Nanosuspensão de curcumina	0,038 – 0,042	-	Carvalho et al. (2017)
Acetato de celulose	<i>Casting</i>	Óleo essencial de orégano	0,046	-	Pola et al.(2016)
Amido de mandioca	<i>Casting</i>	Extrato de erva-mate e polpa de manga	0,111 – 0,125	Óleo de palma	Reis et al. (2015)
Amido de mandioca	<i>Casting</i>	Nanocápsulas de bixina	0,085 – 0,125	Óleo de girassol	Pagno et al. (2016)
Amido de mandioca	<i>Casting</i>	Óleo essencial de orégano	0,124 – 0,193	-	Caetano et al. (2018)
Amido de banana	<i>Casting</i>	Micropartículas lipídicas sólidas com ácido ascórbico	0,088 – 0,099	-	Sartori e Menegalli (2016)
Amido de mandioca	<i>Casting</i>	Microcápsulas de antocianinas	0,338	Sachê para azeite de oliva	Stoll et al. (2017)
Amido de milho	<i>Casting</i>	Óleo essencial	0,151 – 0,247	-	Ghasemlou et al. (2013)
Amido e quitosana	Compressão	Óleos essenciais de orégano e canela	0,055 – 0,221	Carne de porco	Valencia-Sullca et al. (2017)
Carboximetil celulose e álcool polivinílico	<i>Casting</i>	Óleo de cravo	-	Carne de frango	Muppalla et al. (2014)

“Continua”

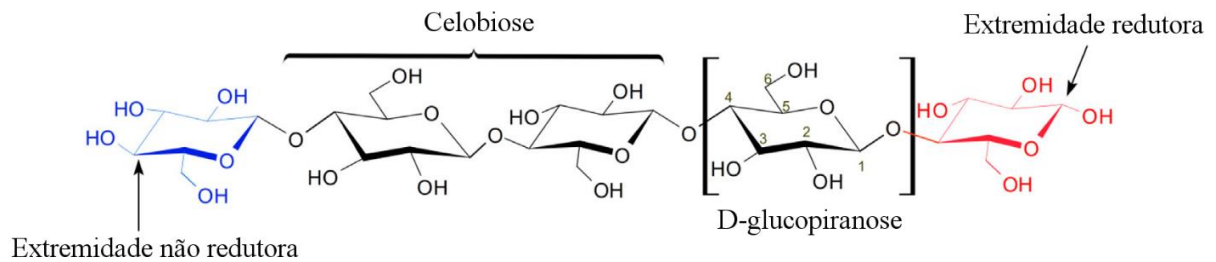
Tabela 1 - Biopolímeros, técnica e compostos bioativos utilizados para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis. “Continuação”

<b>Biopolímero</b>	<b>Técnica de obtenção</b>	<b>Composto bioativo</b>	<b>Espessura (mm)</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referência</b>
Concentrado de proteína de soja	Compressão	Extrato de uva vermelha	0,126 - 0,137	-	Ciannamea et al. (2016)
Gelatina	<i>Casting</i>	Resíduos de beterraba minimamente processada	0,133 - 0,267	Óleo de girassol	Iahnke et al. (2016)
Gelatina	<i>Casting</i>	Extrato de chá verde	0,200	-	Giménez et al (2013)
Gelatina	<i>Casting</i>	Óleos essenciais de orégano e lavanda	0,07 – 0,13	-	Martucci et al. (2015)
Metilcelulose	<i>Casting</i>	Nanocápsulas de $\alpha$ -tocoferol	0,039 - 0,061	-	Noronha et al. (2014)
Poliácido láctico (PLA)	Compressão	Extrato de semente de toranja	0,066 - 68,7	-	Wang e Rhim (2016)
Poliácido láctico (PLA) e amido	Compressão	Óleo essencial de canela	0,077 - 0,205	-	Muller et al. (2017)
Poliácido láctico (PLA)	Compressão	$\alpha$ -tocoferol e resveratrol	0,150 - 0,200	-	Hwang et al.(2012)
Poliácido láctico (PLA)	<i>Casting</i>	Carotenoides	0,121 - 0,138	-	Stoll et al. (2019)
Quitosana	<i>Casting</i>	Extrato de bagaço de uva	0,039–0,057	-	Ferreira et al. (2014)
Quitosana	<i>Casting</i>	Curcumina	0,077 – 0,084	-	Liu et al. (2016)
Quitosana	<i>Casting</i>	Extrato de chá verde	0,062	-	Siripatrawan et al. (2010)

### 3.2.1 Celulose: biopolímero aplicado em filmes

A celulose é um importante componente estrutural da parede celular de plantas e vegetais, um polímero natural, renovável, biodegradável e de fácil obtenção. É um homopolissacarídeo de alta massa molar e estrutura química composta por unidades de glicose ligadas entre si através de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (Figura 7), cuja unidade de repetição são duas moléculas de glicose ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub>, em que *n* é dependente da fonte utilizada para sua obtenção (*n* = 10000 a 15000) (HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010; KLEMM et al., 2005; MOON et al., 2011). As unidades de repetição são chamadas de celobiose e apresentam uma simetria química específica, uma extremidade da estrutura é chamada de redutora (unidade hemiacetal não substituído) e a outra extremidade é chamada de não redutora (grupo hidroxila no C4). Os grupos hidroxilas presentes ao longo da cadeia (posições C2, C3 e C6) permitem a formação de pontes de hidrogênio intramolecular e intermolecular, capazes de conferir à molécula de celulose uma estrutura altamente organizada (HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010; POTULSKI et al., 2014).

Figura 7 – Estrutura química da celulose.



Fonte: Trache et al. (2016)

A cadeia de celulose está na forma de um conjunto de fibras que se organizam de forma hierárquica para formar o conjunto de microfibrilas, que por sua vez são constituídas por fibrilas elementares. A organização química das fibrilas elementares apresenta característica típica dessa região, que relacionada à presença de grupos hidroxilas (que permitem a formação de ligações de hidrogênio) e à interação através de ligações mais simples entre as moléculas de glicose, faz com que sua estrutura seja formada por regiões cristalinas (altamente ordenada) e

amorfas (região desordenada) (BRINCHI et al., 2013; HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010; MOON et al., 2011).

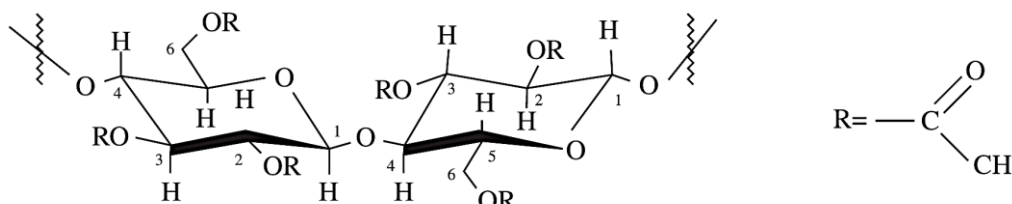
A celulose tem recebido grande atenção devido à sua biodegradabilidade, fácil obtenção, modificação química ou mesmo para obtenção de produtos derivados, que apresentam características específicas para aplicação em diferentes áreas. A celulose pode ser utilizada para adição ou obtenção de filmes ou membranas, como agentes encapsulantes ou entrega de medicamentos (LÖBMANN; SVAGAN, 2017; WANG; JUNG; ZHAO, 2017), aplicação de microcristais ou nanocristais de celulose como aditivo de reforço em embalagens (GONZÁLEZ et al., 2015; HUQ et al., 2012) e como a aplicação de acetato de celulose no desenvolvimento de filmes biodegradáveis (DANNENBERG et al., 2017; POLA et al., 2016).

### 3.2.2 Acetato de celulose: características e utilização em filmes biodegradáveis

O acetato de celulose é um biopolímero que pode ser utilizado para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis (Tabela 1). O acetato de celulose possui melhores características do que a celulose e possibilita o uso sob diferentes formas, como o desenvolvimento de filmes biodegradáveis, coberturas ou membranas (CANDIDO; GODOY; GONÇALVES, 2017; EDGAR BUCHANAN et al., 2001; POLA et al., 2016; RUDAZ; BUDTOVA, 2013; WAN DAUD; DJUNED, 2015).

O acetato de celulose é obtido através do processo de acetilação da celulose (Figura 8), através do uso de solventes como o anidrido acético (agente acetilante), ácido acético (agente de diluição) e ácido sulfúrico (agente catalisador) (EDGAR BUCHANAN et al., 2001; FISCHER et al., 2008).

Figura 8 – Estrutura do acetato de celulose e o grupo substituinte.



Fonte: Cerqueira et al. (2010)

Durante o processo de acetilação ocorre a modificação da estrutura da celulose através da substituição de alguns grupamentos hidroxila por grupos acetila, o que leva a obtenção de um produto derivado com características diferentes do biopolímero do qual é obtido. O grau de

substituição determina o número médio de grupos hidroxila que foram substituídos, com número máximo de substituição de 3 (GILBERT, 2017). A inserção de grupos acetilas na estrutura da celulose pode conferir a solubilidade em diferentes solventes, como a água (grau de substituição próximo de 1), tetrahidrofurano e acetona (grau de substituição próximo de 2) ou diclorometano e clorofórmio (grau de substituição próximo de 3) (CANDIDO; GODOY; GONÇALVES, 2017; CARVALHO et al., 2017; CERQUEIRA et al., 2010; HEINZE; LIEBERT, 2004).

De Freitas et al. (2017) avaliaram a obtenção de acetato de celulose com diferentes graus de substituição (1,48 – 2,48). Quando caracterizados através da análise de calorimetria de varredura diferencial (DSC) todas as amostras apresentaram eventos térmicos semelhantes, com um pico endotérmico variando entre 77,5 e 91,1 °C. Este comportamento foi relacionado à presença de água residual, em que quanto menor foi grau de substituição do polímero maior a temperatura de dessorção das amostras, associada à maior presença de grupos hidroxilas e interação com as moléculas de água. O acetato de celulose com grau de substituição de 2,48 apresentou temperatura de transição vítrea próxima de 221 °C, semelhante à encontrada para os outros polímeros (223 °C – 224 °C) e com temperatura de fusão também próximas (248 °C – 250 °C). Quando avaliados através de análise térmica mecânica dinâmica (DMA) foi observado que o grau de substituição pode modificar o comportamento mecânico em função da temperatura, em que o polímero com grau de substituição de 2,48 apresentou menor módulo de armazenamento ( $E'$ ) e módulo de perda ( $E''$ ) quando comparado com o polímero com grau de substituição de 2,29, por exemplo. A diferença pode estar relacionada à quantidade de grupos hidroxilas presentes nas amostras, que pode favorecer a presença de pontes de hidrogênio, interação intermolecular e obtenção de um material mais rígido.

Filmes biodegradáveis de acetato de celulose geralmente são obtidos através da técnica de *casting*, a partir da solubilização do biopolímero em acetona. Este material é capaz de conferir a obtenção de filmes finos, com estrutura contínua, característica hidrofóbica, elevada transparência, baixa opacidade e baixa elasticidade, características dependentes da quantidade do biopolímero utilizada, espessura, adição de agentes plastificantes ou compostos bioativos (CARVALHO et al., 2017; DANNENBERG et al., 2017; GOUVÊA et al., 2015; POLA et al., 2016).

Diversos estudos avaliam o desenvolvimento e a aplicação de filmes biodegradáveis de acetato de celulose com adição de antioxidantes ou antimicrobianos naturais para a manutenção da qualidade e estabilidade dos alimentos durante um armazenamento prolongado. No desenvolvimento de filmes ativos a partir deste biopolímero pela técnica de *casting*,

Carvalho et al. (2017) avaliaram a adição de 1% de nanosuspensão de curcumina ou solução de curcumina livre. Não houve diferença no parâmetro de cor em relação à forma de adição do antioxidante, com a obtenção de filmes com coloração amarela e maior opacidade quando comparados ao filme controle. A técnica utilizada proporcionou a obtenção de filmes com espessura entre 38  $\mu\text{m}$  - 42  $\mu\text{m}$ , mas a adição do aditivo levou à redução da resistência à tração e alongamento na ruptura, de  $65,0 \pm 3,3$  MPa para  $54,5 \pm 2,8$  MPa e de  $15,3 \pm 4,2$  % para  $6,7 \pm 1,2$  %, para o filme controle e filme com adição de curcumina livre, respectivamente. De acordo com os autores a redução das propriedades mecânicas possivelmente está relacionada com a menor interação do aditivo com a matriz polimérica. O perfil de migração foi semelhante para os filmes com adição de curcumina em nanosuspensão ou não, com maior migração na primeira semana e perfil de migração estável ao final do estudo, de aproximadamente 0,13 % e 0,14 % ao longo de 22 dias para o ensaio com óleo de soja, respectivamente. Os resultados demonstraram que este biopolímero pode ser uma alternativa para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis, com liberação do aditivo ao longo do estudo e a obtenção de embalagens ativas.

Pola et al. (2016) avaliaram o desenvolvimento de filmes de acetato de celulose com atividade antimicrobiana através da adição de óleo essencial de orégano e montmorillonita, obtidos pela solubilização do biopolímero (grau de substituição 2,5) em acetona. A adição de óleo essencial de orégano (20, 40 ou 60%) proporcionou melhor distribuição da montmorillonita na matriz polimérica quando comparado ao filme com adição somente do segundo aditivo, resultado da diminuição da interação entre as cadeias da matriz pela presença do óleo. A adição destes aditivos não modificou a espessura dos filmes quando comparado ao filme controle, com espessura média de  $46,37 \pm 3,47$   $\mu\text{m}$ . Contudo, a adição do óleo essencial promoveu um efeito plastificante à matriz, associado à menor interação intermolecular da matriz e aumento da flexibilidade dos filmes, diminuição da resistência à tração e módulo de elasticidade. Efeito não observado nos filmes com adição apenas de montmorillonita, que apresentaram propriedades mecânicas semelhantes ao filme controle. Relacionado ao caráter hidrofóbico e menor interação com as moléculas de água, o óleo essencial diminuiu a permeabilidade ao vapor de água através dos filmes, resultado não encontrado para adição de montmorillonita. Com o aumento da concentração do óleo essencial de orégano houve uma maior atividade antimicrobiana para os micro-organismos avaliados (*A. alternata*, *R. stolonifer* e *G. candidum*), que demonstra potencial desenvolvimento e aplicação de filmes biodegradáveis como embalagens de alimentos e prevenir o crescimento de micro-organismos patogênicos.

Do Socorro et al. (2016) avaliaram a adição de três óleos essenciais (manjeriço, alecrim e capim-limão) no desenvolvimento de filmes biodegradáveis a partir de acetato de celulose. A adição dos óleos essenciais levou à diminuição significativa da permeabilidade ao vapor de água através dos filmes, resultado do efeito sinérgico da característica hidrofóbica do biopolímero e dos aditivos adicionados, com permeabilidade entre  $0,624 \pm 0,02 \text{ gm}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  e  $0,254 \pm 0,05 \text{ gm}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ , para o filme controle e filme com adição de 20 % de óleo essencial de alecrim, respectivamente. Os filmes com adição da maior concentração dos óleos essenciais (20 %) apresentaram maior opacidade, elasticidade e diminuição do módulo de elasticidade (3 e 25%), modificação das propriedades mecânicas relacionadas ao efeito plastificante dos aditivos adicionados à matriz polimérica e à obtenção de estrutura com maior uniformidade quando comparados ao filme controle. O biopolímero proporcionou a obtenção de filmes termicamente estáveis, com estágios de perda de massa características ao longo da taxa de aquecimento e volatilização dos óleos essenciais em temperatura de aproximadamente 150 °C. A adição de óleos essenciais proporcionou a obtenção de filmes com melhor flexibilidade, menor permeabilidade ao vapor de água e transparência, características que podem ser desejáveis para o desenvolvimento de embalagens ativas para alimentos.

A partir da solubilização de acetato de celulose em acetona e adição de óleo essencial de pimenta rosa, Dannenberg et al. (2017) desenvolveram filmes ativos para o armazenamento de queijo muçarela. De acordo com o aumento da concentração do óleo essencial adicionado os filmes apresentaram maior zona de inibição para *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. aureus*, com maior efeito sobre o último micro-organismo. Todas as concentrações de óleo essencial adicionando nos filmes (2 %, 4% e 6%) apresentaram efeito antimicrobiano no armazenamento de muçarela durante 12 dias (4 °C) contra os micro-organismos citados acima, com redução da contagem de células viáveis durante o estudo. Para *S. aureus* e *L. monocytogenes* houve um maior efeito antimicrobiano para o filme com maior concentração do aditivo (6 %), não detectada sua sobrevivência após o contato com o filme e no segundo dia de análise, respectivamente. Efeito não observado para *E. coli*, contudo, houve uma maior atividade antimicrobiana sobre a contagem de células viáveis para o filme com adição de 6 % de óleo essencial quando comparado ao filme controle.

De acordo com os trabalhos citados acima, o acetato de celulose pode ser utilizado para formação de uma matriz contínua, obtenção de filmes biodegradáveis e atuar como carreador de compostos bioativos, além da sua característica intrínseca de insolubilidade em água. Contudo, ainda não há muitos trabalhos disponíveis sobre o desenvolvimento de filmes à base deste biopolímero com adição de antioxidantes naturais, pois geralmente são avaliados



para a adição de óleos essenciais e obtenção de embalagens com atividade antimicrobiana. Assim, a adição de norbixina, licopeno ou zeaxantina, carotenoides que apresentam alta atividade antioxidante, pode representar uma alternativa interessante para obtenção de filmes biodegradáveis ativos.

## **CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Compostos Bioativos, localizado no 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), enquanto as análises térmicas e termomecânicas foram realizadas no Laboratório de Materiais Poliméricos (LaPol), ambos localizados na UFRGS. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, com as seguintes purezas:

- Acetato de etila: 99,9%
- Acetona: 99,5%
- Ácido acético glacial: 99,7%
- Álcool etílico: 95%
- Clorofórmio: 99,8%
- Dimetilformamida: 100%
- Éter de petróleo: 100%
- Éter etílico: 98%
- Fosfato de potássio: 100%
- Hexano: 100%
- Hidróxido de potássio: 85%
- Iodeto de potássio: 100%
- Isooctano: 100%
- Metanol: 99,8 %
- Tiosulfato de sódio: 100%

### 4.1 Materiais

As sementes de urucum, tomates, *goji berry*, óleo de girassol sem adição de antioxidantes sintéticos foram obtidos no comércio local de Porto Alegre – RS. Para o desenvolvimento dos filmes biodegradáveis foi utilizado o acetato de celulose (GS = 2,5; MM= 2024000  $\text{g mol}^{-1}$ ) fornecido gentilmente pela empresa Rhodia Acetow Brasil (Santo André – SP, Brasil). Todos os demais solventes utilizados foram de grau analítico.

## 4.2 Extração de licopeno

O licopeno foi obtido a partir de tomates, em que amostras foram separadas das sementes, cortadas em pedaços pequenos (600 g) e submetidas à extração com acetato de etila (1000 mL). O pigmento foi obtido com duas extrações sob agitação mecânica (Fisatom, 400 rpm, São Paulo, Brasil) durante 2 h cada. Após a obtenção o extrato foi filtrado, concentrado sob pressão reduzida em um rotaevaporador (Fisatom modelo 801/802, São Paulo, Brasil), transferido para um frasco âmbar para secagem em nitrogênio e armazenado em freezer (-18 °C) até o uso (Nunes e Mercadante, 2004).

## 4.3 Extração da bixina e conversão em norbixina

A bixina foi extraída a partir das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) e a norbixina obtida a partir da saponificação do extrato contendo o primeiro pigmento. As sementes (25 g) foram submetidas a duas extrações consecutivas com 50 mL de hexano durante 15 minutos cada. O extrato obtido contendo lipídeos que foram extraídos da amostra foi filtrado e descartado. Após as extrações anteriores as sementes foram adicionadas de metanol (50 mL) para remoção de compostos polares e o processo realizado duas vezes durante 15 minutos cada. O extrato obtido em cada etapa foi filtrado, descartado e as sementes remanescentes das extrações anteriores foram adicionadas de acetato de etila (50 mL) para extração da bixina. Todas as etapas foram realizadas sob agitação magnética (15 minutos). O extrato final foi filtrado e seco em um rotaevaporador sob pressão reduzida ( $T < 30$  °C) (Fisatom modelo 801/802, São Paulo, Brasil). Para a obtenção dos sais de norbixina, 50 mL de solução metanólica de hidróxido de potássio (10% m/v) foram adicionados ao balão contendo o extrato seco, o qual foi armazenado durante 12 horas ao abrigo da luz e a temperatura ambiente (~25°C). Após esse período o extrato foi transferido para um funil de separação contendo 50 mL de água destilada, 50 mL de éter etílico e 50 mL de acetato de etila. O pH da solução obtida no funil de separação foi ajustado para o pH 3,5 através da adição de ácido acético glacial, com a transferência da norbixina para fase a superior contendo os solventes. Em seguida o extrato foi submetido a sucessivas lavagens com água destilada até pH 6,0, com posterior secagem do extrato em um rotaevaporador e armazenamento em freezer (-18 °C) até o uso (RIOS; MERCADANTE, 2004).

#### 4.4 Extração de zeaxantina

O *goji berry* foi utilizado para a obtenção da zeaxantina, por ser uma matriz rica neste pigmento. Aproximadamente 1 g de amostra foi adicionada em tubos falcon e o pigmento extraído com acetona gelada (20 mL) sob homogeneização em Ultra Turrax (IKA Ultra Turrax® digital, modelo T25, Staufen, Alemanha) durante 30 segundos a 7000 rpm. A extração foi realizada até completa remoção do carotenoide da amostra (ausência de cor no solvente extrator). O solvente de extração foi filtrado após cada etapa e o extrato final obtido foi concentrado em rotaevaporador (Fisatom modelo 801/802, São Paulo, Brasil), transferido para um frasco âmbar para secagem em nitrogênio e armazenado em freezer (-18 °C) até o uso (DE CAMPO et al., 2019).

#### 4.5 Processo de obtenção dos filmes ativos à base de acetato de celulose

Os filmes foram obtidos através da técnica de *casting*, com a completa solubilização do biopolímero em acetona (3 g de acetato de celulose/100 mL) durante 4 horas sob agitação magnética. Os carotenoides (licopeno, norbixina ou zeaxantina) foram adicionados na concentração 0,03%, 0,05% e 0,1% (em relação à massa do polímero) e a solução foi mantida sob agitação durante 15 min para homogeneização. A solução filmogênica foi colocada em placas de vidro (0,39 g/cm<sup>2</sup>) e submetida à secagem para evaporação do solvente (24 h), sob temperatura ambiente e umidade controlada através de sílica gel (~30% UR) (Figura 9). As concentrações de biopolímero, carotenoides e condições de secagem para obtenção dos filmes foram definidas a partir de testes preliminares. Após a obtenção os filmes foram armazenados (48 h) sob umidade relativa controlada de 58% (através de solução saturada de brometo de sódio) e temperatura ambiente antes de serem caracterizados.

Figura 9 – Cuba para secagem dos filmes de acetato de celulose.



Fonte: Autor

#### 4.6 Caracterização dos filmes biodegradáveis

##### 4.6.1 Espessura e propriedades mecânicas

A resistência à tração e o alongamento na ruptura foram determinados de acordo com a *American Society for Testing and Materials* D882-2012 (ASTM, 2012). Os filmes foram cortados em retângulos (100 mm x 25 mm), fixados entre as garras do texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems, Reino Unido) com distância inicial de 50 mm e o teste realizado com velocidade de 0,8 mm/s. Foram realizadas dez repetições para cada amostra e a espessura foi determinada com o uso de um micrômetro digital (modelo IP40, Digimess, Brasil) através da leitura em pontos aleatórios ao longo das amostras.

##### 4.6.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade dos filmes biodegradáveis ao vapor de água foi avaliada através do método descrito pela ASTM 96-05 (ASTM, 2000). Os filmes foram fixados na parte superior de cápsulas de permeação (63 mm de diâmetro interno) contendo cloreto de cálcio anidro em seu interior (0 % UR). O conjunto (cápsula de permeação + filme) foi pesado e colocado em uma cuba com uma solução saturada de cloreto de sódio (75% UR), armazenada a 25 °C para manutenção do gradiente de umidade relativa. Após 24 h de armazenamento o conjunto foi

pesado e a permeabilidade ao vapor de água ( $\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{KPa}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) obtida de acordo com a equação 1:

$$PVA (\%) = \frac{W \times L}{A \times T \times \Delta P} \quad (1)$$

Onde:

*W*: ganho de massa do conjunto (cápsula de permeação + filme) após 24 horas (g);

*L*: espessura do filme (mm);

*A*: área da superfície do filme exposto ( $\text{m}^2$ );

*T*: tempo de permeação (h);

$\Delta P$ : diferença de pressão de vapor entre os dois lados do filme (Pa).

#### 4.6.3 Propriedades ópticas

##### 4.6.3.1 Cor

Os parâmetros de cor dos filmes biodegradáveis foram determinados através do sistema CIELab, por meio de um colorímetro Minolta (modelo CR-300, MinoltaCo. Ltda, Japão). Neste sistema de leitura foram utilizados os parâmetros  $L^*$ , que varia de 0 (preto) a 100 (branco);  $a^*$ , coloração na região do vermelho ( $+a^*$ ) ao verde ( $-a^*$ );  $b^*$ , coloração no intervalo do amarelo ( $+b^*$ ) ao azul ( $-b^*$ ). O colorímetro foi previamente calibrado com uma placa branca padrão e a leitura da cor dos filmes foi realizada em pontos aleatórios da amostra colocada sobre a mesma placa. Os filmes biodegradáveis com adição dos antioxidantes naturais foram comparados ao filme controle e a diferença de cor ( $\Delta E$ ) obtida de acordo com a equação 2:

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (2)$$

Onde:

$L_0^*$ ,  $a_0^*$  e  $b_0^*$ : parâmetros de cor de do filme controle;

$L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ : parâmetros de cor dos filmes biodegradáveis com antioxidantes naturais.

##### 4.6.3.2 Transmissão de luz

Os filmes foram cortados em retângulos (1cm x 4cm), colocados na parede interna de uma cubeta de quartzo e submetidos a uma varredura na região de 200 nm a 800 nm através de um espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV-1800, Japão) (FANG et al., 2002). Uma cubeta de quartzo vazia foi utilizada como controle.

#### 4.6.4 Propriedades morfológicas

A interação da matriz polimérica com os antioxidantes naturais livres ou encapsulados foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Jeol, modelo JSM 6060, Japão). As amostras foram fixadas com fita dupla face em *stub* de alumínio, revestidas previamente com uma fina camada de ouro e observadas a uma voltagem de 5 kV.

#### 4.6.5 Propriedades térmicas

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada em um analisador termogravimétrico (modelo TGA Q50, TA Instruments, Estados Unidos) através do aquecimento das amostras de 25 °C a 800°C, sob atmosfera de nitrogênio e taxa de aquecimento de 20 °C/min. A análise de calorimetria de varredura diferencial (DSC) foi determinada em um DSC Q20 (TA Instruments, Estados Unidos) sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min. Os termogramas foram obtidos com aquecimento de 25 °C – 200 °C (10 °C/min), resfriamento a -50 °C (10°C/min) e reaquecimento até 200 °C (10 °C/min).

#### 4.6.6 Propriedades termomecânicas

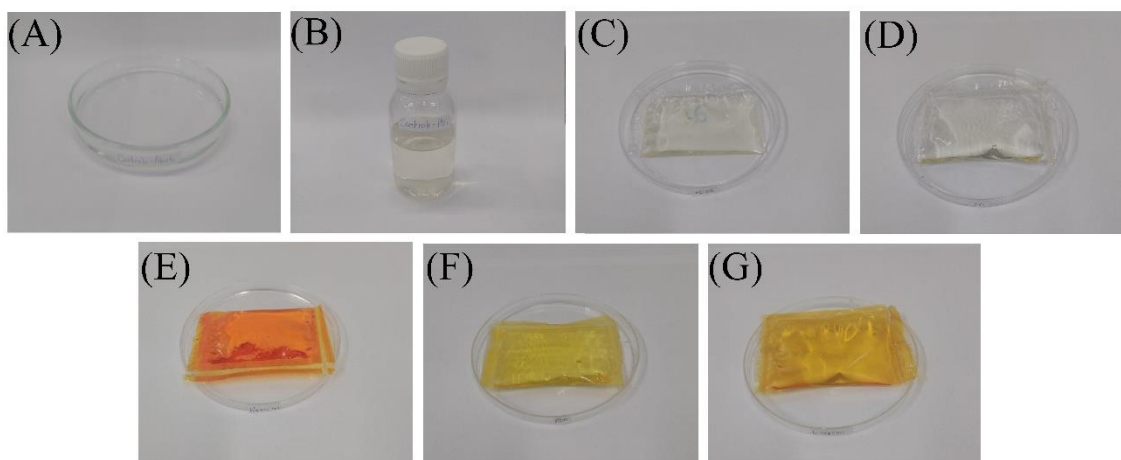
A análise mecânica dinâmica (DMA) foi realizada com um DMA 2980 (TA Instruments, Estados Unidos). Os filmes foram cortados em retângulos de 12 x 6 x 0,07 mm (comprimento, largura, espessura) e analisados de acordo com os seguintes parâmetros: frequência de 1 Hz, amplitude de 20 µm, força de 1 N, temperatura de 25 a 200 °C e taxa de aquecimento de 2 °C/min. A temperatura de transição vítrea foi determinada no ponto de inflexão da curva do parâmetro ângulo de perda (Tan  $\delta$ ) em função da temperatura.

#### 4.6.7 Atividade antioxidante



A atividade antioxidante dos filmes biodegradáveis foi avaliada através do armazenamento de óleo girassol sem adição de antioxidantes sintéticos sob condições controladas para oxidação. O óleo (10 mL) foi armazenado nos filmes na forma de sachê através de seladora térmica manual, com dimensão de 4 cm x 5 cm (20 cm<sup>2</sup>) (Figura 10). As amostras foram armazenadas em uma câmara (Tecnal, modelo TE-402, Brasil) com temperatura, luz e umidade controladas. Como controles o óleo foi armazenado em um filme de polietileno de baixa densidade (PEBD), frasco plástico simulando a embalagem convencional deste produto (PET) e armazenado sem embalagem. A estabilidade das amostras foi avaliada através da determinação do índice de peróxidos, dienos e trienos conjugados (AOCS, 1994) em tempos pré-determinados ao longo do período de armazenamento. Durante o armazenamento também foi realizada a análise de cor dos filmes.

Figura 10 – Óleo de girassol armazenado em diferentes embalagens: sem embalagem (A), frasco plástico (B), polietileno de baixa densidade (C), filme controle (D), filme com 0,1 % de norbixina (E), filme com 0,1 % de zeaxantina (F) e filme com 0,1 % de licopeno (G).



Fonte: Autor

#### 4.6.7.1 Índice de peróxidos

O índice de peróxidos das amostras foi determinado de acordo com a metodologia descrita pela AOCS (AOCS, 1994). Aproximadamente 5 g de óleo foi pesado em erlenmeyer, adicionado de 30 mL de solução de solução ácido acético-clorofórmio (3:2), agitado para dissolução da amostra e adicionado de 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio. Após o repouso durante 1 min foram adicionados 30 mL de água destilada, 1 mL da solução indicadora de amido (1 %) e a amostra foi titulada com solução de tiosulfato de sódio 0,1 N

até o desaparecimento da coloração escura. O índice de peróxidos foi expresso de acordo com a equação 3:

$$\text{Índice de peórxidos (mEq/Kg)} = \frac{(A - B) \times N \times F_c \times 1000}{P} \quad (3)$$

Onde:

*A*: volume da solução de tiosulfato de sódio gasto para a titulação da amostra (mL);

*B*: volume da solução de tiosulfato de sódio gasto para a titulação da amostra (mL);

*N*: concentração da solução de tiosulfato de sódio;

*F<sub>c</sub>*: fator de correção da solução de tiosulfato de sódio;

*P*: peso da amostra (g).

#### 4.6.7.2 Dienos e trienos conjugados

A presença de dienos e trienos conjugados formados durante a oxidação foi determinada através da absorvidade na região do ultravioleta em um espectrofotômetro, com a diluição das amostras em isooctano (2,2,4-Trimetilpentano). Para isso, 0,25 g de óleo foram dissolvidos em 25 mL do solvente de referência e a leitura realizada nos comprimentos de onda de 232 nm (dienos conjugados) e 268 nm (trienos conjugados) (AOCS, 1994). Os coeficientes de extinção nos diferentes comprimentos de onda foram obtidos de acordo com a equação 4:

$$K_\lambda = \frac{A_\lambda}{c \times l} \quad (4)$$

Onde:

*K<sub>λ</sub>*: extinção específica no comprimento de onda de 232 ou 268 nm;

*A<sub>λ</sub>*: absorbância no comprimento de onda de 232 ou 268 nm;

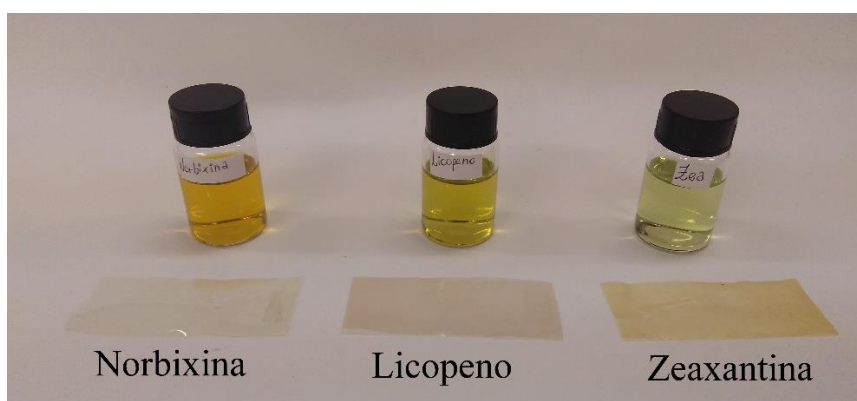
*c*: concentração da solução (g/100 mL);

*l*: caminho óptico da cubeta (1 cm).

#### 4.6.8 Ensaio de liberação dos antioxidantes naturais a partir dos filmes biodegradáveis

Os ensaios de liberação foram realizados utilizando etanol 95% como simulante de alimentos lipofílicos (ANVISA, 2010). Amostras de filmes (2,5 cm x 6 cm) foram colocadas em frascos âmbar com 15 mL do líquido simulante, adicionados de nitrogênio para criar uma atmosfera inerte e fechados. A quantificação do carotenoide no líquido simulante foi determinada através da construção de curvas padrão (absorbância x concentração) para cada carotenoide em etanol 95 %: licopeno de 0,25 a 8 µg/mL ( $R^2$ : 0,987;  $\lambda_{\text{máx}}$ : 470 nm), norbixina de 0,25 a 6 µg/mL ( $R^2$ : 0,998;  $\lambda_{\text{máx}}$ : 458 nm) e zeaxantina de 0,3 a 8 µg/mL ( $R^2$ : 0,996;  $\lambda_{\text{máx}}$ : 449 nm). As amostras foram armazenadas sob temperatura controlada (25 °C e 40 °C) durante 10 dias sem luz e em tempos pré-determinados uma alíquota (2 mL) foi retirada para a análise da concentração através de um espectrofotômetro. A liberação foi expressa como a porcentagem do antioxidante liberado em um tempo pré-determinado (Figura 11).

Figura 11 – Aparência do líquido simulante (etanol 95%) e filmes ao final da análise de migração sob temperatura de 25 °C.



Fonte: Autor

#### 4.6.9 Estabilidade dos filmes durante o armazenamento

Os filmes foram avaliados quanto a sua estabilidade durante o armazenamento sob condições controladas de temperatura (30 °C), umidade (~50 %) e luz (900 – 1000 lux), através da determinação de cor, transmissão de luz e propriedades mecânicas (como descrito nos itens 4.6.1 e 4.6.3). Também foi avaliada a concentração dos carotenoides, em que amostras de filmes (2,5 cm x 6 cm) foram colocadas em tubos falcon, adicionadas de acetona (10 mL) e submetidas à agitação magnética até completa solubilização do biopolímero. Após essa etapa, a solução obtida foi adicionada de éter de petróleo (10 mL), homogeneizada em vórtex (2 min) e centrifugada durante 5 min (5000 g) (Hitachi, modelo CR 21GIII, Japão) para separação das

fases e precipitação do biopolímero. Uma alíquota do sobrenadante foi retirada, seca em corrente de nitrogênio, adicionada do solvente de referência e a concentração foi determinada através de um espectrofotômetro utilizando os parâmetros descritos na Tabela 2.

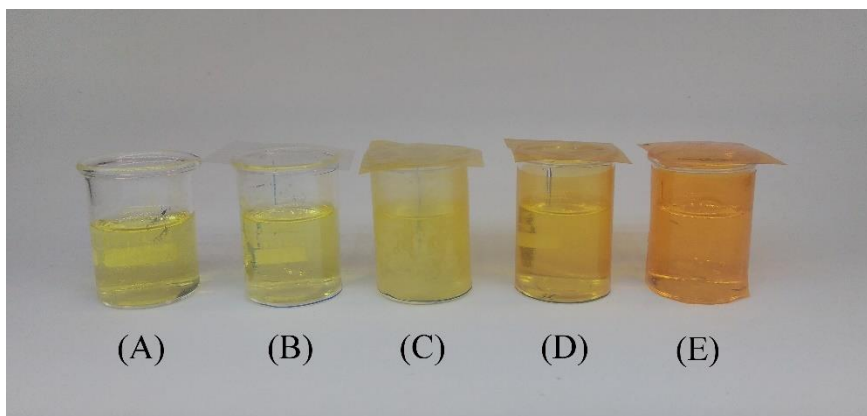
Tabela 2 – Parâmetros para quantificação dos carotenoides em espectrofotômetro.

<b>Carotenoide</b>	<b>Solvente</b>	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$	<b>Referência</b>
Norbixina	Solução aquosa KOH (0,5%)	453	3473	Rios e Mercadante (2004)
Licopeno	Éter de petróleo	470	3450	Rodriguez-Amaya (2001)
Zeaxantina	Éter de petróleo	449	2348	

#### 4.6.10 Avaliação da barreira à transmissão de luz através dos filmes: estabilidade de vitamina B<sub>2</sub> (riboflavina) durante o armazenamento sob condição controlada para degradação

A riboflavina é uma vitamina do complexo B naturalmente presente em alimentos lácteos. Sua sensibilidade à luz fez com que esta vitamina fosse utilizada como marcador em estudos que desejam avaliar a barreira oferecida por embalagens. A metodologia desenvolvida por Stancik et al. (2017) que avalia, de maneira acelerada, a performance de diferentes materiais na proteção à ação luminosa em produtos lácteos foi utilizada e adaptada para avaliar a barreira à luz oferecida pelos os filmes desenvolvidos. Foi preparada uma solução tampão fosfato com pH 6.4 adicionada de padrão de vitamina B<sub>2</sub> (30 mg/L), para simular o pH do leite. Os filmes foram cortados e cuidadosamente posicionados na parede exterior e parte superior de um béquer de vidro de 10 mL, a fim de se avaliar somente a barreira à transmissão de luz e não a interação com o produto. Foram adicionadas 8 mL de solução tampão com riboflavina em cada sistema de embalagem (Figura 12) e as amostras foram armazenadas em uma câmara sob condições controladas de temperatura e luz (5 °C e 4700 ± 200 lux). Alíquotas (0,5 mL) foram retiradas nos tempos de 90, 180, 270 e 350 min para a quantificação do teor de vitamina.

Figura 12 – Avaliação da estabilidade de vitamina B<sub>2</sub> em diferentes embalagens: (A) vidro, (B) filme controle, (C) filme com 0.1 % de zeaxantina, (D) filme com 0.1 % de licopeno e (E) filme com 0.1 % de norbixina.



Fonte: Autor

A vitamina B<sub>2</sub> foi quantificada através de um HPLC (Agilent<sup>®</sup> series 1100, Santa Clara, CA, USA) acoplado de um desgaseificador, bomba quaternária, injetor automático e coluna C18 NovaPak<sup>®</sup> (4µm diâmetro da partícula, 300 x 3,9 mm). As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel composta por tampão fosfato de potássio pH 7,2 com dimetilformamida 85:15 (v/v); corrida isocrática; fluxo de 1 mL/min; temperatura de 25 °C; detector de fluorescência com excitação a 450 nm e emissão a 530 nm; e tempo de corrida de 10 min. Os dados foram processados com auxílio do software ChemStation<sup>®</sup> e a concentração de vitamina foi obtida através de uma curva de calibração com faixa de concentração de 0,006 a 0,506 µg/mL, R<sup>2</sup> = 0,9982, limites de detecção (LOD) de 6,64x10<sup>-9</sup> mg/100 g e quantificação (LOQ) de 2,21x10<sup>-8</sup> mg/100 g. Todos os reagentes utilizados foram de grau cromatográfico e previamente filtrados a vácuo através de uma membrana de filtração para solventes orgânicos Millipore de 0,22 µm (Millipore, Barueri, São Paulo).

#### 4.7 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como a média ± desvio padrão. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando ANOVA e teste de Tukey para comparação das médias ao nível de 5% de significância, através do programa Statistica 12.0 (Statsoft, São Paulo, Brasil).

### **CAPÍTULO 3: ARTIGOS CIENTÍFICOS**

---

## **ARTIGO 1: Biodegradable packaging of cellulose acetate incorporated with norbixin, lycopene or zeaxanthin**

Artigo publicado na revista 'Industrial Crops and Products'

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112212>

Renato Queiroz Assis<sup>a</sup>, Polliana D'Angelo Rios<sup>b</sup>, Alessandro de Oliveira Rios<sup>a</sup>, Florencia Cladera Olivera<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Food Science, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Campus do Vale, 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Forest Engineering, State University of Santa Catarina (UDESC), Av. Luiz de Camões, 2090, 88520-000, Lages, Santa Catarina, Brazil.

### **Abstract**

There is a growing interest in the use of biopolymers for the development of biodegradable packaging with the addition of natural compounds. The objective of this work is to develop cellulose acetate films with the addition of norbixin, zeaxanthin or lycopene, and to evaluate the physicochemical and barrier properties. The films were obtained by casting technique, and the carotenoids were added at the concentration of 0.03%, 0.05% and 0.1%. There was no difference for film thickness ( $0.0405 \pm 0.010$  mm); however the addition of 0.1% lycopene or zeaxanthin showed higher tensile strength and elongation at break. This plasticizing effect of carotenoids was also observed in Dynamic mechanical thermal analysis, with a decrease in the glass transition temperature. However, films with 0.1% of incorporation of norbixin or lycopene showed a better protective effect on sunflower oil stability when compared to zeaxanthin. Behavior was related to a more significant barrier to the transmission of UV-Vis, antioxidant effect and pigment stability.

**Keywords:** Active packaging; Natural antioxidants; Carotenoids; Antioxidant activity; Plasticizing effect; Barrier properties.

## 1. Introduction

There is an increase interest in the use of biopolymers and the study of techniques for the development of biodegradable packaging, an alternative to the use of polymers from non-renewable sources for use in food packaging. Concerning the biopolymers used as the basis for obtaining biodegradable films, several materials have been evaluated as gelatin (Ge et al., 2018; Hanani et al., 2019), cassava starch (Piñeros-Hernandez et al., 2017; Qin et al., 2019), polylactic acid (PLA) (Muller et al., 2017; Stoll et al., 2018), chitosan (Rambabu et al., 2019; Woranuch et al., 2015), and cellulose (Wu et al., 2019, 2016).

The cellulose represents a polymer of ample use due mainly to its easy obtaining, biodegradability, and possibility to undergoes chemical modifications (González et al., 2015; Löbmann and Svagan, 2017; Wang et al., 2017). The process of chemical modification through the acetylation of cellulose leads to the production of cellulose acetate, which shows the ability for training films and a continuous matrix. Generally, this polymer has been evaluated for the development of packaging with antimicrobial activity through the addition of essential oils (Carvalho et al., 2017; Dannenberg et al., 2017; Pola et al., 2016).

The incorporation of bioactive compounds in packaging, as antimicrobials or natural antioxidants, has advantages over direct addition in food, such as use of the additive in a lower concentration, controlled release during storage and more significant interaction with the surface of the product, since deterioration reactions begin at the food surface (Bolumar et al., 2011). Among the various natural antioxidants that can be used in active biodegradable films are carotenoids, class of compounds that are generally used as natural dyes, such as norbixin, lycopene, and zeaxanthin.

Norbixin ( $C_{24}H_{28}O_4$ ) is a pigment obtained from the saponification process of bixin, which is responsible for the characteristic color of the seeds of *Bixa orellana* L., known as annatto. Its structure is composed of 9 conjugated double bonds, and unlike most carotenoids with basic C40 structure, this pigment has a smaller chain with 24 carbon atoms and is water-soluble (Scotter, 2009; Solymosi et al., 2015).

Another important carotenoid is lycopene ( $C_{40}H_{56}$ ), an acyclic pigment with a symmetrical structure composed of eight units of isoprene linked to each other, which has 11 conjugated double bonds and 2 unconjugated double bonds. One of the most known sources with a high concentration of lycopene in tomato, but this pigment can also be found in watermelon, papaya, guava (Nagarajan et al., 2019; Oberoi and Sogi, 2017; Suwanaruang, 2016).



Zeaxanthin ( $C_{40}H_{56}O_2$ ) is an isomer of lutein, is one of the main pigments found in the macula, such as lutein and meso-zeaxanthin, which give a typical yellow coloration of this region of the retina. The zeaxanthin has a basic C40 structure with 11 conjugated double bonds and a  $\beta$ -ionone ring at each end of the carbon chain. This pigment can be found in high concentration is goji berry, which has been evaluated for extracting and obtaining with a high degree of purity of this carotenoid (de Campo et al., 2018; Fratianni et al., 2018; Pedro et al., 2018).

The norbixin, lycopene, and zeaxanthin have been evaluated as antioxidants, and natural pigments for addition in food (Rizk et al., 2014; Smith et al., 2014), and more recently have been evaluated in encapsulation processes to increase the stability and solubility of such compounds (de Campo et al., 2018; dos Santos et al., 2015; Tupuna et al., 2018). However, these pigments were not evaluated for the addition and development of biodegradable packaging of cellulose acetate.

In this context, norbixin, lycopene, and zeaxanthin may represent excellent natural antioxidants for addition in biodegradable films. Thus, the objective of this work was to develop cellulose acetate films incorporated with different concentrations of norbixin, lycopene, and zeaxanthin and to evaluate the effect under the physical, mechanical and barrier properties on packaging produced.

## **2. Materials and methods**

### 2.1. Materials

The annatto seeds, tomatoes, goji berry, and sunflower oil without the addition of synthetic antioxidants were purchased from the local market in Porto Alegre, Brazil. For the development of the films cellulose acetate ( $SD = 2.5$ ;  $MW = 2,024,000 \text{ g mol}^{-1}$ ) was used, provided by Rhodia Acetow (Santo André, São Paulo, Brazil). All reagents used were of analytic grade.

### 2.2. Extraction of carotenoids

#### 2.2.1 Norbixin

Norbixin was obtained from the extraction and conversion of bixin from annatto seeds (*Bixa orellana* L.). The seeds (25 g) were subjected to two washes with hexane (50 mL), filtered, and washed with methanol (50 mL). After this step, bixin was obtained through two consecutive extractions with ethyl acetate (50 mL); all steps were performed under magnetic stirring for 15 minutes. The extract was filtered, dried in a rotary evaporator under reduced pressure ( $T < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Fisatom model 801/802, São Paulo, SP, Brazil), and added with 50 mL of methanolic potassium hydroxide solution (10%) for the conversion of bixin into norbixin (12 h -  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). The extract was washed in a separatory funnel containing distilled water (50 mL), ethyl ether (50 mL), and the pH was adjusted to 3.5 by the addition of acetic acid (transfer of norbixin to the organic phase) (Rios & Mercadante, 2004). Subsequently, the extract was washed with distilled water until pH 6, dried in a rotary evaporator and stored at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.2 Lycopene

The tomatoes were cut (700 g), the seeds were removed, and lycopene was extracted with ethyl acetate (1000 ml), with two extractions under mechanical agitation (120 min). The extract obtained was filtered, concentrated under reduced pressure in a rotary evaporator (Fisatom model 801/802, São Paulo, SP, Brazil) and stored in a freezer ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Nunes and Mercadante, 2004).

### 2.2.3 Zeaxanthin

Zeaxanthin was obtained by extraction from goji berry in an Ultra-Turrax® (IKA, model T25, China), acetone was used as an extractive solvent. The sample (1g) was placed in a falcon tube, 25 mL of acetone was added and then subjected to extraction for 30s at 7000 rpm. The procedure was performed until complete removal of the carotenoid from the sample (approximately six times). The obtained extract was filtered, dried in a rotary evaporator (Fisatom model 801/802, São Paulo, SP, Brazil) and stored in a freezer ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Mercadante and Rodriguez-Amaya, 1998).

## 2.3. Preparation of cellulose acetate films

The films were obtained by *casting* technique, with the complete solubilization of the biopolymer in acetone (3 g cellulose acetate/100 mL acetone) under mechanical stirring (4 h)

at room temperature. Carotenoids (lycopene, norbixin, and zeaxanthin) were added at the concentration of 0.03, 0.05 and 0.1 µg/g of biopolymer and the solution was kept under stirring for 15 min for homogenization. The film-forming solution was placed on glass plates and subjected to drying for solvent evaporation (24 h), at room temperature and humidity control (~30% RH). The concentrations of biopolymer, natural antioxidants, and drying conditions were defined from preliminary tests. The films were stored (48 h) under a controlled relative humidity of 58% (saturated sodium bromide solution) and room temperature before being characterized.

#### 2.4. Mechanical properties

The mechanical properties of the cellulose acetate films with carotenoids were determined using a texturometer with a load cell of 5 kg (Stable Micro Systems, TA.XT2i, United Kingdom), according to ASTM D882-2012 (ASTM, 2012). The samples (100 mm x 10 mm) were fixed between the grips with the initial separation of 50 mm and the analysis performed with a velocity of 0.8 mm/s until rupture. The thickness of the films was determined with a digital micrometer (Digimes, IP40, Brazil) by reading at random points of the sample.

#### 2.5. Water vapor permeability (WVP)

The films were cut in circles, fixed and sealed on top of permeation capsules (63 mm diameter), added with anhydrous calcium chloride in the interior (0% RH). The samples were stored in a glass chamber under controlled conditions of temperature (25 °C) and relative humidity (75%) (ASTM, 2000). The water vapor permeability of films was determined gravimetrically after 24 h by the mass gain, obtained according to the equation:

$$WVP = \frac{W \times L}{A \times T \times \Delta P}$$

Where:

*W*: mass gain (permeation capsule + film) after 24 hours (g);

*L*: film thickness (mm);

*A*: surface area of exposed film (m<sup>2</sup>);

$T$ : permeation time (h);

$\Delta P$ : vapor pressure difference between the two sides of the film (Pa).

## 2.6 Optical properties

The color of the films was evaluated using the CIELab scale ( $L^*$ : lightness,  $a^*$ : red-green,  $b^*$ : yellow-blue) with a Minolta colorimeter (model CR-300; Minolta, Japan). The equipment was calibrated with a white control plate ( $L^*$ : 97.45,  $a^*$ : 0.13 and  $b^*$ : 1.70), and the reading was performed at random points throughout the films. Light transmission through the films was determined with a UV-visible spectrophotometer (Shimadzu, UV-1800, Japan) from 200 nm to 800 nm, in which an empty quartz cuvette was used as control.

## 2.7 Morphological properties

The morphology of the films was evaluated by Scanning electron microscopy (JEOL, JSM 6060, Japan). The samples were previously fixed with double-sided tape in stubs, coated with a thin layer of gold, and observed with 5 Kv accelerating voltage.

## 2.8 Thermal properties

The thermogravimetric analysis (TGA) was performed on a thermogravimetric analyzer (TGA model Q50, TA Instruments, United States) by heating the samples from 25 °C to 900 °C, under a nitrogen atmosphere and a heating rate of 20 °C/min. Differential scanning calorimetry (DSC) was determined on a Q20 DSC (TA Instruments, United States) under nitrogen atmosphere with a flow rate of 50 mL/min. The thermograms were obtained with heating at 25 °C - 200 °C (10 °C/min), cooling at -50 °C (10 °C/min) and reheating up to 200 °C (10 °C/min).

## 2.9 Thermomechanical properties

The dynamic mechanical analysis was performed with a DMA 2980 (TA Instruments, United States). The films were cut in rectangles of 12 x 6 x 0.07 mm (length, width, thickness) and analyzed according to the following parameters: frequency of 1 Hz, the amplitude of 20  $\mu$ m, the force of 1 N, the temperature of 25 a 200 °C, and heating rate of 2 °C/min. The  $T_g$  was

determined at the inflection point of the curve of the loss angle parameter ( $\tan \delta$ ) as a function of temperature (de Freitas et al., 2017).

#### 2.10 Antioxidant activity: stability of the sunflower oil under oxidation conditions

The oxidative stability of sunflower oil without the addition of synthetic antioxidants was evaluated by storage under controlled conditions (Light: 4000-5000 lux, temperature: 30 °C, and humidity: ~ 65%) (Assis et al., 2017). The oil (10 mL) was packed into the films, dimension 4 cm x 5 cm (20 cm<sup>2</sup>), and analyzed for peroxide index, conjugated dienes and trienes (AOCS, 1994). As control the oil was stored in plastic packaging of low-density polyethylene (LDPE), plastic bottle closed of polyethylene terephthalate (PET) and without packaging (WP). During and at the end of the storage, the color and light transmission through the films were evaluated.

#### 2.11 Statistical analyses

The results were evaluated by analysis of the variance (ANOVA) and Tukey test at a significance level of 5% using the software Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA). The analyses were performed in triplicate, and the results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation.

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Mechanical properties and water vapor permeability

The films show no significant difference with the addition of different carotenoid concentration in relation to the thickness, presenting an average value of  $0.0405 \pm 0.010$  mm. The tensile strength (TS), elongation at break (EAB), and water vapor permeability (WVP) of the cellulose acetate films incorporated with carotenoids are shown in Table 1. The control film presented values of tensile strength and elongation at break similar to those reported in the literature for cellulose acetate films, between 41 - 80 MPa and 3 – 7%, respectively; in which the properties may vary according to the parameters of obtaining the degree of the film of substitution of the biopolymer, concentration, and solvent used (Carvalho et al., 2017; Do

Socorro Rocha Bastos et al., 2016; Moreira et al., 2019; Pola et al., 2016; Tedeschi et al., 2018; Xia et al., 2016).

Table 1. Mechanical properties (tensile strength and elongation at break) and water vapor permeability of the cellulose acetate films with different carotenoids.

<b>Samples</b>	<b>TS (MPa)</b>	<b>EAB (%)</b>	<b>WVP*</b>
Control	67.48 ± 2.32 <sup>f</sup>	3.88 ± 0.46 <sup>c</sup>	0.032 ± 0.002 <sup>ab</sup>
0.03% Norbixin	81.09 ± 6.73 <sup>d</sup>	4.08 ± 0.13 <sup>c</sup>	0.032 ± 0.001 <sup>ab</sup>
0.05% Norbixin	82.76 ± 6.14 <sup>d</sup>	3.95 ± 0.26 <sup>c</sup>	0.029 ± 0.002 <sup>bc</sup>
0.1% Norbixin	82.57 ± 4.27 <sup>d</sup>	3.89 ± 0.73 <sup>c</sup>	0.035 ± 0.001 <sup>a</sup>
0.03% Zeaxanthin	73.56 ± 2.01 <sup>e</sup>	3.66 ± 0.33 <sup>c</sup>	0.029 ± 0.001 <sup>bc</sup>
0.05% Zeaxanthin	82.73 ± 2.48 <sup>d</sup>	12.83 ± 1.61 <sup>ab</sup>	0.024 ± 0.001 <sup>de</sup>
0.1% Zeaxanthin	87.37 ± 3.12 <sup>cd</sup>	14.54 ± 2.32 <sup>ab</sup>	0.023 ± 0.001 <sup>de</sup>
0.03% Lycopene	96.18 ± 2.14 <sup>b</sup>	4.22 ± 0.61 <sup>c</sup>	0.026 ± 0.002 <sup>cd</sup>
0.05% Lycopene	90.90 ± 4.62 <sup>bc</sup>	4.26 ± 0.76 <sup>c</sup>	0.025 ± 0.001 <sup>cde</sup>
0.1% Lycopene	105.63 ± 3.84 <sup>a</sup>	14.91 ± 1.25 <sup>a</sup>	0.022 ± 0.001 <sup>e</sup>

Different superscripts letter within the same columns indicates statistically significant different values ( $p < 0.05$ ).

\*(g mm m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> kPa<sup>-1</sup>)

TS: tensile strength

EAB: elongation at break

WVP: water vapor permeability

There was a significant increase in tensile strength for all pigment concentrations when compared to the control film ( $p < 0.05$ ), which may be related to good interaction between biopolymer-carotenoid. However, the incorporation of norbixin showed an increase in TS of 22%, with no difference between the added concentrations. Behavior not observed for the addition of zeaxanthin and lycopene, with an increase in TS of 29% and 56% for the higher pigment concentration, respectively.

The incorporation of zeaxanthin (0.05 % and 0.1 %) and lycopene (0.1 %) caused a significant increase ( $p < 0.05$ ) in elongation at break when compared to control films or norbixin films, of approximately 284%. As in tensile strength, this behavior may be related to carotenoid-biopolymer interaction, in which these pigments probably had a plasticizing effect on the polymer matrix. This effect is associated with the structure of zeaxanthin (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>O<sub>2</sub>) and

lycopene ( $C_{40}H_{56}$ ), which present a higher carbon chain when compared to norbixin ( $C_{24}H_{28}O_4$ ) and can provide greater spacing and increase the interaction with the cellulose acetate chains, in which the first pigment has a  $\beta$ -ionone ring at each end of the structure. Another factor is that the carotenoids present lower molecular weight when compared to the biopolymer used, that can be grouped in free spaces, decrease the rigidity and increase the flexibility of the matrix (Do Socorro Rocha Bastos et al., 2016; Pola et al., 2016). However, norbixin has a hydrophilic character and may have less compatibility with the hydrophobic matrix, which presented better interaction with zeaxanthin and lycopene. According to Stoll et al. (2019), the increase in elongation at break accompanied by increased tensile strength at break may be associated with less intermolecular interaction of the polymer and consequent rearrangement of the chain after the addition of natural antioxidants. Result of greater tensile strength through new carotenoid-biopolymer-biopolymer interactions and the mechanism hardening during the testing of the mechanical properties of the films. This effect was observed for PLA films with the addition of lycopene, bixin, and beta-carotene (100  $\mu\text{g/g}$  of biopolymer). There was a simultaneous increase in these two parameters, ranging from  $246 \pm 14\%$  and  $374 \pm 13\%$  and from  $22.4 \pm 1.3$  MPa and  $29.9 \pm 1.2$  MPa, for elongation at break and tensile strength, respectively.

As expected, the hydrophobic character of zeaxanthin and lycopene led to a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in WVP when compared to control film and with norbixin addition. Due to the presence of hydroxyl groups in its structure, cellulose acetate can interact with water molecules and facilitate diffusion through the films, where the higher concentration of norbixin (0.1%) contributed to a greater diffusion, associated to its hydrophilic character. The WVP is associated with the hydrophilic/hydrophobic ratio between the polymer matrix and additives used, in which the addition of hydrophobic compounds (such as zeaxanthin and lycopene) increase the hydrophobicity and may have a lower permeability through films (Gonçalves et al., 2019; Pola et al., 2016). Behavior similar to that observed for the addition of oregano essential oil in cellulose acetate films (Pola et al., 2016); lycopene in cassava starch films (Assis et al., 2017); cinnamon and ginger essential oils in chitosan-carboxymethyl cellulose films (Noshirvani et al., 2017); essential oils from lemongrass (*Cymbopogon citratus*), rosemary pepper (*Lippia sidoides*) and basil (*Ocimum gratissimum*) in cellulose ester films (Do Socorro Rocha Bastos et al., 2016); mango peel extracts in gelatin films (Adilah et al., 2018); additives of hydrophobic character that acted in decreasing water vapor permeability through the films.

### 3.2 Optical properties

The effect of the incorporation of norbixin, lycopene, or zeaxanthin on the color of the cellulose acetate films is shown in Figure 1. According to the carotenoid and the concentration added there was a color variation and a gradual increase of the intensity, associated with the conjugated double bond set present in its chemical structure and its ability to confer color.

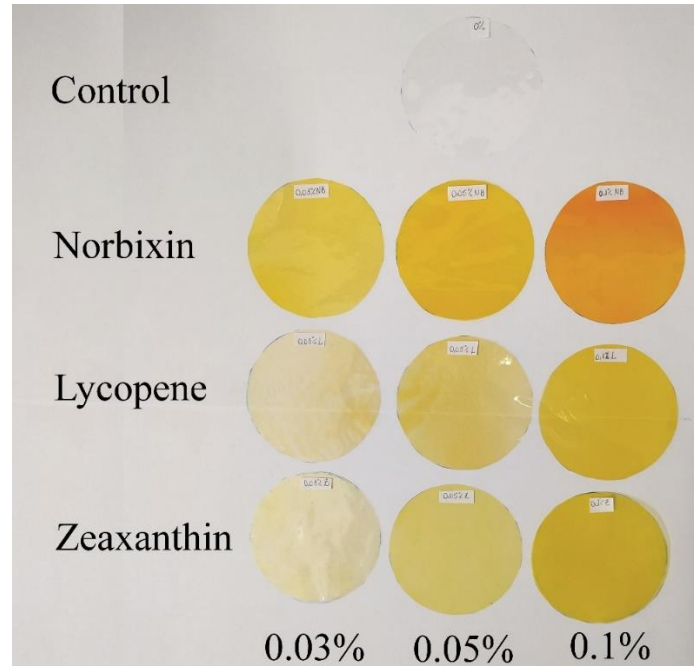


Figure 1. Cellulose acetate films with incorporated of different concentrations of norbixin, zeaxanthin or lycopene.

The results of the color analysis are presented in Table 2. There was a tendency to decrease the luminosity ( $L^*$ ) of the films according to the increase in the amount of each carotenoid, with a lower value of this parameter for the highest concentration (0.1%). The increase in the color intensity of the films caused an increment in the values of the parameters  $a^*$  and  $b^*$ , with the obtaining of coloring films ranging from light yellow to orange and significant difference ( $p < 0.05$ ) in the  $\Delta E$  of the films with addition of the carotenoids when compared to the control film.



Table 2. Color analysis of biodegradable cellulose acetate films with the addition of different concentrations of norbixin, zeaxanthin, or lycopene.

<b>Samples</b>	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>	<b>ΔE</b>
Control	96.75 ± 0.34 <sup>a</sup>	1.60 ± 0.13 <sup>g</sup>	1.22 ± 0.04 <sup>h</sup>	-
0.03% Norbixin	88.10 ± 0.37 <sup>d</sup>	3.65 ± 0.54 <sup>e</sup>	75.97 ± 3.02 <sup>d</sup>	75.26 ± 1.19 <sup>e</sup>
0.05% Norbixin	86.01 ± 0.43 <sup>e</sup>	7.64 ± 0.59 <sup>d</sup>	93.92 ± 2.21 <sup>b</sup>	93.36 ± 0.10 <sup>c</sup>
0.1% Norbixin	82.29 ± 0.71 <sup>f</sup>	15.60 ± 1.51 <sup>a</sup>	108.97 ± 0.37 <sup>a</sup>	109.24 ± 0.25 <sup>a</sup>
0.03% Zeaxanthin	92.64 ± 0.32 <sup>b</sup>	4.40 ± 0.33 <sup>e</sup>	54.69 ± 2.75 <sup>e</sup>	53.71 ± 2.20 <sup>f</sup>
0.05% Zeaxanthin	89.53 ± 0.20 <sup>c</sup>	7.83 ± 0.13 <sup>d</sup>	89.59 ± 2.85 <sup>c</sup>	88.67 ± 0.18 <sup>d</sup>
0.1% Zeaxanthin	82.70 ± 0.82 <sup>f</sup>	11.57 ± 0.42 <sup>c</sup>	106.23 ± 1.39 <sup>a</sup>	96.16 ± 0.71 <sup>b</sup>
0.03% Lycopene	92.33 ± 0.52 <sup>b</sup>	1.95 ± 0.02 <sup>f</sup>	23.15 ± 1.27 <sup>g</sup>	22.64 ± 0.28 <sup>h</sup>
0.05% Lycopene	86.93 ± 0.88 <sup>e</sup>	6.70 ± 0.50 <sup>d</sup>	44.55 ± 3.40 <sup>f</sup>	44.47 ± 1.67 <sup>g</sup>
0.1% Lycopene	81.15 ± 1.18 <sup>f</sup>	13.43 ± 0.28 <sup>b</sup>	73.54 ± 3.30 <sup>d</sup>	74.46 ± 1.03 <sup>e</sup>

Different superscripts letter within the same columns indicates statistically significant different values ( $p < 0.05$ ).

Films with 0.1% of norbixin, zeaxanthin, or lycopene showed the highest values for color parameters ( $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ ) and consequently higher color intensity when compared with concentrations of 0.03%, 0.05% and control film ( $p < 0.05$ ). The color represents an important parameter of the packages since it can impart higher opacity and less transmission of UV/Vis light, the behavior observed in the cellulose acetate films with the addition of carotenoids (Figure 2).

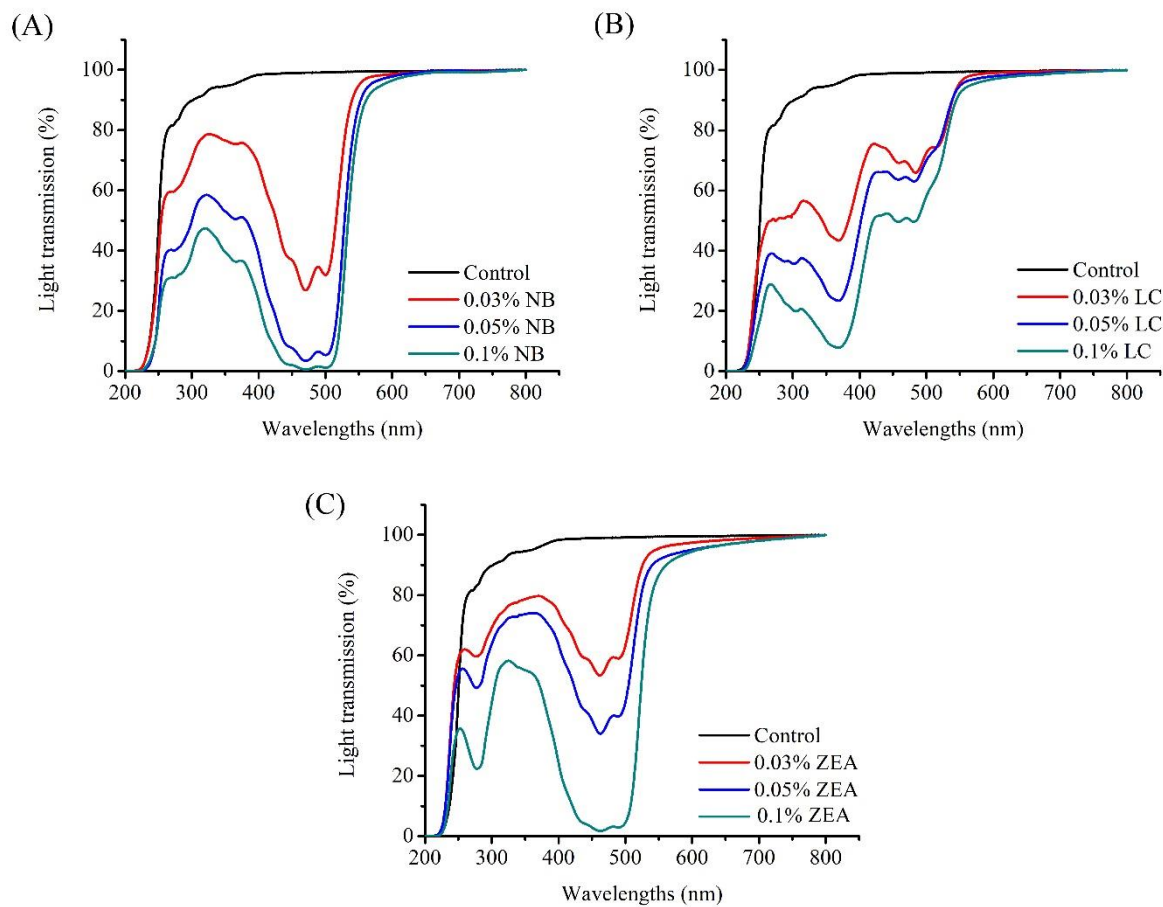


Figure 2. Light transmission of cellulose acetate films with norbixin (A), lycopene (B), and zeaxanthin (C).

According to the amount of carotenoid added, there was a significant reduction of light transmission through the films, with greater barrier to the highest concentration of each pigment (0.1%). The barrier at both wavelengths (UV-Vis) may contribute to the stability of foods with high-fat content against photooxidation. Behavior similar to that observed for the addition of 2% of  $\beta$ -carotene, bixin or lycopene in films of poly (lactic acid) (Stoll et al., 2018); addition of 2-10% bixin nanocapsules in cassava starch films (Pagno et al., 2016); addition of 2-8% free or nanoencapsulated lycopene in cassava starch films (Assis et al., 2017); 1-3% mango leaf extract in chitosan films (Rambabu et al., 2019); with the development of films with higher color intensity and lower light transmission according to the increase of the concentration of the natural antioxidant added to the polymer matrix.

### 3.3 Selection of the better formulation of cellulose acetate film with carotenoids

According to the results obtained, the addition of 0.1% of zeaxanthin and lycopene showed higher interaction with the polymer matrix and the securing of films with better mechanical properties (TS and EAB), higher color intensity, lower UV/Vis light transmission and water vapor permeability. However, the addition of norbixin showed no difference for the mechanical properties and water vapor permeability for the three concentrations (0.03%, 0.05%, and 0.1%), but the addition of 0.1% presented a better barrier to light transmission. Thus, the cellulose acetate films with 0.1% addition of norbixin, zeaxanthin, or lycopene were selected for analysis of thermal properties, scanning electron microscopy, and antioxidant activity.

### 3.4 Thermal properties

According to thermogravimetric curves (TGA) and their derivatives (DTG), the cellulose acetate films showed three thermal degradation events characterized by weight loss (Figure 3 - A and B). The first degradation event was characterized by a small weight loss of approximately 3% - 5% for all films, associated with the evaporation of the water that can be bound to the polymer matrix (50 °C - 150 °C). The second and largest degradation event occurred between 250 °C and 450 °C, related to the beginning of the degradation of the biopolymer and loss of approximately 78% - 83%. The film with 0.1% of zeaxanthin showed lower thermal stability (200 °C - 300 °C) when compared to the control films and with the addition of the other pigments, with a loss of approximately 12%. The lower film stability with 0.1% zeaxanthin may be related to the plasticizing effect of carotenoid on the polymer matrix (Figure 5 - item 3.6 Dynamic mechanical thermal analysis (DMA)) and mainly to the stability of this pigment in relation to the others, which occurs in the following order Norbixin>Lycopene>Zeaxanthin. As observed in the stability of these natural antioxidants in the presence of temperature and light (Figure 8 - item 3.8 Antioxidant activity), in which the zeaxanthin film showed lower pigment stability.

The third event (500 °C) was associated with to the degradation of the carbonic residue from the previous stages, with residual between 1% - 8% and with lower content for the control film (Do Socorro Rocha Bastos et al., 2016; Gutierrez et al., 2017; Pola et al., 2016; Rodríguez et al., 2012; Saha et al., 2018).

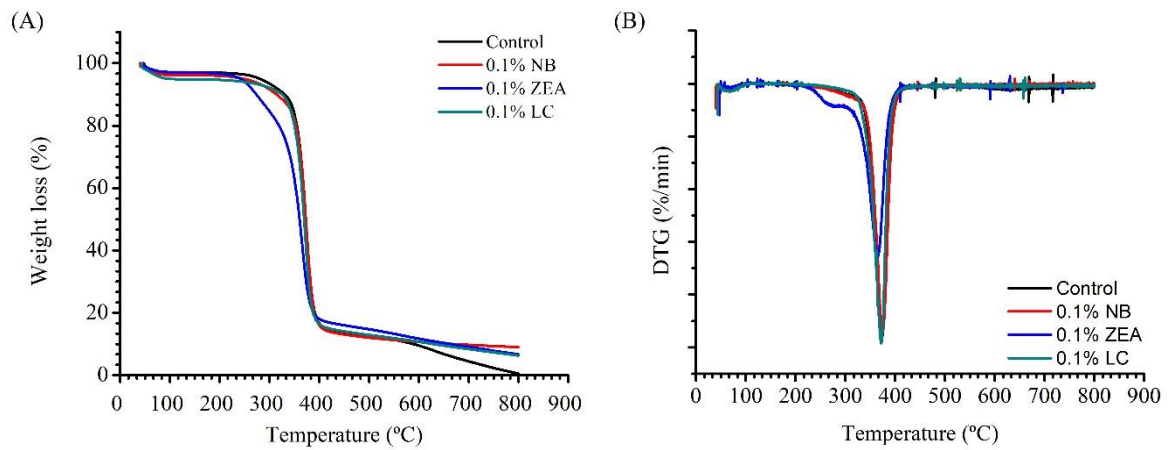


Figure 3. Thermogravimetric analysis TGA (A) and DTG (B) of cellulose acetate films incorporated with different carotenoids.

### 3.5 Differential scanning calorimetry (DSC)

Figure 4 shows the DSC curves for the cellulose acetate films. The films presented an endothermic peak in the first heating (Cycle 1), with temperatures of 81.26 °C, 88.71 °C, 87.60 °C and 81.47 °C for the control film and with the addition of 0.1% norbixin, zeaxanthin or lycopene, respectively. This behavior can be attributed to water desorption present in the polymer matrix, which according to the degree of substitution of cellulose acetate this event can occur between approximately 77.5 °C and 91.1 °C (de Freitas et al., 2017; Kendouli et al., 2014).

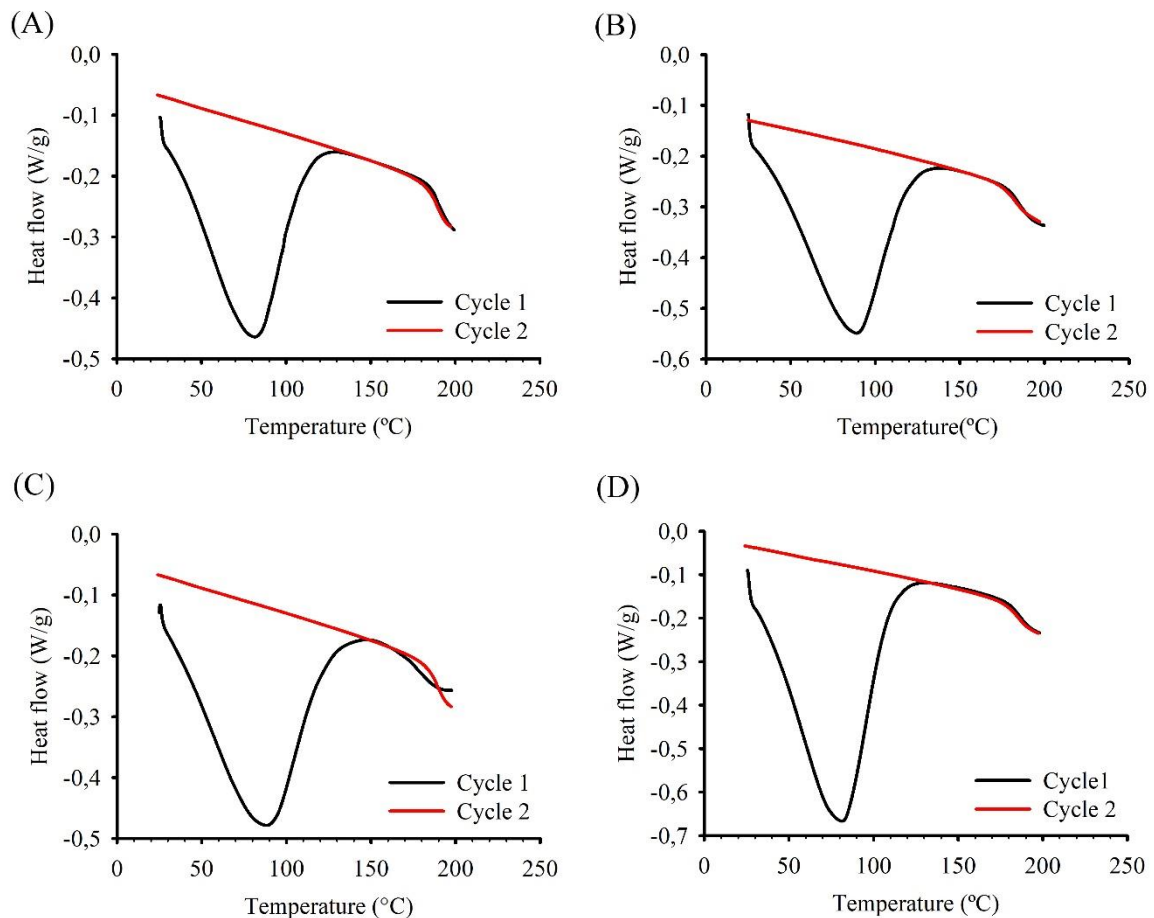


Figure 4. DSC curves for cellulose acetate films: Control (A), 0.1% norbixin (B), 0.1% zeaxanthin (C) and 0.1% lycopene (D).

The addition of 0.1% of lycopene or zeaxanthin showed a plasticizing effect on the polymer matrix when compared to the addition of norbixin and control film (Table 1), with an effect on the glass transition temperature ( $T_g$ ) of the polymer. The  $T_g$  was identified in the first heating (Cycle 1) and confirmed by the second heating of the samples (Cycle 2) (Figure 4). The control film (pure acetate) showed  $T_g$  at 189.11 °C, with a gradual decrease to 184.22 °C, 176.97 °C, and 179.78 °C, for films with the addition of 0.1% of norbixin, zeaxanthin, and lycopene, respectively. The gradual decrease of  $T_g$  is related to the greater mobility of the polymer matrix from the addition of the natural antioxidants when compared to the control film. Behavior is similar to that observed for the development of cellulose acetate films (degree of substitution 1.48) with the addition of 5-50% of glycerol, an additive commonly used as plasticizing in the production of biodegradable films. There was a decrease of  $T_g$  from 229.02 °C to 207.34 °C for the control film and film with a higher concentration of plasticizer (Gonçalves et al., 2019). This behavior was associated with lower biopolymer-biopolymer interaction and consequent

biopolymer-plasticizer interaction with greater spacing between the chains and mobility of the polymer matrix (Gonçalves et al., 2019; Zizovic et al., 2018).

### 3.6 Dynamic mechanical thermal analysis (DMA)

Figure 5 shows the curves of the storage modulus ( $E'$ ), loss modulus ( $E''$ ), and Tan delta for the cellulose acetate films.  $E'$  indicates the energy storage capacity of the sample,  $E''$  indicates the heat dissipated and the delta Tan is the ratio between  $E''/E'$ , where the maximum peak value is related to the glass transition temperature.

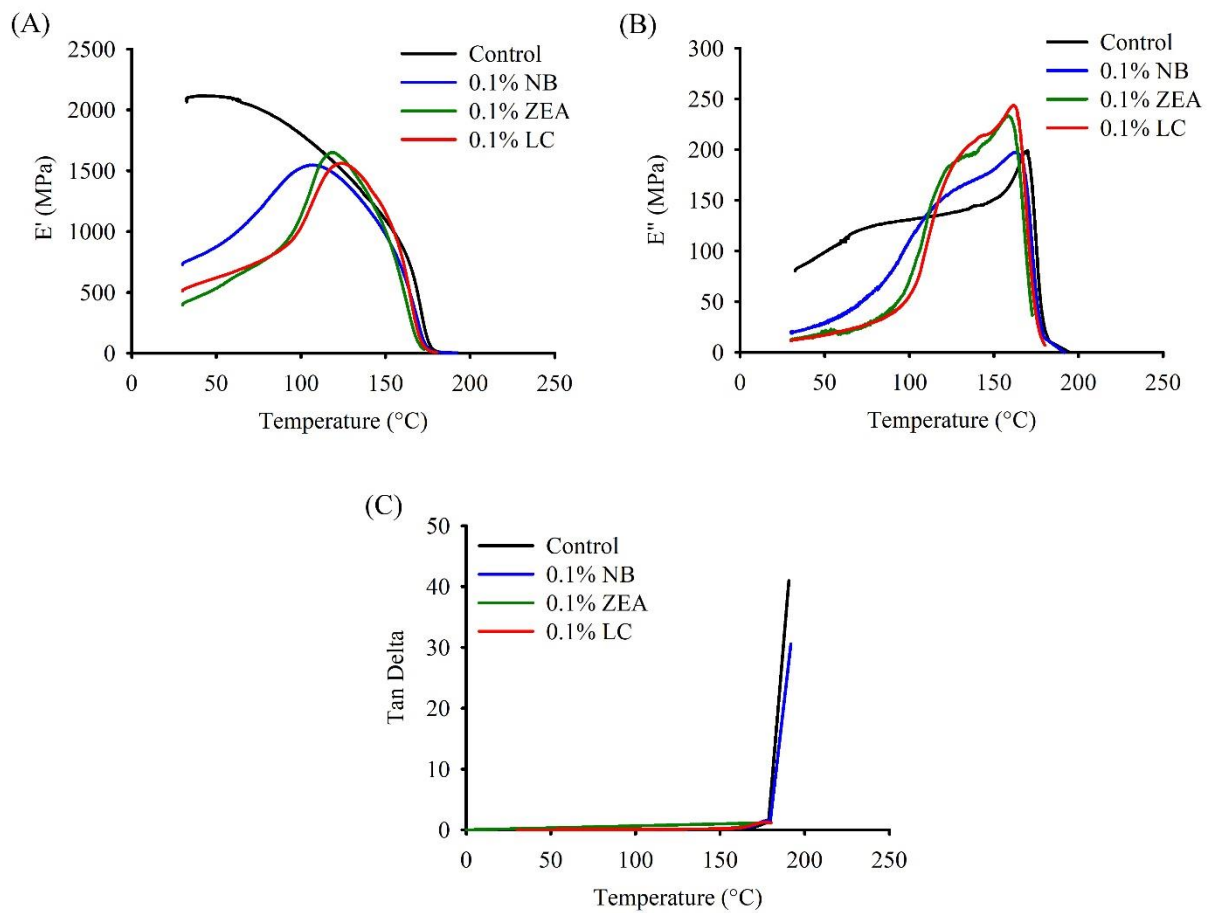


Figure 5. Dynamic mechanical thermal analysis: (a)  $E'$  (b)  $E''$  (c) Tan delta.

There was a decrease in the storage modulus ( $E'$ ) from the addition of 0.1% of norbixin, zeaxanthin or lycopene to the cellulose acetate films, which shows that this parameter may be dependent on the temperature or stability of carotenoids (Figure 5A). However, with the increase in temperature, there was a significant drop of  $E'$  at temperatures close to the glass

transition temperature (above 150 °C). Similar behavior to that observed for the loss modulus ( $E''$ ) (Figure 5B), which in the same temperature range shows a similar curve profile for all films, with a maximum peak value varying between 158.73 °C and 168, 20 °C, which is related to the greater mobility of the polymer matrix and which can be used to determine the glass transition temperature.

There was a decrease of  $E'$  and the increase of the Tan delta peak, which corresponds to the transition from the rigid (vitreous) state sample to a rubbery state, known as the glass transition temperature ( $T_g$ ). The curve of Figure 5C shows the presence of only a range for the glass transition for all films, which occurred at the temperatures of 190.65 °C, 179.68 °C, 171.88 °C, and 173.52 °C, for the control films, 0.1%NB, 0.1%ZEA, and 0.1%LC, respectively. The maximum value of Tan Delta corresponds to the glass transition temperature, which was close to that observed for films that used cellulose acetate with a degree of substitution of 2.48 and 2.29, with  $T_g$  at 200.0 °C and 207.2 °C, respectively. The reduction of the  $T_g$  with the addition of the carotenoids can be related to the plasticizing effect to the polymer matrix, the reduction of the intra/intermolecular bonds (hydrogen bonds) between the chains of the biopolymer and the more significant interaction with pigments added, in this temperature range (de Freitas et al., 2017; Ferrarezi et al., 2013). The plasticizing effect of the pigments was also observed through the analysis of the mechanical properties of the films (Table 1).

### 3.7 Scanning Electron Microscopy (SEM)

Figure 6 shows the SEM of the cellulose acetate films. The control film (Figure 6A) presented a smooth surface, without micropores or cracks. This behavior is associated with the casting technique, the drying conditions in this study (25 °C and 30% RH), the biopolymer and the solvent used; which presents good solubility in acetone, with transparent films, surface without roughness and good distribution of carotenoids in the polymer matrix (Gonçalves et al., 2019; Meier et al., 2004).

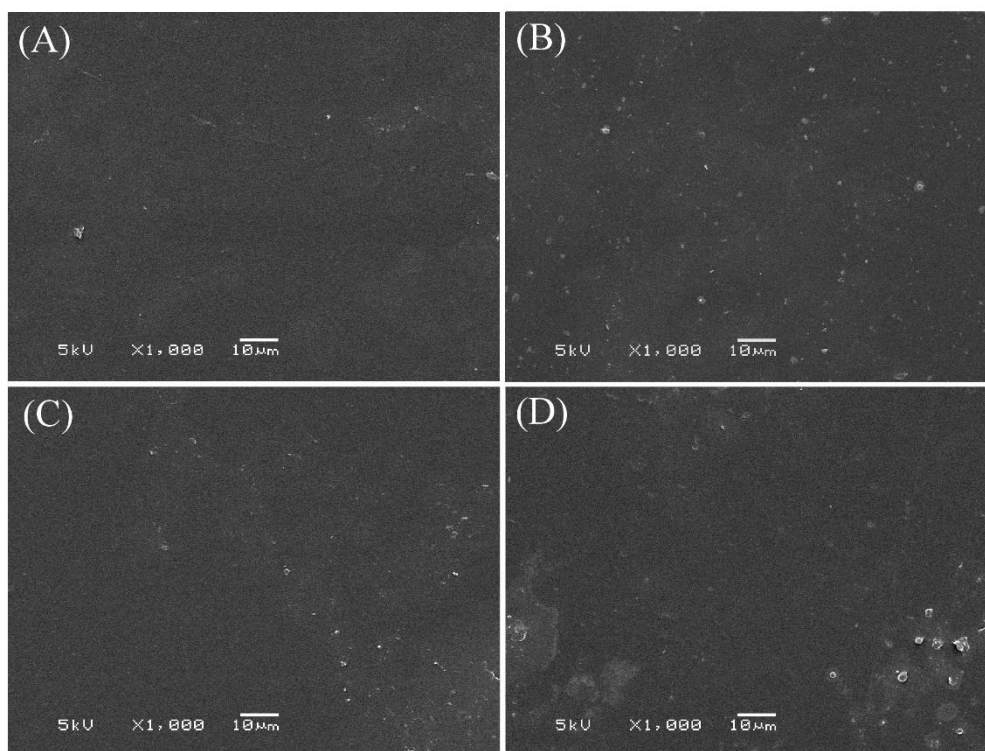


Figure 6. Scanning electron microscopy of the surface: (A) control film, (B) 0.1% NB, (C) 0.1%ZEA, (D) 0.1%LC films.

The solubility of the carotenoids in acetone showed good distribution along with the polymer matrix (Figure 1), associated with the solubility of the cellulose acetate in the solvent, in which all films presented surface without micropores or cracks. However, the addition of norbixin showed small agglomerates distributed along the surface, which may be related to the biopolymer, less interaction with the matrix and hydrophilic character of this pigment. Behavior not observed for 0.1%ZEA and 0.1%LC films (Figure 6C and D), which presented surface with less presence of agglomerates, better results for tensile strength, elongation at break and lower permeability to water vapor (Table 1). This result may be associated to the hydrophobic character of the biopolymer and carotenoids (lycopene and zeaxanthin), better interaction with the biopolymer, plasticizing effect to the polymer matrix and obtaining films with a surface similar to the control film (Do Socorro Rocha Bastos et al., 2016)

### 3.8 Antioxidant activity

Figure 7 shows the stability of the sunflower oil under controlled conditions for oxidation, with a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the peroxide index after 20 days of storage,



from  $2.38 \pm 0.18$  mEq/kg to  $250.10 \pm 1.96$  mEq/kg. The oxidative stability is related to the presence of polyunsaturated fatty acids in its composition, such as oleic (C18:1), linoleic (C18:2) and linolenic acids (C18:3), and when exposed to light, oxygen or temperature can undergo reactions and form oxidation products (Turgut Dunford, 2015). As expected, the sample stored without packaging (WP) presented fast and higher oxidation, behavior related to direct contact with oxygen, temperature and no light barrier.

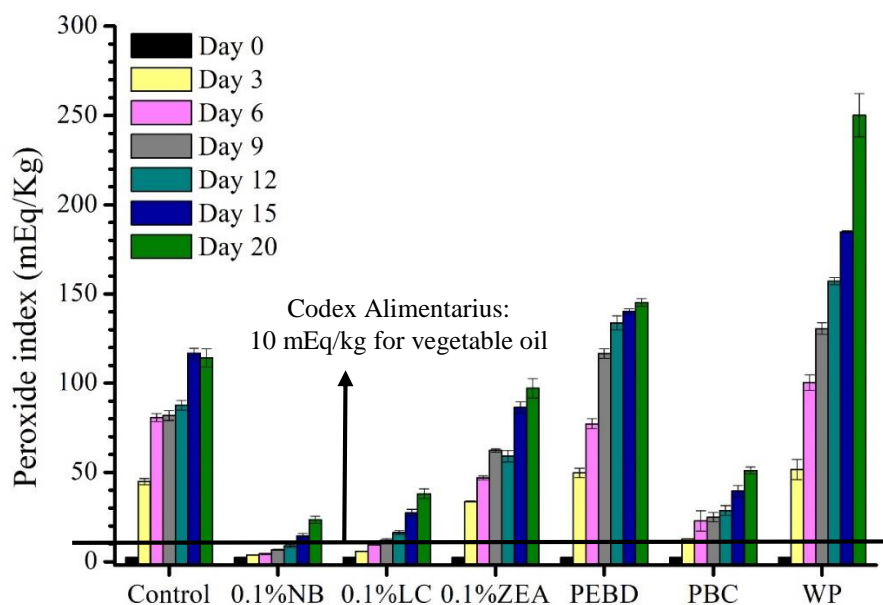


Figure 7. Peroxide index of sunflower oil stored in different packaging.

However, the oil stored in the cellulose acetate films with the addition of 0.1% norbixin or lycopene showed higher stability during storage, with the lower formation of primary oxidation products. The addition of these carotenoids provided a higher barrier to light transmission through the films (Figure 2), in which foods with a high content of polyunsaturated fatty acids are susceptible to photooxidation reactions. Another factor that may be associated is that these pigments may have acted as antioxidants and inhibited oxidation, as the possible migration/interaction of the packaging with the sample. On day 9 of storage, the oil showed a peroxide index of  $6.69 \pm 0.27$  mEq/kg and  $12.02 \pm 0.80$  mEq/kg for 0.1%NB and 0.1%LC films, respectively; with significant difference between the samples ( $p < 0.05$ ) and above the limit of 10 mEq/kg for vegetable oils according to the Codex Alimentarius for 0.1%LC film (Codex-Alimentarius, 1999). Only on day 15, the 0.1%NB film showed peroxide index ( $14.25 \pm 1.54$  mEq/kg) above that established by legislation, while 0.1%LC film had  $27.31 \pm 1.98$  mEq/Kg.

Behavior not observed for the film 0.1%ZEA, with peroxide index of  $33.73 \pm 0.29$  mEq/kg on day 3. This effect may be related to the lower stability of zeaxanthin when compared to norbixin and lycopene, presented by color analysis of the films during storage (Figure 8). There was a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the luminosity of the film 0.1%ZEA, associated with a rapid decrease of the parameters  $a^*$  and  $b^*$  after three days of storage, with similar behavior to the control film for the oxidation of sunflower oil. The film 0.1%LC also presented an increase of luminosity and decrease of the parameters  $a^*$  and  $b^*$ ; however, the lycopene presented greater stability when compared to zeaxanthin. Among the films, 0.1%NB showed greater stability, a small variation of the color parameters and maintenance of the oxidative stability of the sunflower oil during storage.

With the variation of the color parameters there was an increase of the light transmission through the films (Figure 8D), but with a small variation for the film 0.1%NB when compared with films 0.1%LC and 0.1%ZEA, in which norbixin presented greater stability when added to the polymer matrix and sunflower oil during storage.

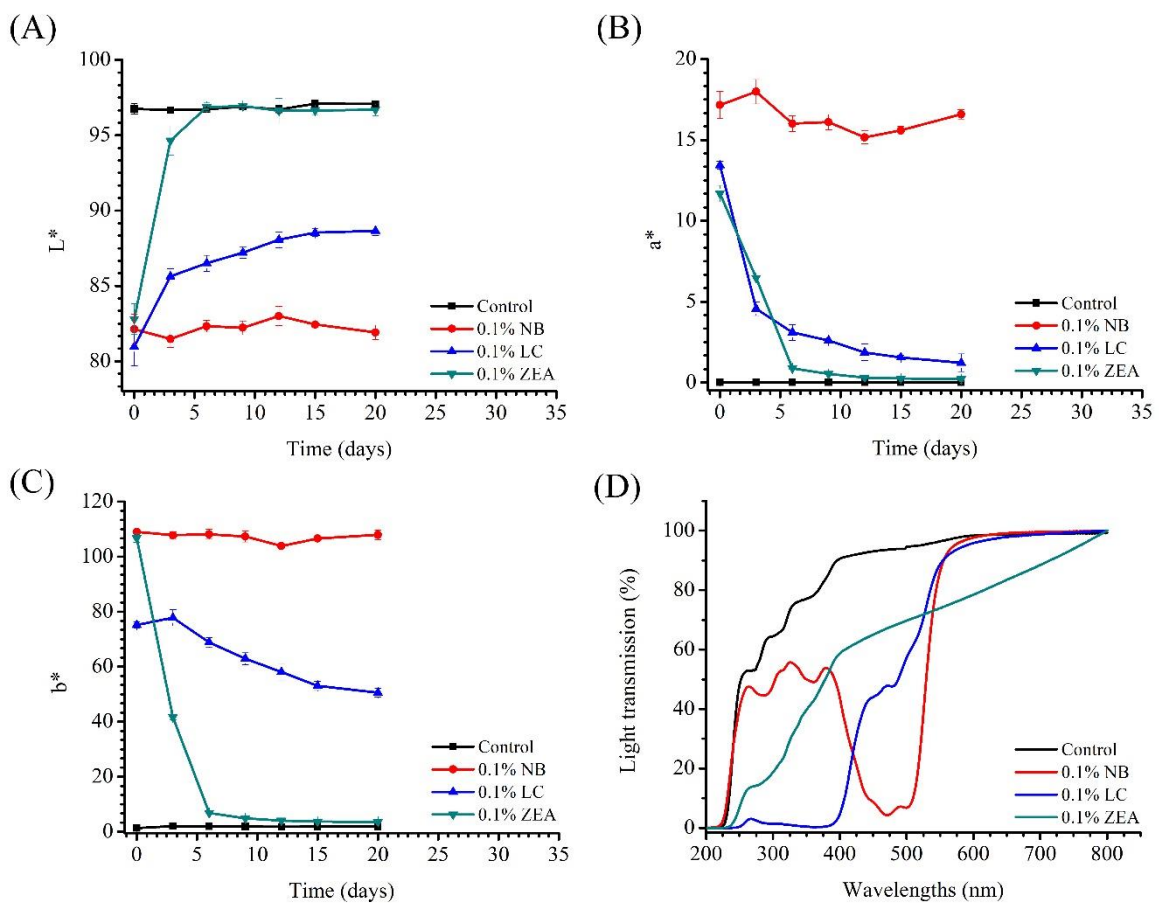


Figure 8. Color of the films:  $L^*$  (A),  $a^*$  (B),  $b^*$  (C) during storage of sunflower oil and light transmission (D) at the end of storage.

In the evaluation of stability of olive oil packed in cassava starch films with addition of 8% of anthocyanin microcapsules for 12 days (40 °C and 900-1000 lux), Stoll et al. (2017) reported that the addition of these natural antioxidants presented a higher barrier to the light transmission UV-Vis when compared to the control film. Besides, the active biodegradable film showed higher stability to the oil during storage, with a peroxide index of  $13.58 \pm 0.17$  mEq/kg and  $24.18 \pm 0.29$  mEq/kg after 8 and 12 days, respectively; with a content above that established by the Codex Alimentarius ( $\leq 20$  mEq/kg) only at the end of the study. This behavior was associated with the possible antioxidant effect of the film and good barrier to oxygen, similar to that observed for 0.1% addition of norbixin or lycopene, which presented greater oxidative protection to sunflower oil.

During the storage, the content of conjugated dienes and trienes was also evaluated (Figure 9). The determination of conjugated dienes (232 nm) is related to the formation of primary oxidation compounds, the result of changing the position of the double bond during the oxidation process and formation of hydroperoxides, while conjugated trienes (268 nm) indicate the formation of secondary oxidation compounds (such as aldehydes and ketones). The evaluation of these compounds, along with the peroxide index, shows stability and the oxidation stages of the oil (Malheiro et al., 2013; Ramadan, 2013; Silva et al., 2010). The formation of conjugated dienes presented a behavior similar to that observed for the peroxide index (primary oxidation products), with a significant increase at the end of storage ( $p < 0.05$ ), from  $1.11 \pm 0.10$  g/100 g to  $23.69 \pm 1.74$  g/100g. All the samples presented a gradual increase, with greater protective effect in the following order: 0.1%NB > 0.1%LC > PET > 0.1%ZEA > Control > LDPE > WP. However, as samples 0.1% NB and 0.1% LC presented lower IP, consequently, there was a lower formation of conjugated dienes when compared to the other treatments.

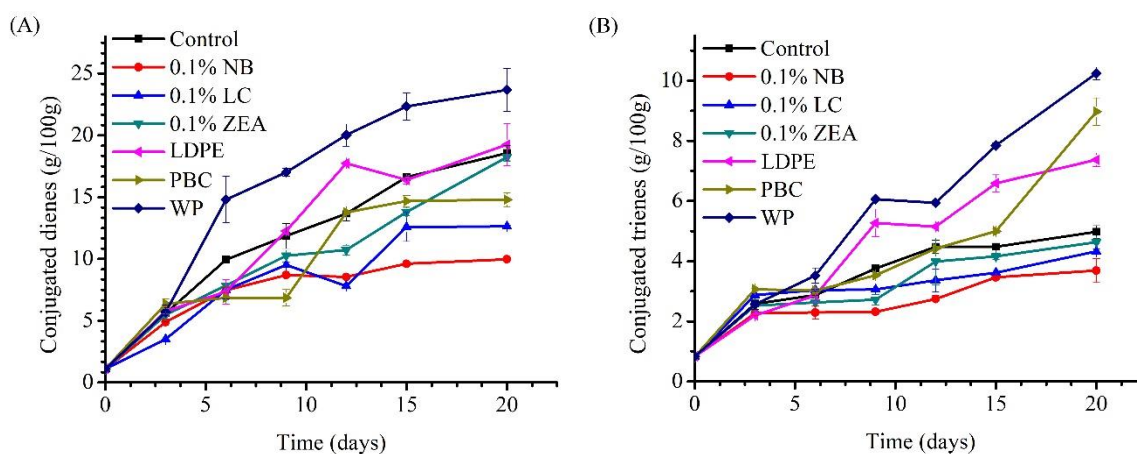


Figure 9. Conjugated dienes (a) and conjugated trienes (b) during storage of sunflower oil.

For conjugated trienes, there was also a significant increase at the end of the study, from  $0.83 \pm 0.01$  g/100g to  $10.24 \pm 1.21$  g/100g. However, there was a higher formation of primary oxidation products than by-products, which is related to higher PI and conjugated dienes. As expected, this behavior is again associated with greater stability of norbixin and lycopene when compared to the addition of 0.1% zeaxanthin and controls used.

#### **4. Conclusion**

The cellulose acetate associated with casting technique can be used to obtain transparent films with uniform and cohesive structure. The addition of natural antioxidants (such as norbixin, zeaxanthin, or lycopene) demonstrated potential application in the development of films with antioxidant activity, in which the concentrations used influenced the properties of films. However, the addition of 0.1% showed the best results according to the physicochemical and barrier properties of the films. Films with norbixin or lycopene showed higher protection during the storage of sunflower oil under controlled oxidation conditions when compared with zeaxanthin, associated with the higher stability of these pigments. Films with norbixin or lycopene presented the lower formation of oxidation products during the storage of sunflower oil when compared to zeaxanthin, associated with the higher stability of these pigments. According to these results, the films of cellulose acetate with the addition of norbixin or lycopene can present potential applications as active packaging for foods with high lipid content.

#### **Acknowledgements**

The research was supported by funds of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Process Number 400056/2016-0) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS-Process Number 17/2551-0000911-8). Authors are grateful to Electron Microscopy Center (CME) and Mauro Ricardo da Silva Silveira of Laboratório de Materiais Poliméricos (LaPol) of Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) for technical assistance.

## References

- Adilah, A.N., Jamilah, B., Noranizan, M.A., Hanani, Z.A.N., 2018. Utilization of mango peel extracts on the biodegradable films for active packaging. *Food Packag. Shelf Life* 16, 1–7. doi:10.1016/j.fpsl.2018.01.006
- AOCS, 1994. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. AOCS Press. 4th edn, 2–5. doi:http://dx.doi.org/10.1002/0471740039.vec0152
- Assis, R.Q., Lopes, S.M., Costa, T.M.H., Flôres, S.H., Rios, A. de O., 2017. Active biodegradable cassava starch films incorporated lycopene nanocapsules. *Ind. Crops Prod.* 109, 818–827. doi:10.1016/j.indcrop.2017.09.043
- ASTM, 2012. ASTM D882- 12 Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, ASTM. doi:10.1520/D0882-12.2
- ASTM, 2000. ASTM E96-95 Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials, ASTM. doi:10.1520/D1653-03R08.2
- Bolumar, T., Andersen, M.L., Orlien, V., 2011. Antioxidant active packaging for chicken meat processed by high pressure treatment. *Food Chem.* 129, 1406–1412. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.082
- Carvalho, D. de M., Takeuchi, K.P., Geraldine, R.M., Moura, C.J. de, Silveira, M.F.A., 2017. Filme ativo de acetato de celulose incorporado com nanosuspensão de curcumina TT - Active film of cellulose acetate incorporated with nanosuspension of curcumin. *Polímeros* 27, 70–76. doi:10.1590/0104-1428.2232
- Codex-Alimentarius, 1999. Codex Alimentarius, in: Codex Standard for Named Vegetable Oils. Codex-Stan, Rome, p. 210.
- Dannenber, G. da S., Funck, G.D., Cruxen, C.E. dos S., Marques, J. de L., Silva, W.P. da, Fiorentini, Â.M., 2017. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese. *LWT - Food Sci. Technol.* 81, 314–318. doi:10.1016/j.lwt.2017.04.002
- de Campo, C., Dick, M., Pereira dos Santos, P., Haas Costa, T.M., Paese, K., Stanisçuaski Guterres, S., de Oliveira Rios, A., Hickmann Flôres, S., 2018. Zeaxanthin nanoencapsulation with *Opuntia monacantha* mucilage as structuring material: Characterization and stability evaluation under different temperatures. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 558, 410–421. doi:10.1016/j.colsurfa.2018.09.009

- de Freitas, R.R.M., Senna, A.M., Botaro, V.R., 2017. Influence of degree of substitution on thermal dynamic mechanical and physicochemical properties of cellulose acetate. *Ind. Crops Prod.* 109, 452–458. doi:10.1016/j.indcrop.2017.08.062
- de Oliveira Rios, A., Mercadante, A.Z., 2004. Novel method for the determination of added annatto colour in extruded corn snack products. *Food Addit. Contam.* 21, 125–133. doi:10.1080/02652030310001642771
- Do Socorro Rocha Bastos, M., Da Silva Laurentino, L., Canuto, K.M., Mendes, L.G., Martins, C.M., Silva, S.M.F., Furtado, R.F., Kim, S., Biswas, A., Cheng, H.N., 2016. Physical and mechanical testing of essential oil-embedded cellulose ester films. *Polym. Test.* 49, 156–161. doi:10.1016/j.polymertesting.2015.11.006
- dos Santos, P.P., Paese, K., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., Costa, T.H., Jablonski, A., Flôres, S.H., Rios, A. de O., 2015. Development of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability study. *J. Nanoparticle Res.* 17. doi:10.1007/s11051-015-2917-5
- Ferrarezi, M.M.F., Rodrigues, G.V., Felisberti, M.I., Gonçalves, M.D.C., 2013. Investigation of cellulose acetate viscoelastic properties in different solvents and microstructure. *Eur. Polym. J.* 49, 2730–2737. doi:10.1016/j.eurpolymj.2013.06.007
- Fратиани, A., Niro, S., Alam, M.D.R., Cinquanta, L., Di Matteo, M., Adiletta, G., Panfili, G., 2018. Effect of a physical pre-treatment and drying on carotenoids of goji berries (*Lycium barbarum* L.). *LWT - Food Sci. Technol.* 92, 318–323. doi:10.1016/j.lwt.2018.02.048
- Ge, L., Zhu, M., Li, X., Xu, Y., Ma, X., Shi, R., Li, D., Mu, C., 2018. Development of active rosmarinic acid-gelatin biodegradable films with antioxidant and long-term antibacterial activities. *Food Hydrocoll.* 83, 308–316. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.04.052
- Gonçalves, S.M., dos Santos, D.C., Motta, J.F.G., Santos, R.R. dos, Chávez, D.W.H., Melo, N.R. de, 2019. Structure and functional properties of cellulose acetate films incorporated with glycerol. *Carbohydr. Polym.* 209, 190–197. doi:10.1016/j.carbpol.2019.01.031
- González, K., Retegi, A., González, A., Eceiza, A., Gabilondo, N., 2015. Starch and cellulose nanocrystals together into thermoplastic starch bionanocomposites. *Carbohydr. Polym.* 117, 83–90. doi:10.1016/j.carbpol.2014.09.055
- Gutierrez, J., Carrasco-Hernandez, S., Barud, H.S., Oliveira, R.L., Carvalho, R.A., Amaral, A.C., Tercjak, A., 2017. Transparent nanostructured cellulose acetate films based on the self assembly of PEO-b-PPO-b-PEO block copolymer. *Carbohydr. Polym.* 165, 437–443. doi:10.1016/j.carbpol.2017.02.070

- Hanani, Z.A.N., Yee, F.C., Nor-Khaizura, M.A.R., 2019. Effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel powder on the antioxidant and antimicrobial properties of fish gelatin films as active packaging. *Food Hydrocoll.* 89, 253–259. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.10.007
- Kendouli, S., Khalfallah, O., Sobti, N., Bensouissi, A., Avci, A., Eskizeybek, V., Achour, S., 2014. Modification of cellulose acetate nanofibers with PVP/Ag addition. *Mater. Sci. Semicond. Process.* 28, 13–19. doi:10.1016/j.mssp.2014.03.010
- Löbmann, K., Svagan, A.J., 2017. Cellulose nanofibers as excipient for the delivery of poorly soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 533, 285–297. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.09.064
- Malheiro, R., Casal, S., Teixeira, H., Bento, A., Pereira, J.A., 2013. Effect of Olive Leaves Addition during the Extraction Process of Overmature Fruits on Olive Oil Quality. *Food Bioprocess Technol.* 6, 509–521. doi:10.1007/s11947-011-0719-z
- Meier, M.M., Kanis, L.A., de Lima, J.C., Pires, A.T.N., Soldi, V., 2004. Poly(caprolactone triol) as plasticizer agent for cellulose acetate films: Influence of the preparation procedure and plasticizer content on the physico-chemical properties. *Polym. Adv. Technol.* 15, 593–600. doi:10.1002/pat.517
- Mercadante, A.Z., Rodriguez-Amaya, D.B., 1998. Effects of Ripening, Cultivar Differences, and Processing on the Carotenoid Composition of Mango. *J. Agric. Food Chem.* 46, 128–130. doi:10.1021/jf9702860
- Moreira, S., Cardial, D., Fagundes, J., Motta, G., Ribeiro, R., William, D., Chávez, H., Ramos, N., Melo, D., 2019. Structure and functional properties of cellulose acetate films incorporated with glycerol. *Carbohydr. Polym.* 209, 190–197. doi:10.1016/j.carbpol.2019.01.031
- Muller, J., González-Martínez, C., Chiralt, A., 2017. Poly(lactic) acid (PLA) and starch bilayer films, containing cinnamaldehyde, obtained by compression moulding. *Eur. Polym. J.* 95, 56–70. doi:10.1016/j.eurpolymj.2017.07.019
- Nagarajan, J., Krishnamurthy, N.P., Ramanan Ramakrishnan, N., Raghunandan, M.E., Galanakis, C., Chien Wei, O., 2019. A facile water-induced complexation of lycopene and pectin from pink guava byproduct: extraction, characterization and kinetic studies. *Food Chem.* 296, 47–55. doi:10.1016/j.foodchem.2019.05.135
- Noshirvani, N., Ghanbarzadeh, B., Gardrat, C., Rezaei, M.R., Hashemi, M., Le Coz, C., Coma, V., 2017. Cinnamon and ginger essential oils to improve antifungal, physical and mechanical properties of chitosan-carboxymethyl cellulose films. *Food Hydrocoll.* 70, 36–45. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.03.015

- Nunes, I.L., Mercadante, A.Z., 2004. Obtenção de cristais de licopeno a partir de descarte de tomate. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 24, 440–447. doi:10.1590/S0101-20612004000300024
- Oberoi, D.P.S., Sogi, D.S., 2017. Utilization of watermelon pulp for lycopene extraction by response surface methodology. *Food Chem.* 232, 316–321. doi:10.1016/j.foodchem.2017.04.038
- Pagno, C.H., de Farias, Y.B., Costa, T.M.H., Rios, A. de O., Flôres, S.H., 2016. Synthesis of biodegradable films with antioxidant properties based on cassava starch containing bixin nanocapsules. *J. Food Sci. Technol.* 1–9. doi:10.1007/s13197-016-2294-9 LB - Pagno2016
- Pedro, A.C., Maurer, J.B.B., Zawadzki-Baggio, S.F., Ávila, S., Maciel, G.M., Haminiuk, C.W.I., 2018. Bioactive compounds of organic goji berry (*Lycium barbarum* L.) prevents oxidative deterioration of soybean oil. *Ind. Crops Prod.* 112, 90–97. doi:10.1016/j.indcrop.2017.10.052
- Piñeros-Hernandez, D., Medina-Jaramillo, C., López-Córdoba, A., Goyanes, S., 2017. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocoll.* 63, 488–495. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.034
- Pola, C.C., Medeiros, E.A.A., Pereira, O.L., Souza, V.G.L., Otoni, C.G., Camilloto, G.P., Soares, N.F.F., 2016. Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. *Food Packag. Shelf Life* 9, 69–78. doi:10.1016/j.fpsl.2016.07.001
- Qin, Y., Liu, Y., Yong, H., Liu, J., Zhang, X., Liu, J., 2019. Preparation and characterization of active and intelligent packaging films based on cassava starch and anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. *Int. J. Biol. Macromol.* 134, 80–90. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.05.029
- Ramadan, M.F., 2013. Healthy blends of high linoleic sunflower oil with selected cold pressed oils: Functionality, stability and antioxidative characteristics. *Ind. Crops Prod.* 43, 65–72. doi:10.1016/j.indcrop.2012.07.013
- Rambabu, K., Bharath, G., Banat, F., Show, P.L., Cocolletzi, H.H., 2019. Mango leaf extract incorporated chitosan antioxidant film for active food packaging. *Int. J. Biol. Macromol.* 126, 1234–1243. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.196



- Rizk, E.M., El-Kady, A.T., El-Bialy, A.R., 2014. Characterization of carotenoids (lyco-red) extracted from tomato peels and its uses as natural colorants and antioxidants of ice cream. *Ann. Agric. Sci.* 59, 53–61. doi:10.1016/j.aosas.2014.06.008
- Rodríguez, F.J., Galotto, M.J., Guarda, A., Bruna, J.E., 2012. Modification of cellulose acetate films using nanofillers based on organoclays, in: *Journal of Food Engineering*. pp. 262–268. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.05.004
- Saha, N.R., Roy, I., Sarkar, G., Bhattacharyya, A., Das, R., Rana, D., Banerjee, R., Paul, A.K., Mishra, R., Chattopadhyay, D., 2018. Development of active packaging material based on cellulose acetate butyrate/polyethylene glycol/aryl ammonium cation modified clay. *Carbohydr. Polym.* 187, 8–18. doi:10.1016/j.carbpol.2018.01.065
- Scotter, M., 2009. The chemistry and analysis of annatto food colouring: A review. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 26, 1123–1145. doi:10.1080/02652030902942873
- Silva, L., Pinto, J., Carrola, J., Paiva-Martins, F., 2010. Oxidative stability of olive oil after food processing and comparison with other vegetable oils. *Food Chem.* 121, 1177–1187. doi:10.1016/j.foodchem.2010.02.001
- Smith, T.J., Li, X.E., Drake, M.A., 2014. Short communication: Norbixin and bixin partitioning in Cheddar cheese and whey. *J. Dairy Sci.* 97, 3321–3327. doi:10.3168/jds.2013-7614
- Solymosi, K., Latruffe, N., Morant-Manceau, A., Schoefs, B., 2015. Food colour additives of natural origin, *Colour Additives for Foods and Beverages*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/B978-1-78242-011-8.00001-5
- Stoll, L., Martins, A., Oliveira, A., Rios, D.O., Maria, T., Costa, H., Hickmann, S., 2017. Active biodegradable film with encapsulated anthocyanins: Effect on the quality attributes of extra-virgin olive oil during storage. *J. Food Process. Preserv.* 1–8. doi:10.1111/jfpp.13218
- Stoll, L., Rech, R., Flôres, S.H., Nachtigall, S.M.B., de Oliveira Rios, A., 2018. Carotenoids extracts as natural colorants in poly(lactic acid) films. *J. Appl. Polym. Sci.* 135. doi:10.1002/app.46585
- Suwanaruang, T., 2016. Analyzing Lycopene Content in Fruits. *Agric. Agric. Sci. Procedia* 11, 46–48. doi:10.1016/j.aaspro.2016.12.008
- Tedeschi, G., Guzman-puyol, S., Paul, U.C., Barthel, M.J., 2018. Thermoplastic cellulose acetate oleate films with high barrier properties and ductile behaviour. *Chem. Eng. J.* 348, 840–849. doi:10.1016/j.cej.2018.05.031

- Tupuna, D.S., Paese, K., Guterres, S.S., Jablonski, A., Flôres, S.H., Rios, A. de O., 2018. Encapsulation efficiency and thermal stability of norbixin microencapsulated by spray-drying using different combinations of wall materials. *Ind. Crops Prod.* 111, 846–855. doi:10.1016/j.indcrop.2017.12.001
- Turgut Dunford, N., 2015. Oxidative Stability of Sunflower Seed Oil, in: *Sunflower*. Elsevier, pp. 465–489. doi:10.1016/B978-1-893997-94-3.50021-0
- Wang, W., Jung, J., Zhao, Y., 2017. Chitosan-cellulose nanocrystal microencapsulation to improve encapsulation efficiency and stability of entrapped fruit anthocyanins. *Carbohydr. Polym.* 157, 1246–1253. doi:10.1016/j.carbpol.2016.11.005
- Woranuch, S., Yoksan, R., Akashi, M., 2015. Ferulic acid-coupled chitosan: Thermal stability and utilization as an antioxidant for biodegradable active packaging film. *Carbohydr. Polym.* 115, 744–751. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.074
- Wu, Y., Li, Q., Zhang, X., Li, Y., Li, B., Liu, S., 2019. Cellulose-based peptidopolysaccharides as cationic antimicrobial package films. *Int. J. Biol. Macromol.* 128, 673–680. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.01.172
- Wu, Y., Luo, X., Li, W., Song, R., Li, J., Li, Y., Li, B., Liu, S., 2016. Green and biodegradable composite films with novel antimicrobial performance based on cellulose. *Food Chem.* 197, 250–256. doi:10.1016/j.foodchem.2015.10.127
- Xia, G., Wan, J., Zhang, J., Zhang, X., Xu, L., Wu, J., 2016. Cellulose-based films prepared directly from waste newspapers via an ionic liquid. *Carbohydr. Polym.* 151, 223–229. doi:10.1016/j.carbpol.2016.05.080
- Zizovic, I., Senerovic, L., Moric, I., Adamovic, T., Jovanovic, M., Krusic, M.K., Misic, D., Stojanovic, D., Milovanovic, S., 2018. Utilization of supercritical carbon dioxide in fabrication of cellulose acetate films with anti-biofilm effects against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *J. Supercrit. Fluids* 140, 11–20. doi:10.1016/j.supflu.2018.05.025

## **ARTIGO 2: Active food packaging of cellulose acetate: storage stability, protective effect on oxidation of riboflavin and release in food simulants**

Artigo publicado na revista 'Food Chemistry'

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129140>

Renato Queiroz Assis<sup>a</sup>, Carlos Henrique Pagno<sup>a</sup>, Liana Stoll<sup>a</sup>, Polliana D'Angelo Rios<sup>b</sup>, Alessandro de Oliveira Rios<sup>a\*</sup>, Florencia Cladera Olivera<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Food Science, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Campus do Vale, 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Forest Engineering, State University of Santa Catarina (UDESC), Av. Luiz de Camões, 2090, 88520-000, Lages, Santa Catarina, Brazil.

### **Abstract**

In this work, cellulose acetate films were prepared with the incorporation of different carotenoids (lycopene, norbixin, and zeaxanthin). The effect of adding these natural antioxidants was evaluated through stability during storage under controlled conditions (temperature and light), degradation rate coefficient, release in food simulants and protective effect on oxidation of vitamin B<sub>2</sub>. During storage at 25 °C or 40 °C the light showed a greater effect on the stability of the carotenoids, with significant increase in reaction constants ( $k$ ) and decrease in half-life ( $t_{1/2}$ ). The degradation of the carotenoids was followed by a variation in the color parameters and mechanical properties. The films with norbixin showed the highest barrier to the transmission of UV-Vis light, consequently preserving 72% of a vitamin B<sub>2</sub> stored under a photooxidative environment. Lycopene presented a higher release rate than norbixin and zeaxanthin to a fatty food simulant.

**Keywords:** Active packaging; Carotenoids; Release; Barrier properties; Stability; Storage.

## 1. Introduction

The development of biodegradable packaging from biopolymers may be an alternative to the use of conventional plastic packaging, normally non-biodegradable and obtained from non-renewable sources. One of the polymers that can be used to obtain biodegradable packaging is cellulose acetate, produced from the acetylation of cellulose, which presents properties to form a continuous matrix and visual appearance similar to plastic packaging (Edgar Buchanan, C.M., Debenham, J.S., Rundquist, P.A., Seiler, B.D., Shelton, M.C., Tindall, D., 2001; Fischer et al., 2008).

The traditional food packaging has the essential function of protecting food from its production to consumption. However, they can also act as carriers for bioactive compounds such as antioxidants, where its release to food products can increase food stability during storage. Several natural compounds are evaluated to obtain active packaging, such as the addition of essential oils (Perdones et al., 2016), mango peel extract (Adilah et al., 2018), phenolic compounds (Choi et al., 2018), green tea extract (Medina-Jaramillo et al., 2017), alpha tocopherol (Noronha et al., 2014), anthocyanins (Stoll et al., 2017) and carotenoids (Assis et al., 2020; Pagno et al., 2016; Stoll et al., 2018).

Carotenoids, one of the numerous natural antioxidants used in active packaging development, are compounds characterized by color conferring and high antioxidant activity, easily found and/or obtained from fruits and vegetables. Different carotenoids can be incorporated to active packaging, such as norbixin, lycopene, and zeaxanthin, which present coloring and antioxidant properties. The norbixin ( $C_{24}H_{28}O_4$ ), pigment obtained from bixin conversion in the presence of a strong base (NaOH or KOH), is found in annatto seed (*Bixa orellana* L.) and is commonly used as a natural food coloring (Kovary et al., 2001; Rodriguez-Amaya, 2001). The lycopene is a red pigment found in higher concentration in tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.), (Cámara et al., 2013; Siwach et al., 2016), while the zeaxanthin is a natural yellow pigment present in high concentration in goji berry (*Lycium barbarum* L.) and some other sources (de Campo et al., 2018; Fratianni et al., 2018).

The use of active packaging containing natural pigments has advantages such as controlled release of bioactive compounds over time and protective effect against oxidation and/or photooxidation of food constituents. Besides that, the use of natural pigments on the replacement of artificial synthetic antioxidants is highly desirable (Medina-Jaramillo et al., 2017; Noronha et al., 2014).

In addition, it is important to evaluate the stability of packaging under different conditions (temperature, light and humidity). The physicochemical properties of films can be affected throughout storage by intra and/or intermolecular bonding of the polymer matrix, and degradation of natural antioxidants added (Maryam Adilah & Nur Hanani, 2019). Thus, establishing the antioxidant-polymer matrix interaction is important to determine the controlled release of these compounds to food and food simulant liquids and to evaluate the protective effect of compounds present in foods that are susceptible to degradation, such as vitamins and fatty acids (Malherbi et al., 2019; Stoll et al., 2019).

One of the vitamins that is stable to heat and present low stability to photo-oxidation is vitamin B<sub>2</sub>, known as Riboflavin. The best-known source of this vitamin is milk and dairy products, but it can also be found in meats, grains, vegetables and fruits. The photo-oxidation reaction can lead to a significant loss of riboflavin in milk, which can present loss of up to 80% of this micronutrient when exposed to light (Bitsch & Bitsch, 2016; Combs & McClung, 2017; Nohr & Biesalski, 2016). Thus, an alternative to increase the stability of these oxygen- and light-sensitive compounds in food may be the use of packaging added with natural antioxidants. The objective of this work was to evaluate the stability of cellulose acetate films incorporated with different carotenoids (lycopene, norbixin, and zeaxanthin) during storage under controlled conditions of light and temperature. The carotenoids release into food simulants and the protective effect of active films on the oxidation of vitamin B<sub>2</sub> (Riboflavin) were also evaluated.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Materials**

Tomatoes, goji berry, and annatto seeds were purchased from local market in Porto Alegre, Brazil. Cellulose acetate (SD = 2.5; MW= 2,024,000 g mol<sup>-1</sup>) was supplied by Rhodia Acetow (Santo André, São Paulo, Brazil). All reagents used were of analytical grade.

### **2.2. Obtaining natural antioxidants**

#### **2.2.1 Norbixin**

Norbixin was obtained from the extraction and conversion of bixin from annatto seeds (*Bixa orellana* L.). The seeds (25 g) were subjected to two washes with hexane (50 mL),

filtered, and washed with methanol (50 mL). After this step, bixin was obtained through two consecutive extractions with ethyl acetate (50 mL), where all steps were performed under magnetic stirring for 15 minutes. The extract was filtered, dried in a rotary evaporator under reduced pressure ( $T < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Fisatom model 801/802, São Paulo, SP, Brazil), and added with 50 mL of methanolic potassium hydroxide solution (10 %) for conversion of bixin into norbixin (12 h -  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). The extract was washed in a separatory funnel containing distilled water (50 mL), ethyl ether (50 mL), and the pH was adjusted to 3 by the addition of acetic acid (transfer of norbixin to the organic phase). Subsequently, the extract was washed with distilled water until pH 6, dried in a rotary evaporator and stored at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Rios and Mercadante, 2004).

### 2.2.2 Lycopene

Lycopene was extracted from tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) according to the methodology described by Nunes and Mercadante (2004). Ethyl acetate was used as the extraction solvent (1000 mL), where the samples were cut (700 g), separated from the seeds and submitted to two consecutive extractions under mechanical agitation (120 min). After each extraction the obtained extract was filtered, concentrated in a rotary evaporator (Fisatom model 801/802, São Paulo, SP, Brazil), transferred to an amber flask, dried under nitrogen flow and stored until use ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

### 2.2.3 Zeaxanthin

Zeaxanthin was obtained by the methodology described by De Campo et al. (2018), in which goji berry (*Lycium barbarum* L.) was used as the source of this pigment. Extraction was performed by homogenization (30s at 7000 rpm) in an Ultra-Turrax<sup>®</sup> (IKA, model T25, China), where 1 g of sample was placed in a falcon tube and added with ice-cold acetone (25 mL). The extraction process was performed approximately 6 times for each 1 g sample. After extraction, the extract was concentrated in a rotary evaporator (Fisatom model 801/802, São Paulo, SP, Brazil), transferred to an amber flask, dried under nitrogen flow and stored until use ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

## 2.3. Production of active cellulose acetate films with different carotenoids

The active cellulose acetate films were obtained by solubilizing the polymer in acetone (3 g cellulose acetate/100 mL acetone), at room temperature and mechanical stirring for 4h.

After complete solubilization of the polymer, the carotenoids norbixin, lycopene, and zeaxanthin were added to solutions at the concentration of 1 % (carotenoid mass related to polymer dry matter). The solutions were kept under stirring (15 min) for homogenization and were placed in glass plates ( $0.39 \text{ g/cm}^2$ ) which were then subjected to drying for 24 h under controlled conditions ( $25 \text{ }^\circ\text{C} - 30 \text{ \% RH}$ ) (Assis et al., 2020)

#### 2.4 Stability of films during storage

The films were stored under controlled conditions of light (under dark and  $4.7 \pm 0.2$  klux) and temperature ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ); were evaluated by their color, mechanical properties and carotenoid concentration. The color parameters were determined through the CIELab scale ( $L^*$ : lightness,  $a^*$ : redness, and  $b^*$ : yellowness), using a Minolta colorimeter (model CR-300, MinoltaCo Ltd., Japan). The tensile strength and elongation at break were determined according to the American Society for Testing and Materials D882-2012 (ASTM, 2012). For determination of the carotenoid content, sample films ( $2.5 \text{ cm} \times 6 \text{ cm}$ ) were placed in falcon tubes, added with acetone (10 mL) and subjected to magnetic stirring until complete solubilization of the polymer. After this step, the obtained solution was added with petroleum ether (10 mL), vortexed (2 min) and centrifuged for 5 min (5000 g) (Hitachi, model CR 21GIII, Japan) for phase separation and precipitation of polymer. An aliquot of the supernatant was removed, dried under nitrogen flow, added the reference solvent and the concentration determined through a spectrophotometer. The following parameters were used: norbixin ( $\lambda_{\text{max}}$ : 453 nm;  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ : 3473), lycopene ( $\lambda_{\text{max}}$ : 470 nm;  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ : 3450) e zeaxanthin ( $\lambda_{\text{max}}$ : 449 nm;  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ : 2348). An aqueous solution of KOH (0.5 %) was used as a solvent for the quantification of norbixin, related to its hydrophilic character (Rios & Mercadante, 2004). While for lycopene and zeaxanthin, hydrophobic carotenoids with solubility in organic solvents, petroleum ether was used (Rodriguez-Amaya, 2001). Both solvents were used as respective blank before reading on the spectrophotometer. The  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  indicates the absorption coefficient of a carotenoid in a specific solvent, a value used to calculate its content present in the solution, and is related to the absorbance at a given wavelength of a 1% solution in a cuvette with a 1 cm optical path. The degradation rate coefficient of the amount of each carotenoid was calculated by using the following first-order kinetics model:

$$\ln C = \ln C_0 - kt$$

where  $C$  is the concentration of carotenoids at time  $t$ ,  $C_0$  is the initial concentration of carotenoids in the sample,  $k$  is the degradation rate constant ( $\text{days}^{-1}$ ), and  $t$  is time (days).

The half-life ( $t_{1/2}$ ) of each carotenoid was calculated as follows:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

## 2.5 Release of carotenoids in food simulants

In the migration analysis in food simulants, the size of the film sample was determined through preliminary tests and according to the methodology described by Stoll et al. (2019). While the use of 95% ethanol is established as fatty food simulant, according to Regulation (EU) No. 10/2011. Samples of films (2.5 cm x 6 cm) were placed in amber flasks with 15 mL of the simulant liquid, added with nitrogen to create an inert atmosphere and closed. The relationship between the dimension of the film and the volume of the simulant was based on determining the concentration of natural antioxidants released from the beginning at the end of the analysis (10 days), with a ratio of with an area/volume ratio of 1  $\text{cm}^2/\text{mL}$ . Carotenoid quantification in the food simulant was determined by constructing standard curves (absorbance x concentration) for each carotenoid in ethanol 95 %: lycopene from 0.25 to 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $R^2$ : 0.987;  $\lambda_{\text{max}}$ : 470 nm), norbixin from 0.25 to 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $R^2$ : 0.998;  $\lambda_{\text{max}}$ : 458 nm) and zeaxanthin from 0.3 to 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $R^2$ : 0.996;  $\lambda_{\text{max}}$ : 449 nm). The samples were stored under controlled temperature (25 °C and 40 °C) for 10 days without light and at predetermined times an aliquot (2 mL) was withdrawn for concentration quantification through a spectrophotometer. The result was expressed as the percentage of the natural antioxidant released at a predetermined time.

## 2.6 Protective effect of active films on the oxidation of vitamin B<sub>2</sub>

The evaluation of the protective effect of active biodegradable films as a barrier to the transmission of UV-Vis light was carried out by the stability of vitamin B<sub>2</sub> under exposure to light by the methodology described by Stancik et al. (2017) with some modifications. A phosphate buffer solution added with the standard of vitamin B<sub>2</sub> (30 mg/L) at pH 6.4 was prepared to simulate milk, since this food has riboflavin in its composition and is susceptible to



photo-oxidation. The films produced with different carotenoids were cut and positioned to cover the outside part of glass beakers (10 mL). The size of the film used was sufficient to cover the entire bottle containing the standard vitamin solution, in order to evaluate only the barrier to light transmission and not the interaction with the product (Supplementary Material – Figure S1). Each packing system contained 8 mL of a buffer solution with riboflavin, and the samples were stored in a chamber under controlled light and temperature conditions ( $4700 \pm 200$  lux and  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Aliquots (0.5 mL) were withdrawn at times of 90, 180, 270, and 350 min for quantification of the vitamin content.

The vitamin B2 was quantified by HPLC (Agilent® series 1100, Santa Clara, CA, USA) coupled with a degasser, quaternary pump, automatic injector and C18 column NovaPak® (4µm particle diameter, 300 x 3,9 mm). Chromatographic conditions: mobile phase composed of potassium phosphate buffer pH 7.2 with dimethylformamide 85:15 (v/v); isocratic run; flow rate of 1 mL/min; temperature of  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; fluorescence detector with excitation at 450 nm and emission at 530 nm; and run time of 10 min. The data were processed using ChemStation® software and the vitamin concentration was obtained through a calibration curve with a concentration range of 0.006 to 0.506 µg/mL,  $R^2$ : 0.9982, detection limits (LOD) of  $6.64 \times 10^{-9}$  mg/100 g and quantification (LOQ) of  $2.21 \times 10^{-8}$  mg/100 g. All reagents used were of chromatographic grade and previously vacuum filtered through a filtration membrane for organic solvents Millipore of 0.22 µm (Millipore, Barueri, São Paulo).

## 2.7 Statistical analyses

The results were evaluated by analysis of the variance (ANOVA) and Tukey test at a significance level of 5 % using the software Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA). The analyses were performed in triplicate, and the results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation.

## 3. Results and discussion

### 3.1 Stability of films under different storage conditions

#### 3.1.1 Carotenoid content

Figure 1 shows the changes in carotenoid content in cellulose acetate films stored at 25 °C and 40 °C with and without light. During the storage at 25 °C without light there was no significant difference ( $p < 0.05$ ) in carotenoids content until 20<sup>th</sup> day, with retention of  $96.49 \pm 3.95$  %,  $94.39 \pm 3.01$  % and  $93.68 \pm 3.90$  %, for norbixin, lycopene and zeaxanthin, respectively. However, the exposure to light caused a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in carotenoids content, mainly for films with lycopene ( $53.06 \pm 1.63$  %) and zeaxanthin ( $28.30 \pm 2.99$  %).

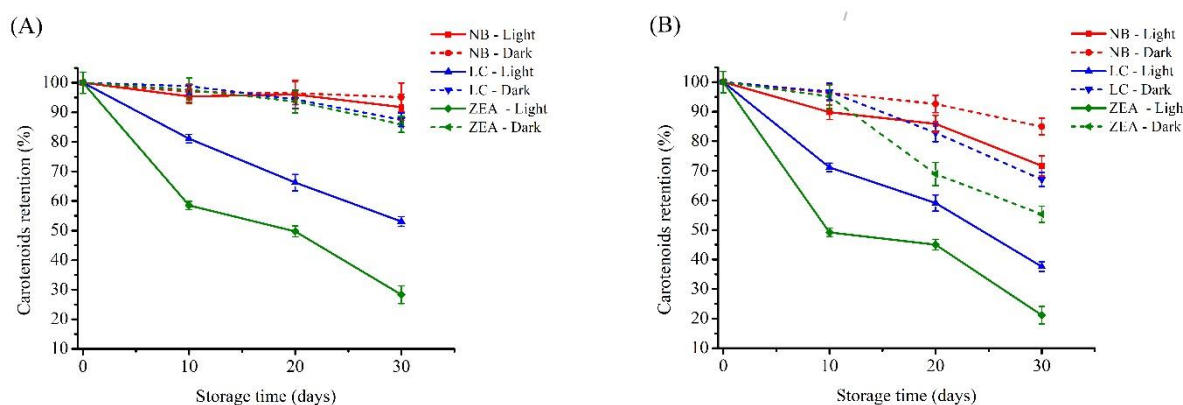


Figure 1 – Retention of carotenoids in active cellulose acetate films under different storage conditions: (A) 25 °C and (B) 40 °C.

In films stored at 40 °C a greater tendency of decrease in carotenoids content was observed for all films. Under the exposure to light, the degradation took place from the beginning of the period for all films, with a greater retention of norbixin ( $71.70 \pm 3.42$ %) when compared to lycopene ( $37.59 \pm 1.63$ %) and zeaxanthin ( $21.16 \pm 2.32$ %) after 30 days of storage. The degradation of carotenoids was observed in a lower intensity in the absence of light at the same temperature, presenting a retention of  $84.93 \pm 2.80$  %,  $67.06 \pm 2.32$  %, and  $55.31 \pm 2.70$  %, for norbixin, lycopene, and zeaxanthin, respectively after 30 days.

The results obtained in this study indicate that the light had a greater effect on the stability of the carotenoids for the two temperatures evaluated (25 °C or 40 °C). However, when stored under 40 °C there was a synergistic effect of these two factors (light + temperature), with greater and rapid degradation of the pigments. This behavior was also observed for reaction rate constants ( $k$ ) and half-life time ( $t_{1/2}$ ) (Table 1).

Table 1 – Reaction rate constants ( $k$ ) and half-life time ( $t_{1/2}$ ) values of degradation kinetics of carotenoid content in active cellulose acetate films under different storage conditions.

Temperature	Films	Condition	$k$	$R^2$	$t_{1/2}$ (days)
25 °C	Norbixin	Light	0.0027	0.941	257
		Dark	0.0016	0.989	433
	Lycopene	Light	0.021	0.978	33
		Dark	0.0045	0.926	154
	Zeaxanthin	Light	0.0395	0.963	18
		Dark	0.005	0.925	139
40 °C	Norbixin	Light	0.0104	0.942	67
		Dark	0.0053	0.952	131
	Lycopene	Light	0.0312	0.976	22
		Dark	0.0135	0.938	51
	Zeaxanthin	Light	0.0475	0.931	15
		Dark	0.021	0.939	33

The retention of carotenoids in films was described using the first order kinetics model, with  $R^2$  values varying between 0.925 and 0.989. The reduction in carotenoids content of films stored under light and heat exposure is easily observed when comparing the reaction values constants ( $k$ ) in Table 1. The results indicate the lower stability of these pigments to light than under dark conditions, especially when dealing with elevated lux levels as occurred in the present study.

For the half-life time values, which corresponds to the time where carotenoids initial concentration is reduced by 50 %, the exposure to light associated with elevated temperature led to a significant reduction in this parameter when compared to storage at 25 °C (Table 1). Norbixin showed lower  $k$  values and higher half-life in both treatments, demonstrating greater stability when compared to lycopene and zeaxanthin.

The differences found in the stability of these natural antioxidants are related to their susceptibility to conditions such as light, temperature, and oxygen. However, its stability can also be associated with the chemical structure, compatibility with the polymer matrix, and incorporation form (free form or encapsulated) (Assis et al., 2018; Stoll et al., 2018; Xiao et al., 2018). Comparing the chemical structures of the carotenoids used in this study, norbixin has

nine conjugated double bonds, while lycopene and zeaxanthin have eleven, where the last has a hydroxylated  $\beta$ -ionone ring at each end of the carbon chain. These conjugated double bonds are named of chromophore, a structure responsible for giving color to these compounds while promoting antioxidant activity, given to its ability to deactivate free radicals (such as reactive oxygen and nitrogen species) (Rodriguez-amaya, 2001). However, the increase in the number of conjugated double bonds can make these natural antioxidants more susceptible to oxidation and isomerization, reactions that can lead to degradation, change in configuration (*all trans*-carotenoids to *cis*-carotenoids), and loss of color (Xiao et al., 2018).

The presence of light can induce photooxidation, in which the reactions of isomerization and degradation occur in parallel, with a decrease in the content of carotenoids. Associated with this reaction, the presence of functional groups and the high number of conjugated double bonds can decrease the stability of these compounds, which makes them more reactive (Calvo & Santa-María, 2008; Li et al., 2015). Thus, the better stability of norbixin may be related to its chemical structure, characterized by the absence of rings and a lower carbon chain. These molecular characteristics may explain lower reaction rate constants and consequently higher half-life when compared to lycopene and zeaxanthin in both storage systems.

The results of this study are similar to those observed by Stoll et al. (2018), who evaluated the stability of different carotenoids (lycopene, bixin, and  $\beta$ -carotene) in poly (lactic acid) films (100  $\mu$ g carotenoids/g biopolymer). The authors observed a greater stability of natural antioxidants when the films were stored at 25 °C without light, with lower bixin loss (4.8 %) when compared to films added with lycopene (7.6 %) and  $\beta$ -carotene (23.5 %).

### 3.1.2 Color

The addition of norbixin, lycopene or zeaxanthin showed an effect on the color intensity of the films (Supplementary Material – Figure S2), varying between yellow-orange and a lower luminosity when compared to the control film ( $p < 0.05$ ). There was no significant effect ( $p > 0.05$ ) on the color parameters of the control film during 30 days of storage ( $L^*$ :  $97.04 \pm 0.81$ ,  $a^*$ :  $1.93 \pm 0.08$ , and  $b^*$ :  $1.89 \pm 0.11$ ), with high transparency regardless of temperature or incidence of light. However, a variation was observed for films incorporated with different carotenoids.

The films with norbixin, lycopene or zeaxanthin showed a similar stability for parameter  $L^*$  when stored at 25 °C in the dark (Figure 2), showing no significant effect ( $p >$

0.05) of temperature and maintenance of the initial value during storage, of  $82.69 \pm 0.69$ ,  $82.35 \pm 1.08$ , and  $83.17 \pm 0.70$ , respectively. This behavior was not observed when films were stored under light incidence or temperature of  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , where an increase in luminosity ( $p < 0.05$ ) occurred, especially under high temperature, with a synergistic effect of the light + temperature. However, when exposed to  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  in the dark, there was an isolated effect of temperature, behavior not observed at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

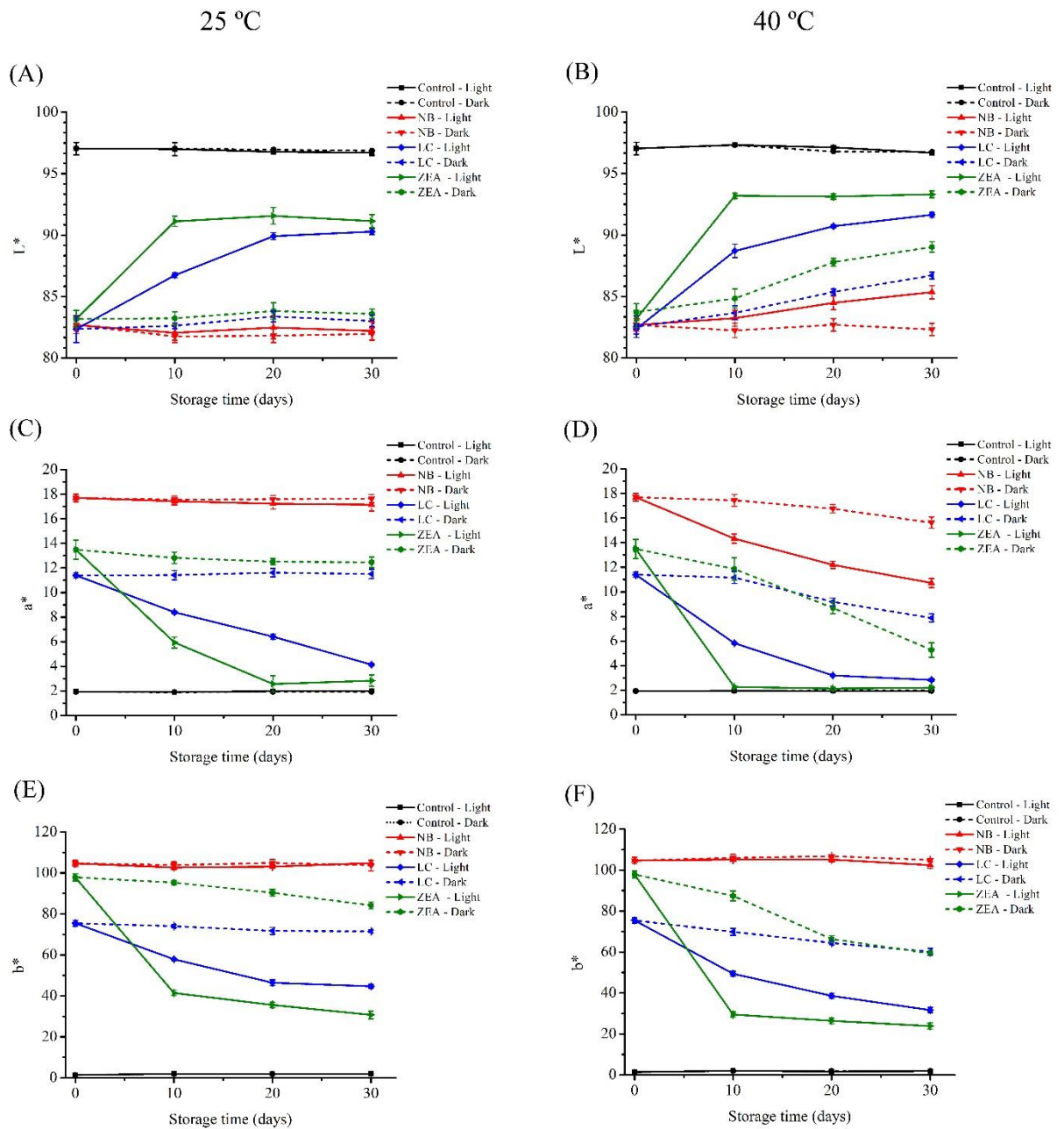


Figure 2 – Color parameters of active cellulose acetate films under different storage conditions:  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Similar effect for parameter  $a^*$  of films with carotenoids, showing no significant difference ( $p > 0.05$ ) after 30 days of storage at 25 °C in the dark (Figure 2). For exposure to light at 25 °C, a significant reduction ( $p < 0.05$ ) was observed for films with lycopene and zeaxanthin. In the study at 40 °C a reduction occurred regardless the incidence of light or not, but with greater intensity for exposure to light when compared to storage in the dark. For the film with norbixin, there was no variation during the first 20 days of storage in the dark for parameter  $a^*$ , while films with lycopene and zeaxanthin presented a reduction in this parameter after 10 days of storage. However, the reduction of parameter  $a^*$  occurred after the first day of storage under the light, showing again the greatest effect of light on the color stability of films, associated with the higher temperature used.

As for the parameters  $L^*$  and  $a^*$ , the values of  $b^*$  were more stable at 25 °C in the dark when compared to the same temperature under light (Figure 2). Again, a more intense reduction at 40 °C was observed under incidence of light. In both systems, the greater stability of natural antioxidants followed the order: norbixin > lycopene > zeaxanthin, mainly at 25 °C without light. When observed only at a temperature of 25 °C, it did not have a significant effect on the color parameters when compared to light exposure. This effect is associated with storage conditions, in which the low temperature and the absence of light did not lead to the formation of radicals that can induce the oxidation process of these natural antioxidants (Borba et al., 2019). However, when stored at 40 °C there was less stability, with a synergistic effect of light when compared to storage without light.

Similar results for storage were obtained for poly (lactic acid) films obtained through the casting technique and incorporated with  $\beta$ -carotene, bixin and lycopene (100  $\mu\text{g}$  carotenoid/g of biopolymer), where light presented a higher detrimental effect over carotenoids stability than temperature (25 and 40 °C). There was greater stability for bixin, followed by lycopene and  $\beta$ -carotene, both at light and dark conditions after 18 days. This behavior was related to the stability of carotenoids in relation to the different storage systems and their chemical structure, which present a system of conjugated double bonds susceptible to oxidation and isomerization reactions, with greater color loss under exposure to light and high temperature (Stoll et al., 2018).

### 3.1.3 Mechanical properties

The films produced with carotenoids presented a significant increase ( $p < 0.05$ ) in tensile strength (TS) when compared the control film ( $65.26 \pm 2.66$  MPa), with TS values of  $84.58 \pm 1.75$  MPa,  $102.71 \pm 2.43$  MPa, and  $85.60 \pm 2.07$  MPa, for norbixin, lycopene and zeaxanthin films, respectively. For the elongation (E), a significant increase ( $p < 0.05$ ) was observed for the addition of lycopene ( $14.53 \pm 1.37\%$ ) and zeaxanthin ( $14.99 \pm 1.11\%$ ) when compared to control films ( $3.79 \pm 0.52\%$ ) and norbixin ( $4.01 \pm 0.40\%$ ). This behavior may be related to the size of the carbon chain of these natural antioxidants, in which lycopene and zeaxanthin present a longer molecule compared to norbixin (Supplementary Material – Figure S2). Thus, these pigments can promote a greater spacing between the chains of the polymeric matrix and consequently improve films mechanical properties, an effect observed in another preliminary study (Assis et al., 2020).

The effect of different storage conditions over TS results is shown in Figure 3. During storage at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , the control film and norbixin showed no significant differences ( $p > 0.05$ ) regardless of exposure to light or not. This behavior was not observed for films with lycopene and zeaxanthin, with maintenance of TS when stored in the dark and a decrease after 10 days in the presence of light. In the study at  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , the film with norbixin showed no significant difference ( $p > 0.05$ ) when stored with or without light. However, there was a tendency of decrease on TS value for films with lycopene and zeaxanthin during storage, mainly under the incidence of light. For the control film, this trend was observed after 10 days, with similar behavior for storage with or without light.

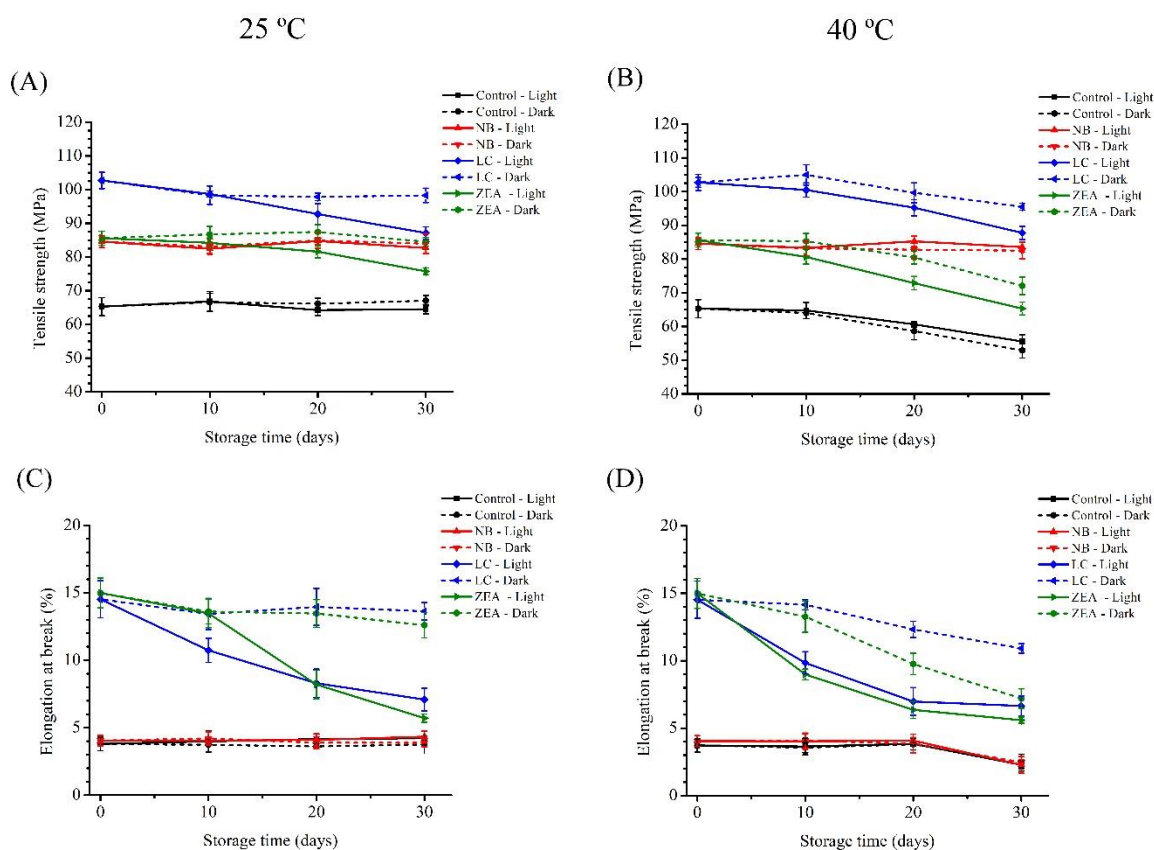


Figure 3 – Mechanical properties of active cellulose acetate films under different storage conditions: 25 °C and 40 °C.

Figure 3 shows the elongation at break (E) of the films. As expected, all films showed no variation in E until 30 days of storage at 25 °C without light. When exposed to light and the same temperature, there was a significant decrease ( $p < 0.05$ ) for the films incorporated with lycopene and zeaxanthin, showing that the incidence of light in these storage conditions had a greater effect on the elongation at break. At 40 °C, there was a significant reduction ( $p < 0.05$ ) of E for all films at the end of storage in the dark or under light. In the absence of light, less intensity of elongation reduction was observed, with loss after 10 days for lycopene or zeaxanthin films, and only after 20 days for control and norbixin films. The reduction in the elongation may be related to the stability of these carotenoids, mainly to the synergistic effect of light and high temperature, which can undergo oxidation, degradation or isomerization reactions (behavior observed through the analysis of the carotenoid content of the films). With the degradation, the plasticizer effect of carotenoids may decrease, accompanied by a structural rearrangement of the polymeric matrix through intra and intermolecular bonds, reducing the spacing between the chains and consequently less flexibility of the films. Another factor that



can contribute to the reduction of this parameter under high temperature is the loss of water present in the films, which can be linked to the hydroxyl groups ( $-OH$ ) of cellulose acetate and act with a plasticizing effect (Maryam Adilah & Nur Hanani, 2019; Piccirilli et al., 2019).

### 3.2 Protective effect of active films on stability of vitamin B<sub>2</sub> under light exposure

The light transmission barrier of cellulose acetate films with the addition of different carotenoids (norbixin, lycopene and zeaxanthin) was evaluated by the photo-oxidative stability of a riboflavin solution during storage (Figure 4). A considerable reduction of the riboflavin content was observed for all packaging systems ( $p < 0.05$ ), in which the films with carotenoids had a higher protective effect against photo-oxidation according to the following order: norbixin > lycopene > zeaxanthin > control > glass.

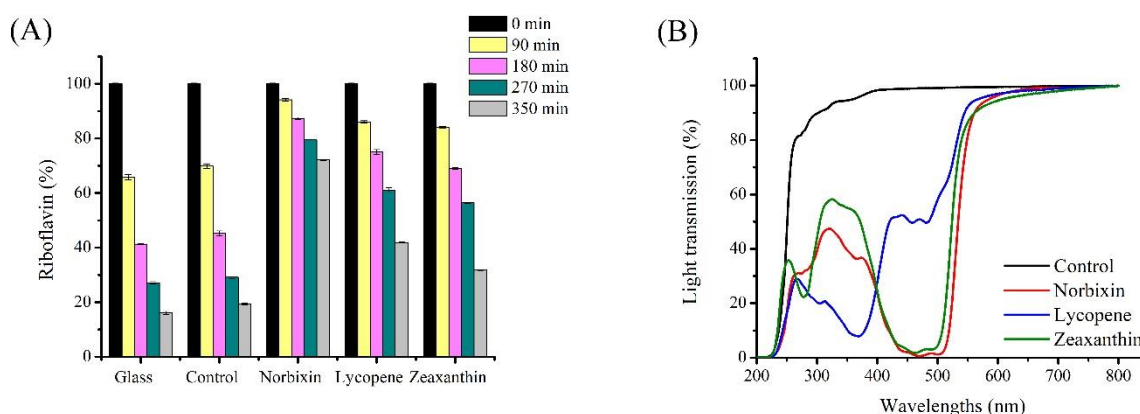


Figure 4 – (A) Riboflavin stability during exposure to light and (B) light transmission through cellulose acetate films with different carotenoids.

After 90 min of light exposure, the riboflavin solutions packed in glass and in the control system (film without carotenoids) presented  $65.79 \pm 0.92$  % and  $69.86 \pm 0.08$  % of its initial vitamin content, respectively. Meanwhile, the riboflavin stability was shown to be much higher when solutions were protected by carotenoids added films, demonstrating their higher barrier to light transmission. A significant difference ( $p < 0.05$ ) was observed between the protective systems, with better maintenance of the vitamin content in solutions covered with norbixin films ( $94.20 \pm 0.02$  %), lycopene ( $86.04 \pm 0.03$  %) and zeaxanthin ( $84.20 \pm 0.12$  %) after 90 min.

At the end of the study, the glass and control systems had a content of  $16.06 \pm 0.60$  % and  $19.36 \pm 0.27$  %, respectively. This behavior is associated with the absence of light

protection in these packaging systems, where the control film presents high light transmission at both wavelengths (UV-Vis), as observed in Figure 4B.

Among the packaging systems, the films with lycopene and zeaxanthin presented similar behavior during storage, with the maintenance of vitamin content of  $41.92 \pm 0.23\%$  and  $31.72 \pm 0.07\%$ , respectively. However, the film with norbixin showed a greater protective effect on the oxidative stability of riboflavin when compared to the other carotenoids, where  $72.11 \pm 0.02\%$  of riboflavin was preserved after 350 min of light exposure.

The riboflavin shows lower light stability when exposed at of 450 nm, wavelength which correspond to the maximum absorption of this vitamin (Bitsch & Bitsch, 2016). The stability of this micronutrient stored in the protection systems the films with carotenoid is related to the light barrier of these packages, which showed a higher barrier to the transmission of UV-vis light when compared to the control film (Figure 4B). The addition of natural pigments or products that present these compounds in their composition can contribute to the obtention of biodegradable films with reduced transparency and increased barrier to light transmission, with potential application as food packaging and maintenance of the stability of compounds sensitive to photooxidation, such as vitamins and foods with a high fat content.

### 3.3 Release of carotenoids

Figure 5 shows the percentage of carotenoids released as a function of time and temperature (25 °C and 40 °C) in ethanol 95%, used as a simulant for foods with a high fat content. The addition and release of active compounds from biodegradable films can be influenced by many factors, such as the addition of free or encapsulated compounds, interaction of the additive with the polymer matrix, solubility of the biopolymer, mobility of the polymer matrix in contact with the food simulant, temperature, time and solubility of the additive in the food simulant (Mirzaei-Mohkam et al., 2019; Talón et al., 2017).

As expected, the release of carotenoids from the cellulose acetate films was affected by the temperature and time of contact with the food simulant (Figure 5). All films showed a rapid release of natural antioxidants in the first few hours, followed by a controlled release profile over 10 days of analysis. There was a higher release of lycopene when compared to norbixin and zeaxanthin at both temperatures, with a significant difference between carotenoids ( $p < 0.05$ ).

For the temperature of 25 °C (Figure 5), films with the addition of norbixin and zeaxanthin presented maximum release on the first day and maintenance of the content until

the end of the study, of  $4.04 \pm 0.06$  % and  $1.12 \pm 0.03$  % respectively. However, the film with norbixin showed maximum release on the fifth day ( $7.14 \pm 0.24$ %) and maintenance of the pigment content until the tenth day ( $7.63 \pm 0.37$  %). The difference in the release profile between the pigments may be associated with the affinity of each carotenoid with ethanol and especially the carotenoid-polymer matrix interaction. The cellulose acetate presents hydroxyl groups (-OH) in its chemical structure, as well as norbixin and zeaxanthin (both with two groups in its structure), which may present a greater interaction (hydrogen bonds) with these pigments and a lower release rate when compared to lycopene (carotenoid with structure composed only of carbon and hydrogen). Another characteristic is the presence of two cyclic groups ( $\beta$ -ionone ring) at each end of the chemical structure of zeaxanthin, which may confer higher stiffness and associated with the presence of hydroxyl groups may show greater interaction with the polymer matrix. Meanwhile, the structure of lycopene - an acyclic carotenoid with open structure with greater flexibility – could decrease the carotenoid friction with the polymer matrix and consequently present a higher release when compared to norbixin and zeaxanthin (Stoll et al., 2019). Smaller molecules tend to present higher diffusion coefficients than bigger ones (Chan et al., 2015). Norbixin ( $C_{24}H_{28}O_4$ ) despite presenting a smaller molecule when compared to zeaxanthin ( $C_{40}H_{56}O_2$ ) and lycopene ( $C_{40}H_{56}$ ), present functional groups that may have affected its release rate, hampering norbixin release to the food simulant.

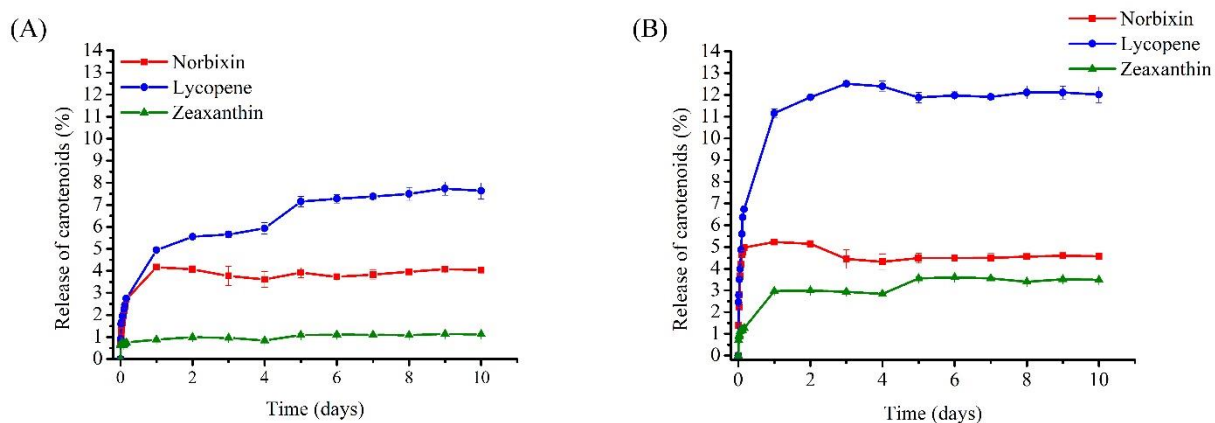


Figure 5 – (A) Release of different carotenoids from the cellulose acetate films at 25 °C and (B) 40 °C in ethanol 95%.

The release at 40 °C (Figure 5) showed a similar profile when compared to 25 °C condition, both with controlled release of carotenoids from the cellulose acetate films. When the release rates were compared at the end of the study (sustained slow release), the percentage

of lycopene, norbixin and zeaxanthin were:  $7.63 \pm 0.37$  % and  $12.01 \pm 0.35$  %;  $4.04 \pm 0.06$  % and  $5.57 \pm 0.18$  %;  $1.12 \pm 0.03$  % and  $3.49 \pm 0.12$  %; for temperatures of 25 °C and 40 °C respectively; with significant difference between the evaluated temperatures ( $p < 0.05$ ).

However, when carried out under higher temperature there was a faster and greater release of the natural antioxidants. This behavior may be associated to the greater mobility of the polymer matrix, with increased penetration of the food simulant in film matrix and the release of the carotenoids (Ma et al., 2017).

This behavior was also observed for sodium caseinate films with the addition of 5% nanoemulsified cinnamon essential oil under different temperatures (4 °C, 25 °C and 37 °C) in ethanol 95 %. With the increase of temperature, there was a rapid initial release of the active compound in the first few hours, with less time required to reach the equilibrium. Effect associated with time-temperature combination and higher matrix mobility with increasing temperature (Ranjbaryan et al., 2019).

Release profile was similar to that observed by Stoll et al. (2019) for poly (acid lactic) films added with bixin, lycopene and  $\beta$ -carotene (100  $\mu$ g of carotenoid/g biopolymer) at 40 °C in ethanol 95 %. There was a gradual release of carotenoids at the start of the study, with increased concentration and controlled release over time (65 days), with release of approximately 55 % of bixin and 45 % for lycopene and  $\beta$ -carotene. When compared to Stoll et al. (2019), the lower release percentuals found in the present study may be related to the polymer matrix used, carotenoid-matrix interaction and the presence of functional groups in the chemical structures of norbixin, lycopene and zeaxanthin.

#### **4. Conclusion**

The packaging of active cellulose acetate with the incorporation of different carotenoids (norbixin, lycopene or zeaxanthin) can provide a good protection for foods or compounds susceptible to photooxidation. Films with the addition of norbixin showed higher barrier to UV-vis light transmission and better protective effect on the stability of vitamin B<sub>2</sub> under light exposure. Among carotenoids, there was a higher release of lycopene, mainly at the higher temperature (40 °C), related to the greater mobility of the polymeric matrix. In storage under different conditions, regardless of temperature or incidence of light, there was greater stability of carotenoids in the following order: norbixin > lycopene > zeaxanthin. There was a greater effect of light under the degradation of these natural antioxidants and the mechanical properties of the films, with a synergistic effect of light and high temperature, with different

rates of degradation for the conditions used (25 °C and 40 °C). The results showed that the stability of the added carotenoids, such as the molecular interaction with the polymeric matrix, was influenced by its molecular structure. Associated with the size of the carbon chain, presence of functional groups in its structure, with influence on the reaction constants ( $k$ ) and half-life ( $t_{1/2}$ ). The determination of barrier properties, release of bioactive compounds and stability during storage may indicate the behavior of these packages and indicate their potential application in a food matrix.

### Acknowledgements

The research was supported by funds of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Process Number 400056/2016-0) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS-Process Number 17/2551-0000911-8).

### Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### References

- Adilah, A. N., Jamilah, B., Noranizan, M. A., & Hanani, Z. A. N. (2018). Utilization of mango peel extracts on the biodegradable films for active packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 16, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.01.006>
- Assis, R. Q., Pagno, C. H., Costa, T. M. H., Flôres, S. H., & Rios, A. de O. (2018). Synthesis of biodegradable films based on cassava starch containing free and nanoencapsulated  $\beta$ -carotene. *Packaging Technology and Science*, October 2017, 8–10. <https://doi.org/10.1002/pts.2364>
- Assis, R. Q., Rios, P. D. A., Rios, A. de O., & Olivera, F. C. (2020). Biodegradable packaging of cellulose acetate incorporated with norbixin, lycopene or zeaxanthin. *Industrial Crops and Products*, 147. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112212>
- ASTM. (2012). ASTM D882- 12 Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. In *ASTM*. <https://doi.org/10.1520/D0882-12.2>

- Bitsch, I., & Bitsch, R. (2016). Riboflavin: Properties and Determination. In *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed., pp. 633–640). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00593-6>
- Borba, C. M., Tavares, M. N., Macedo, L. P., Araújo, G. S., Furlong, E. B., Dora, C. L., & Burkert, J. F. M. (2019). Physical and chemical stability of  $\beta$ -carotene nanoemulsions during storage and thermal process. *Food Research International*, 121(March), 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.045>
- Calvo, M. M., & Santa-María, G. (2008). Effect of illumination and chlorophylls on stability of tomato carotenoids. *Food Chemistry*, 107(4), 1365–1370. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.059>
- Cámara, M., de Cortes Sánchez-Mata, M., Fernández-Ruiz, V., Cámara, R. M., Manzoor, S., & Caceres, J. O. (2013). *Lycopene: A Review of Chemical and Biological Activity Related to Beneficial Health Effects* (Vol. 40, pp. 383–426). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59603-1.00011-4>
- Chan, T. C., Li, H. T., & Li, K. Y. (2015). Effects of Shapes of Solute Molecules on Diffusion: A Study of Dependences on Solute Size, Solvent, and Temperature. *Journal of Physical Chemistry B*, 119(51), 15718–15728. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b10550>
- Choi, I., Lee, S. E., Chang, Y., Lacroix, M., & Han, J. (2018). Effect of oxidized phenolic compounds on cross-linking and properties of biodegradable active packaging film composed of turmeric and gelatin. *LWT*, 93, 427–433. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.065>
- Combs, G. F., & McClung, J. P. (2017). Riboflavin. In *The Vitamins* (pp. 315–329). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802965-7.00012-5>
- de Campo, C., Dick, M., Pereira dos Santos, P., Haas Costa, T. M., Paese, K., Stanisçuaski Guterres, S., de Oliveira Rios, A., & Hickmann Flôres, S. (2018). Zeaxanthin nanoencapsulation with *Opuntia monacantha* mucilage as structuring material: Characterization and stability evaluation under different temperatures. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 558, 410–421. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.09.009>
- Edgar Buchanan, C.M., Debenham, J.S., Rundquist, P.A., Seiler, B.D., Shelton, M.C., Tindall, D., K. J. (2001). Advances in cellulose ether performance and application. *Prog. Polym. Sci.*, 26, 1605–1688.

- Fischer, S., Thümmeler, K., Volkert, B., Hettrich, K., Schmidt, I., & Fischer, K. (2008). Properties and applications of cellulose acetate. *Macromolecular Symposia*, 262(1), 89–96. <https://doi.org/10.1002/masy.200850210>
- Fратиани, A., Niro, S., Alam, M. D. R., Cinquanta, L., Di Matteo, M., Adiletta, G., & Panfili, G. (2018). Effect of a physical pre-treatment and drying on carotenoids of goji berries (*Lycium barbarum* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 92, 318–323. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.048>
- Kovary, K., Louvain, T. S., Silva, M. C. C. e, Albano, F., Pires, B. B. M., Laranja, G. A. T., Lage, C. L. S., & Felzenszwalb, I. (2001). Biochemical behaviour of norbixin during in vitro DNA damage induced by reactive oxygen species. *British Journal of Nutrition*, 85(04), 431. <https://doi.org/10.1079/BJN2000287>
- Li, D., Xiao, Y., Zhang, Z., & Liu, C. (2015). Light-induced oxidation and isomerization of all-trans- $\beta$ -cryptoxanthin in a model system. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 142, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.11.003>
- Ma, Q., Ren, Y., & Wang, L. (2017). Investigation of antioxidant activity and release kinetics of curcumin from tara gum/ polyvinyl alcohol active film. *Food Hydrocolloids*, 70, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.018>
- Malherbi, N. M., Schmitz, A. C., Grando, R. C., Bilck, A. P., Yamashita, F., Tormen, L., Fakhouri, F. M., Velasco, J. I., & Bertan, L. C. (2019). Corn starch and gelatin-based films added with guabiroba pulp for application in food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 19(December 2018), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.008>
- Maryam Adilah, Z. A., & Nur Hanani, Z. A. (2019). Storage stability of soy protein isolate films incorporated with mango kernel extract at different temperature. *Food Hydrocolloids*, 87(August 2018), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.038>
- Medina-Jaramillo, C., Ochoa-Yepes, O., Bernal, C., & Famá, L. (2017). Active and smart biodegradable packaging based on starch and natural extracts. *Carbohydrate Polymers*, 176, 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.079>
- Mirzaei-Mohkam, A., Garavand, F., Dehnad, D., Keramat, J., & Nasirpour, A. (2019). Optimisation, antioxidant attributes, stability and release behaviour of carboxymethyl cellulose films incorporated with nanoencapsulated vitamin E. *Progress in Organic Coatings*, 134, 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.05.026>

- Nohr, D., & Biesalski, H. K. (2016). Vitamin B2. In *Reference Module in Food Science* (Vol. 71, Issue 1852, pp. 668–668). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.01072-6>
- Noronha, C. M., De Carvalho, S. M., Lino, R. C., & Barreto, P. L. M. (2014). Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with  $\alpha$ -tocopherol nanocapsules. *Food Chemistry*, 159, 529–535. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.159>
- Nunes, I. L., & Mercadante, A. Z. (2004). Obtenção de cristais de licopeno a partir de descarte de tomate. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24(3), 440–447. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000300024>
- Pagno, C. H., de Farias, Y. B., Costa, T. M. H., Rios, A. de O., & Flôres, S. H. (2016). Synthesis of biodegradable films with antioxidant properties based on cassava starch containing bixin nanocapsules. *Journal of Food Science and Technology*, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2294-9>
- Perdones, Á., Chiralt, A., & Vargas, M. (2016). Properties of film-forming dispersions and films based on chitosan containing basil or thyme essential oil. *Food Hydrocolloids*, 57, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.006>
- Piccirilli, G. N., Soazo, M., Pérez, L. M., Delorenzi, N. J., & Verdini, R. A. (2019). Effect of storage conditions on the physicochemical characteristics of edible films based on whey protein concentrate and liquid smoke. *Food Hydrocolloids*, 87, 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.015>
- Ranjbaryan, S., Pourfathi, B., & Almasi, H. (2019). Reinforcing and release controlling effect of cellulose nanofiber in sodium caseinate films activated by nanoemulsified cinnamon essential oil. *Food Packaging and Shelf Life*, 21(December 2018), 100341. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100341>
- Regulation, C. (2011). No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. *Official Journal L*, 12.
- Rios, A. de O., & Mercadante, A. Z. (2004). Otimização das condições para obtenção de padrão de bixina e das etapas de extração e saponificação para quantificação de bixina em “snacks” extrusados por clae. *Alimentos e Nutrição*. Araraquara, 15(3), 203–213.
- Rodriguez-amaya, D. B. (2001). *A guide to carotenoid analysis in foods*. International Life Science Institute Press.
- Siwach, R., Tokas, J., & Seth, R. (2016). Use of lycopene as a natural antioxidant in extending the shelf-life of anhydrous cow milk fat. *Food Chemistry*, 199, 541–546. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.009>



- Stancik, C. M., Conner, D. A., Jernakoff, P., Niedenzu, P. M., Duncan, S. E., Bianchi, L. M., & Johnson, D. S. (2017). Accelerated light protection performance measurement technology validated for dairy milk packaging design. *Packaging Technology and Science*, 30(12), 771–780. <https://doi.org/10.1002/pts.2326>
- Stoll, L., Martins, A., Oliveira, A., Rios, D. O., Maria, T., Costa, H., & Hickmann, S. (2017). Active biodegradable film with encapsulated anthocyanins: Effect on the quality attributes of extra-virgin olive oil during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, June 2016, 1–8. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13218>
- Stoll, L., Rech, R., Flôres, S. H., Nachtigall, S. M. B., & de Oliveira Rios, A. (2018). Carotenoids extracts as natural colorants in poly(lactic acid) films. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(33). <https://doi.org/10.1002/app.46585>
- Stoll, L., Rech, R., Flôres, S. H., Nachtigall, S. M. B., & de Oliveira Rios, A. (2019). Poly(lactic acid) films with carotenoids extracts: Release study and effect on sunflower oil preservation. *Food Chemistry*, 281, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.100>
- Talón, E., Trifkovic, K. T., Vargas, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2017). Release of polyphenols from starch-chitosan based films containing thyme extract. *Carbohydrate Polymers*, 175, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.067>
- Xiao, Y. dong, Huang, W. yang, Li, D. jing, Song, J. feng, Liu, C. quan, Wei, Q. yu, Zhang, M., & Yang, Q. ming. (2018). Thermal degradation kinetics of all-trans and cis-carotenoids in a light-induced model system. *Food Chemistry*, 239, 360–368. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.107>

### Supplementary material

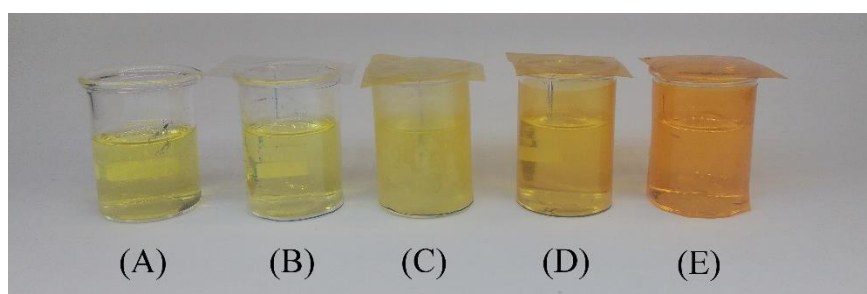


Figure S1 - Evaluation of the stability of vitamin B2 in different packages: (A) glass, (B) control film, (C) film with zeaxanthin, (D) film with lycopene, and (E) film with norbixin.

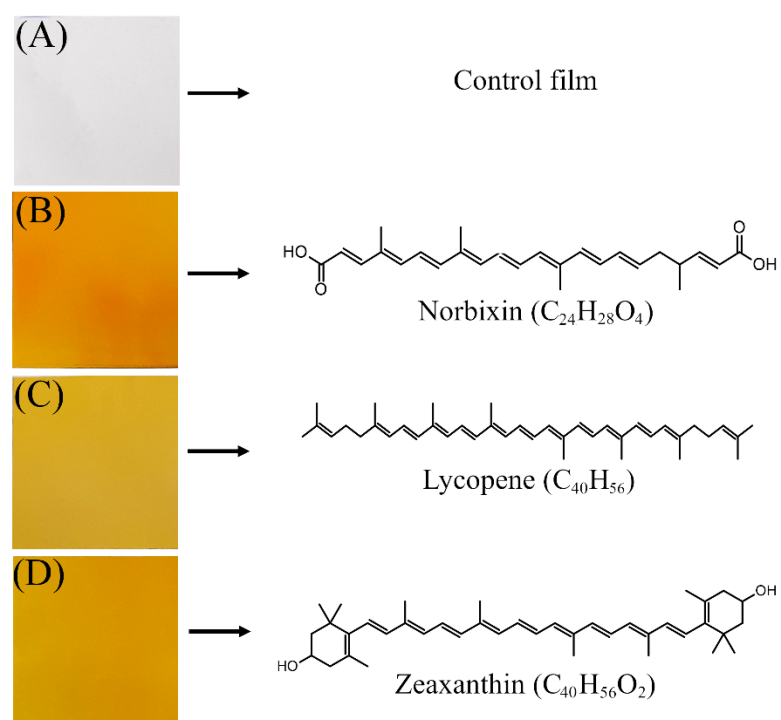


Figure S2 - Cellulose acetate films and molecular structure of carotenoids: (A) control film, (B) film with norbixin, (C) film with lycopene, and (D) film with zeaxanthin.

## **CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS**

---

## 4 DISCUSSÃO GERAL

O objetivo do trabalho foi desenvolver filmes ativos à base de acetato de celulose incorporados de diferentes carotenoides e avaliar sua interação com a matriz polimérica através da determinação das propriedades físico químicas e de barreira. A partir de testes preliminares foram avaliadas as adições das concentrações de 0,03%, 0,05% e 0,1% (em relação ao peso do polímero) de norbixina, licopeno ou zeaxantina como antioxidantes naturais. A partir dos resultados obtidos foram desenvolvidos dois artigos científicos:

- Biodegradable packaging of cellulose acetate incorporated with norbixin, lycopene or zeaxanthin.
- Active food packaging of cellulose acetate: storage stability, protective effect on oxidation of riboflavin and release in food simulants.

De maneira geral, os filmes apresentaram propriedades mecânicas e de barreira distintas de acordo com o carotenoide adicionado à matriz polimérica. Este resultado está relacionado à estrutura molecular, tamanho da cadeia carbônica, presença de grupos funcionais, quantidade de ligações duplas conjugadas e à capacidade de conferir menor ou maior intensidade de cor de cada um dos pigmentos. Contudo, os três carotenoides apresentaram boa compatibilidade com o acetato de celulose, comportamento observado através da obtenção de filmes com aspecto visual uniforme e sua retenção no polímero após a evaporação do solvente utilizado.

Independente do carotenoide adicionado, todos os filmes apresentaram espessura média de 0,0405 mm, o que demonstra que a técnica e as condições utilizadas proporcionaram a obtenção de filmes finos. A Tabela 3 apresenta os principais resultados encontrados em relação às propriedades mecânicas, físicas e de barreira dos filmes. Todas as concentrações mostraram efeito sobre as propriedades mecânicas, com aumento da resistência à tração de 22%, 57% e 29% para a adição de norbixina, licopeno e zeaxantina em relação ao filme controle, respectivamente. Para a alongação na ruptura, somente foi observado efeito para a maior concentração de licopeno (284%) e zeaxantina (275%) quando comparadas ao filme controle. Este resultado está relacionado ao efeito plastificante que estes carotenoides exerceram à matriz, o que diminuiu a interação intermolecular e promoveu o aumento do espaço livre ao longo da cadeia polimérica, com consequente diminuição da rigidez e aumento da flexibilidade dos filmes.

Tabela 3 – Caracterização das propriedades dos filmes selecionados: controle e com adição de 0,1 % de diferentes carotenoides.

Propriedades	Filmes			
	Controle	Norbixina	Licopeno	Zeaxantina
Resistência à tração (MPa)	67,48	82,57	105,63	87,37
Elongação na ruptura (%)	3,88	3,89	14,91	14,54
Permeabilidade ao vapor de água (g mm/ h m <sup>2</sup> kPa)	0,032	0,035	0,022	0,023
Diferença de cor	-	109,24	74,46	96,16
Transmissão de luz a 210 nm (%)	0,11	0,01	0,04	0,02
Transmissão de luz a 500 nm (%)	99,19	1,20	58,07	4,40
Estabilidade térmica	Sim	Sim	Sim	Sim
Temperatura de transição vítrea – <i>T<sub>g</sub></i> (°C)	190,65	179,68	173,52	171,78
Estrutura homogênea	Sim	Sim	Sim	Sim
Índice de peróxidos do óleo de girassol após 20 dias (mEq/Kg)	114,05	23,41	38,02	97,20
Migração para o simulante de alimentos a 25 °C (%)**	N.A	4,04	7,63	1,12
Migração para o simulante de alimentos a 40 °C (%)**	N.A	5,57	12,01	3,49
Retenção da vitamina B <sub>2</sub> após 350 min de exposição à luz (%)	19,35	72,12	41,92	31,72
Estabilidade dos carotenoides durante o armazenamento sob diferentes condições***	N.A	Elevada	Média	Baixa
Manutenção das propriedades dos filmes durante o armazenamento sob diferentes condições***	Elevada	Elevada	Média	Baixa

\*Transmitância a 600 nm em relação a espessura do filme (mm).

\*\*Análise realizada durante 10 dias em etanol 95%.

\*\*\* Luminosidade: luz ou escuro; Temperatura: 25 °C ou 40 °C.

N.A: Não aplicável

Outro parâmetro importante a ser avaliado em embalagens para alimentos é a permeabilidade ao vapor de água, visto que alimentos que apresentam baixa atividade de água ou umidade precisam ser armazenados em materiais que proporcionem sua manutenção ou estabilidade. No desenvolvimento de filmes podem ser utilizados compostos para modificar a permeabilidade, como por exemplo, compostos hidrofóbicos que diminuem a interação com as moléculas de água e conseqüente permeação através dos filmes. Comportamento observado para adição de licopeno e zeaxantina, carotenoides que apresentam caráter hidrofóbico e mostraram redução significativa quando comparados ao filme controle e com adição de norbixina. Por sua vez, a norbixina, obtida através da conversão da bixina por meio de tratamento com uma base forte, apresenta característica hidrofílica e mostrou maior permeabilidade.

Os carotenoides além de apresentar atividade antioxidante (ou seja, capacidade de reagir e desativar radicais livres e espécies reativas de oxigênio) também apresentam capacidade de conferir cor, característica associada ao seu conjunto de ligações duplas conjugadas. O aumento da concentração de cada pigmento levou a um incremento gradual da intensidade de cor dos filmes e maior barreira à transmissão de luz, com coloração variando entre o amarelo e laranja. Essa característica está associada à obtenção de filmes com maior opacidade, resultado do aumento da diferença de cor entre o filme controle e os filmes com os antioxidantes naturais, paralela à redução da transmissão de luz a 210 nm e 500 nm. A obtenção de filmes biodegradáveis com barreira à luz podem ser uma alternativa para manutenção da qualidade e estabilidade de produtos susceptíveis a fotodegradação, como por exemplo alimentos com alto teor de lipídeos.

Todos os filmes apresentaram estrutura homogênea, compacta e sem presença de rachaduras, características confirmadas através da análise de microscopia eletrônica de varredura. A adição de zeaxantina mostrou uma pequena diminuição da estabilidade térmica quando comparada aos demais filmes. O início da degradação do polímero foi verificada com maior intensidade na faixa de temperatura compreendida entre 200 °C e 400 °C, com perda de massa variando de 78% a 83%. Na análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi observado um pico endotérmico (80 °C – 90 °C) para todas as amostras analisadas, que corresponde a dessorção de água presente na matriz polimérica, uma vez que o acetato de celulose apresenta grupos hidroxila (OH) ao longo da estrutura química e que podem interagir ou fixar moléculas de água. Outro comportamento observado nesta técnica e confirmado com a análise térmica mecânica dinâmica foi a mudança da temperatura de transição vítrea dos filmes, também conhecida como *T<sub>g</sub>*. Houve uma redução da *T<sub>g</sub>* a partir da adição dos

carotenoides à matriz polimérica, principalmente para a adição de licopeno (173,52 °C) e zeaxantina (171,78 °C). A  $T_g$  indica a temperatura média em que um material, durante o aquecimento, passa do estado vítreo para o estado com maior mobilidade estrutural, o que pode indicar a faixa de temperatura para trabalho ou manipulação do polímero, de acordo com o objetivo ou características que se deseja obter. A redução da temperatura de transição vítrea está relacionada ao efeito plastificante que estes carotenoides exerceram à matriz polimérica, o que conferiu maior flexibilidade aos filmes.

Além de determinar as propriedades básicas dos filmes também é necessário avaliar sua potencial aplicação como embalagens para alimentos, como a determinação da atividade antioxidante. No armazenamento do óleo de girassol sob condições controladas para oxidação, os filmes ativos mostraram melhor efeito protetor na manutenção da estabilidade e qualidade. O filme com norbixina apresentou melhor proteção à oxidação do óleo de girassol durante o armazenamento, em que somente após 15 dias apresentou índice de peróxidos (14,25 mEq/Kg) superior ao limite estabelecido para óleos vegetais (10 mEq/Kg) (BRASIL, 2005). Entretanto, todos os filmes ativos mostraram melhor proteção à oxidação quando comparados ao filme sem adição dos antioxidantes naturais ou demais controles utilizados. Este comportamento está relacionado à barreira contra a fotodegradação, transmissão de luz UV-vis e a interação embalagem-alimento. Alimentos com alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, como o óleo de girassol, quando submetidos à combinação de luz e alta temperatura podem sofrer diversas reações químicas e levar à formação de compostos de degradação (como peróxidos, dienos e trienos conjugados). O aumento da formação de produtos primários de oxidação também foi acompanhado da formação de produtos secundários, em que para ambos os casos, o melhor efeito protetor para a estabilidade do óleo de girassol se deu na seguinte ordem: norbixina > licopeno > zeaxantina > filme controle.

A interação embalagem-alimento pode ser caracterizada pela migração do aditivo a partir da matriz polimérica, o que pode contribuir para prolongar a vida útil dos alimentos quando armazenados nesse tipo de material. Todos os filmes ativos apresentaram perfil de liberação rápida e gradual para o simulante de alimentos ao longo de 10 dias, com modificação da taxa de liberação de acordo com as condições de armazenamento. Com o aumento da temperatura, de 25 °C para 40 °C, houve uma maior migração dos carotenoides. A elevação deste parâmetro contribuiu para uma mobilidade polimérica e assim maior contato com o simulante, o que conferiu maior difusão dos pigmentos para o meio. Além disso, a presença de grupos funcionais e o tamanho cadeia da carbônica também influenciou a liberação dos

carotenoides. Por apresentar menor estrutura química houve maior liberação da norbixina ( $C_{24}H_{28}O_4$ ), seguida dos pigmentos licopeno ( $C_{40}H_{56}$ ) e zeaxantina ( $C_{40}H_{56}O_2$ ).

Os filmes também foram avaliados quanto ao efeito protetor contra a fotodegradação, sem estar em contato direto com o produto, de uma solução padrão de riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>). Os filmes apresentaram uma boa barreira à luz, com destaque para o filme com adição de norbixina que apresentou retenção de 72,12% do conteúdo de vitamina após 350 min de exposição à luz ( $4700 \pm 200$  lx). A vitamina B<sub>2</sub> é um micronutriente sensível à luz, assim filmes de acetato de celulose com adição de norbixina, licopeno ou zeaxantina mostraram ser uma possibilidade para aumentar a estabilidade de compostos quando expostos a estas condições.

A manutenção das propriedades dos filmes, assim como a estabilidade dos antioxidantes naturais adicionados, sob diferentes condições de armazenamento é um fator importante diante da possibilidade de aplicação como embalagens para alimentos, uma vez que a manutenção das características desses materiais podem influenciar na qualidade dos produtos. A estabilidade dos antioxidantes naturais mostrou comportamento específico sob a incidência ou ausência de luz e temperatura (25 °C ou 40 °C). Quando comparadas as condições de armazenamento, todos os carotenoides apresentaram maior estabilidade sob ausência de luz em ambas as temperaturas. Contudo, foi verificado um efeito sinérgico da elevação da temperatura e presença de luz, o que influenciou fortemente a estabilidade dos pigmentos e levou a mudanças das propriedades dos filmes. Entre os carotenoides adicionados, a norbixina apresentou maior estabilidade durante 30 dias, o que conferiu melhor manutenção das propriedades mecânicas (resistência à tração e alongamento na ruptura) e cor. Comportamento acompanhado de menores valores das constantes de taxa de reação ( $k$ ) e maior tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), em que a estabilidade dos pigmentos para todos os tratamentos se deu na seguinte ordem: norbixina > licopeno > zeaxantina. Sabe-se que os carotenoides são compostos susceptíveis às reações de degradação quando submetidos à luz e temperatura elevada, em que os resultados obtidos refletem as condições aceleradas utilizadas para prever seu comportamento, ou seja, esses compostos podem apresentar melhor estabilidade quando submetidos às condições com menor intensidade de luz e baixa temperatura.

Diante disso, é importante o estudo da utilização de novos polímeros para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis e a caracterização dos materiais obtidos. Entre as características físico químicas importantes a serem determinadas encontram-se as propriedades mecânicas, propriedades de barreira, interação da matriz polimérica e o antioxidante adicionado, propriedades termomecânicas, propriedades térmicas, atividade antioxidante e potencial aplicação como embalagens para alimentos.



## 5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que o acetato de celulose pode ser um biopolímero utilizado para o desenvolvimento de filmes e que a adição de norbixina, zeaxantina ou licopeno contribui para a obtenção de embalagens com atividade antioxidante. A incorporação destes carotenoides demonstrou ser uma boa opção para aplicação como antioxidantes naturais em filmes, com modificação das propriedades mecânicas e de barreira, com destaque para a melhora da flexibilidade para a adição de licopeno e zeaxantina. A determinação da interação entre a matriz polimérica e os compostos bioativos são aspectos importantes para o desenvolvimento de embalagens, assim como avaliar a estabilidade dos pigmentos adicionados e a manutenção das propriedades dos filmes. A estabilidade dos compostos bioativos foi influenciada pelas condições de armazenamento, bem como as cinéticas de degradação e o tempo de meia vida, o que refletiu na variação das propriedades dos filmes. Esse comportamento pode ser utilizado para avaliar sua aplicação e/ou prever as condições ideais para o uso como embalagem. A atividade antioxidante, liberação dos antioxidantes e a barreira à fotodegradação foram comprovadas através da avaliação da estabilidade do óleo de girassol, difusão para o simulante de alimentos e manutenção do conteúdo de vitamina B<sub>2</sub>, respectivamente. A determinação destes parâmetros demonstrou a potencial aplicação como embalagem para alimentos susceptíveis às reações de oxidação lipídica e degradação induzidas pela exposição a luz, o que pode proporcionar maior estabilidade e aumentar a vida útil de alimentos quando submetidos à estas condições de armazenamento. Assim, este estudo pode auxiliar na utilização de novas técnicas para melhorar a produção, desenvolvimento e futuras aplicações de embalagens ativas à base de acetato de celulose.

## 6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste estudo contribuíram para melhor compreensão do uso do acetato de celulose como biopolímero para obtenção de filmes, paralela à adição de antioxidantes naturais e avaliação da sua interação e estabilidade junto a matriz polimérica. Durante o desenvolvimento foi possível observar novas possibilidades quanto ao seu uso, técnicas para obtenção dos filmes e avaliação de outras propriedades destas embalagens. Assim, como perspectivas futuras para dar continuidade, complementar e aprofundar este trabalho, pode-se sugerir:

- Estudo da adição de plastificantes de diferentes graus de hidrofilicidade.
- Avaliação da adição combinada de agentes plastificantes e antioxidantes naturais, bem como a determinação da melhor concentração destes aditivos e sua influência nas propriedades mecânicas e de barreiras dos filmes.
- Estudo das interações intermoleculares entre a matriz polimérica e os pigmentos através de diferentes técnicas de caracterização, como por exemplo a análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).
- Aplicação dos filmes como embalagem para diferentes matrizes alimentícias e seu efeito na vida útil destes alimentos.
- Determinação da permeabilidade a gases, principalmente ao oxigênio, para complementar a caracterização dos filmes e sua indicação/direcionamento na aplicação como materiais de embalagens.
- Investigação da biodegradação dos filmes em solo.
- Estudar a migração dos antioxidantes naturais para o alimento durante a aplicação como embalagem.
- Avaliar o processo de difusão dos antioxidantes naturais, levando em consideração a variação da espessura do filme e a adição de agentes plastificantes.
- Desenvolvimento de filmes à base de acetato de celulose obtidos a partir de diferentes técnicas e equipamentos utilizados em escala industrial, como por exemplo extrusão e termo compressão.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-AAL, E. S. M. et al. Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1169–1185, 2013.

ABIPLAST. **Perfil 2018 - Indústria Brasileira de Transformação e Reciclagem de Material Plástico**. 2018. ed. Brasil: Associação Brasileira da Indústria do Plástico, 2018.

AMORIM-CARRILHO, K. T. et al. **Review of methods for analysis of carotenoids** *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2014.

ANVISA. Resolução - RDC N°- 51, Regulamento técnico MERCOSUL sobre migração em materiais, embalagens e equipamentos plásticos destinados a entrar em contato com alimentos. **Diário Oficial da União, Brasília, DF**, v. 1, p. 105, 2010.

AOCS. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. **AOCS Press, Champaign**, v. 4th edn, p. 2–5, 1994.

ARRIETA, M. P. et al. Characterization of PLA-limonene blends for food packaging applications. **Polymer Testing**, v. 32, n. 4, p. 760–768, 2013.

ASSIS, R. Q. et al. Active biodegradable cassava starch films incorporated lycopene nanocapsules. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 818–827, 2017.

ASSIS, R. Q. et al. Synthesis of biodegradable films based on cassava starch containing free and nanoencapsulated  $\beta$ -carotene. **Packaging Technology and Science**, n. October 2017, p. 8–10, 2018.

ASTM. **ASTM E96-95 Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials** ASTM, 2000.

ASTM. **ASTM D882- 12 Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting** ASTM. [s.l: s.n.].

BARBOSA-PEREIRA, L. et al. Development of antioxidant active films containing tocopherols to extend the shelf life of fish. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 236–243, 2013.

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.

BRASIL. Regulamento Técnico - Critérios Gerais e Classificação de Materiais para Embalagens e Equipamentos em Contato com Alimentos constante do Anexo desta Resolução. p. 6, 2001.

BRASIL. **Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005 Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal**. [s.l: s.n.].

BRINCHI, L. et al. Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: Technology and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 154–169, 2013.

- CAETANO, S. et al. Characterization of active biodegradable films based on cassava starch and natural compounds. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 16, n. April, p. 138–147, 2018.
- CÁMARA, M. et al. Lycopene: A Review of Chemical and Biological Activity Related to Beneficial Health Effects. In: [s.l: s.n.]. v. 40p. 383–426.
- CANDIDO, R. G.; GODOY, G. G.; GONÇALVES, A. Characterization and application of cellulose acetate synthesized from sugarcane bagasse. **Carbohydrate Polymers**, v. 167, p. 280–289, 2017.
- CARDOSO, S. L. Fotofísica de carotenóides e o papel antioxidante de  $\beta$ -caroteno. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 535–540, 1997.
- CARVALHO, D. DE M. et al. Filme ativo de acetato de celulose incorporado com nanosuspensão de curcumina TT - Active film of cellulose acetate incorporated with nanosuspension of curcumin. **Polímeros**, v. 27, n. ahead, p. 70–76, 2017.
- CATALKAYA, G.; KAHVECI, D. Optimization of enzyme assisted extraction of lycopene from industrial tomato waste. **Separation and Purification Technology**, p. 55–63, 2019.
- CERQUEIRA, D. A. et al. Caracterização de acetato de celulose obtido a partir do bagaço de cana-de-açúcar por <sup>1</sup>H- RMN. **Polímeros**, v. 20, n. 2, p. 85–91, 2010.
- CIANNAMEA, E. M.; STEFANI, P. M.; RUSECKAITE, R. A. Properties and antioxidant activity of soy protein concentrate films incorporated with red grape extract processed by casting and compression molding. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 353–362, 2016.
- CUTTRISS, A. J. et al. **Carotenoids**. [s.l: s.n.]. v. 58
- DA SILVA, M. M. et al. The Production, Characterization, and the Stability of Carotenoids Loaded in Lipid-Core Nanocapsules. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 7, p. 1148–1158, 2016.
- DANNENBERG, G. DA S. et al. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 314–318, 2017.
- DE CAMPO, C. et al. Zeaxanthin nanoencapsulation with *Opuntia monacantha* mucilage as structuring material: Characterization and stability evaluation under different temperatures. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 558, p. 410–421, 2018.
- DE CAMPO, C. et al. Incorporation of zeaxanthin nanoparticles in yogurt: Influence on physicochemical properties, carotenoid stability and sensory analysis. **Food Chemistry**, v. 301, 2019.
- DE FREITAS, R. R. M.; SENNA, A. M.; BOTARO, V. R. Influence of degree of substitution on thermal dynamic mechanical and physicochemical properties of cellulose acetate. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 452–458, 2017.

DE OLIVEIRA RIOS, A.; MERCADANTE, A. Z. Novel method for the determination of added annatto colour in extruded corn snack products. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 2, p. 125–133, 2004.

DO SOCORRO ROCHA BASTOS, M. et al. Physical and mechanical testing of essential oil-embedded cellulose ester films. **Polymer Testing**, v. 49, p. 156–161, 2016.

EDGAR BUCHANAN, C.M., DEBENHAM, J.S., RUNDQUIST, P.A., SEILER, B.D., SHELTON, M.C., TINDALL, D., K. J. Advances in cellulose ether performance and application. **Prog. Polym. Sci.**, v. 26, p. 1605–1688, 2001.

EDGE, R.; MCGARVEY, D. J.; TRUSCOTT, T. G. The carotenoids as anti-oxidants - A review. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 41, n. 3, p. 189–200, 1997.

FANG, Y. et al. Tensile and Barrier Properties of Edible Films Made from Whey Proteins. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 1, p. 188–193, 2002.

FERREIRA, A. S. et al. Influence of grape pomace extract incorporation on chitosan films properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 490–499, 2014.

FISCHER, S. et al. Properties and applications of cellulose acetate. **Macromolecular Symposia**, v. 262, n. 1, p. 89–96, 2008.

FOOTE, C. S.; DENNY, R. W. **Chemistry of Singlet Oxygen. VII. Quenching by  $\beta$ -Carotene** *Journal of the American Chemical Society*, 1968.

FRATIANNI, A. et al. Effect of a physical pre-treatment and drying on carotenoids of goji berries (*Lycium barbarum* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 92, p. 318–323, 2018.

GHASEMLOU, M. et al. Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 1117–1126, 2013.

GILBERT, M. Cellulose Plastics. In: **Brydson's Plastics Materials**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 617–630.

GIMÉNEZ, B. et al. Antioxidant properties of green tea extract incorporated to fish gelatin films after simulated gastrointestinal enzymatic digestion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 445–451, 2013.

GOMES, F. D. S. Carotenoides: Uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Revista de Nutricao**, v. 20, n. 5, p. 537–548, 2007.

GONZÁLEZ, K. et al. Starch and cellulose nanocrystals together into thermoplastic starch bionanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 83–90, 2015.

GOUVÊA, D. M. et al. Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 85–91, 2015.

HABIBI, Y.; LUCIA, L. A.; ROJAS, O. J. Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 6, p. 3479–3500, 2010.

HADLEY, P.; SCHWARTZ, S. J. Lycopene. **Encyclopedia of Dietary Supplements**, v. 51, n. 06, p. 421–434, 2004.

HEINZE, T.; LIEBERT, T. Chemical characteristics of cellulose acetate. **Macromolecular Symposia**, v. 208, p. 167–237, 2004.

HUQ, T. et al. Nanocrystalline cellulose (NCC) reinforced alginate based biodegradable nanocomposite film. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 4, p. 1757–1763, 2012.

HWANG, S. W. et al. Poly(L-lactic acid) with added  $\alpha$ -tocopherol and resveratrol: Optical, physical, thermal and mechanical properties. **Polymer International**, v. 61, n. 3, p. 418–425, 2012.

IAHNKE, A. O. E. S. et al. Antioxidant films based on gelatin capsules and minimally processed beet root (*Beta vulgaris* L. var. *Conditiva*) residues. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 10, p. 1–10, 2016.

KARABULUT, I. Effects of  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene and ascorbyl palmitate on oxidative stability of butter oil triacylglycerols. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 622–627, 2010.

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 30 maio 2005.

KONG, K. W. et al. Revealing the power of the natural red pigment lycopene. **Molecules**, v. 15, n. 2, p. 959–987, 2010.

KOVARY, K. et al. Biochemical behaviour of norbixin during in vitro DNA damage induced by reactive oxygen species. **British Journal of Nutrition**, v. 85, n. 04, p. 431, 2001.

KRINSKY, N. I. Antioxidant functions of carotenoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 7, n. 6, p. 617–635, 1989.

KRINSKY, N. I.; JOHNSON, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 6, p. 459–516, 2005.

LANDRUM, J. T.; BONE, R. A. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n. 1, p. 28–40, 2001.

LERFALL, J. **Carotenoids: Occurrence, Properties and Determination**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2016.

LIU, Y. et al. Molecular interactions, characterization and antimicrobial activity of curcumin–chitosan blend films. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 564–572, 2016.

LÖBMANN, K.; SVAGAN, A. J. Cellulose nanofibers as excipient for the delivery of poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 533, n. 1, p. 285–297, 2017.

- MALI, S. et al. Antiplasticizing effect of glycerol and sorbitol on the properties of cassava starch films. **Braz. J. Food Technol.**, v. 11, n. 3, p. 194–200, 2008.
- MARTINS, J. T.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. Influence of  $\alpha$ -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 220–227, 2012.
- 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, p. 205–213, 2015.
- MATTEA, F.; MARTÍN, Á.; COCERO, M. J. Carotenoid processing with supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 93, n. 3, p. 255–265, 2009.
- MEDINA JARAMILLO, C. et al. Biodegradability and plasticizing effect of yerba mate extract on cassava starch edible films. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 150–159, 2016.
- MONEGO, D. L.; DA ROSA, M. B.; DO NASCIMENTO, P. C. Applications of computational chemistry to the study of the antiradical activity of carotenoids: A review. **Food Chemistry**, v. 217, p. 37–44, 2017.
- MONTERO, P. et al. Microcapsules containing astaxanthin from shrimp waste as potential food coloring and functional ingredient: Characterization, stability, and bioaccessibility. **LWT - Food Science and Technology**, v. 70, p. 229–236, 2016.
- MOON, R. J. et al. **Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites**. [s.l: s.n.]. v. 40
- MULLER, J.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A. Poly(lactic) acid (PLA) and starch bilayer films, containing cinnamaldehyde, obtained by compression moulding. **European Polymer Journal**, v. 95, p. 56–70, 2017.
- MÜLLER, P. et al. Interactions, structure and properties in PLA/plasticized starch blends. **Polymer (United Kingdom)**, v. 103, p. 9–18, 2016.
- 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, p. 9–16, 2015.
- NAGARAJAN, J. et al. Carotenoids. In: **Nutraceutical and Functional Food Components**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 259–296.
- NAGARAJAN, J. et al. A facile water-induced complexation of lycopene and pectin from pink guava byproduct: extraction, characterization and kinetic studies. **Food Chemistry**, v. 296, n. May, p. 47–55, 2019.
- NORONHA, C. M. et al. Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with  $\alpha$ -tocopherol nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 159, p. 529–535, 2014.
- NUNES, I. L.; MERCADANTE, A. Z. Obtenção de cristais de licopeno a partir de descarte de tomate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 440–447, 2004.

OBEROI, D. P. S.; SOGI, D. S. Utilization of watermelon pulp for lycopene extraction by response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 232, p. 316–321, 2017.

ONU. **Latin America wakes up to the problem of plastic straws | Cleanseas**. Disponível em: <<https://www.cleanses.org/impact/latin-america-wakes-problem-plastic-straws>>. Acesso em: 27 jun. 2019.

ORTEGA-TORO, R. et al. Active bilayer films of thermoplastic starch and polycaprolactone obtained by compression molding. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 282–290, 2015.

PAGNO, C. H. et al. Synthesis of biodegradable films with antioxidant properties based on cassava starch containing bixin nanocapsules. **Journal of Food Science and Technology**, p. 1–9, 2016.

PEDRO, A. C. et al. Bioactive compounds of organic goji berry (*Lycium barbarum* L.) prevents oxidative deterioration of soybean oil. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 90–97, 2018.

PHOOPURITHAM, P. et al. Antioxidant Properties of Selected Plant Extracts and Application in Packaging as Antioxidant Cellulose-Based Films for Vegetable Oil. **Packaging Technology and Science**, v. 25, n. 3, p. 125–136, 2012.

PIÑEROS-HERNANDEZ, D. et al. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 488–495, 2017.

POLA, C. C. et al. Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 9, p. 69–78, 2016.

POOJARY, M. M.; PASSAMONTI, P. Extraction of lycopene from tomato processing waste: Kinetics and modelling. **Food Chemistry**, v. 173, p. 943–950, 2015.

POTULSKI, D. C. et al. Influência da incorporação de celulose microfibrilada nas propriedades de resistência mecânicas do papel. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, v. 40, n. 103, p. 345–351, jan. 2014.

PRASAD, A. K.; MISHRA, P. C. Modeling the mechanism of action of lycopene as a hydroxyl radical scavenger. **Journal of Molecular Modeling**, v. 20, n. 5, 2014.

RANVEER, R. C. **Lycopene: A natural red pigment**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. v. 7

REINHOLD, C.; SCHWEIGGERT, R. M. **Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages**. [s.l.: s.n.].

REIS, L. C. B. et al. Active biocomposites of cassava starch: The effect of yerba mate extract and mango pulp as antioxidant additives on the properties and the stability of a packaged product. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 382–391, 2015.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington:



International Life Science Institute Press, 2001.

RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; STANGE, C. Biosynthesis of carotenoids in carrot: An underground story comes to light. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 539, n. 2, p. 110–116, 2013.

RUDAZ, C.; BUDTOVA, T. Rheological and hydrodynamic properties of cellulose acetate/ionic liquid solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1966–1971, 2013.

SÁNCHEZ-ORTEGA, I. et al. Characterization and antimicrobial effect of starch-based edible coating suspensions. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 906–913, 2016.

SANCHÍS, E. et al. Browning inhibition and microbial control in fresh-cut persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Rojo Brillante) by apple pectin-based edible coatings. **Postharvest Biology and Technology**, v. 112, p. 186–193, 2016.

SANTOS, A. A. A. et al. Influence of norbixin on plasma cholesterol-associated lipoproteins, plasma arylesterase/paraoxonase activity and hepatic lipid peroxidation of Swiss mice on a high fat diet. **Food Chemistry**, v. 77, n. 4, p. 393–399, 2002.

SARTORI, T.; MENEGALLI, F. C. Development and characterization of unripe banana starch films incorporated with solid lipid microparticles containing ascorbic acid. **Food Hydrocolloids**, v. 55, p. 210–219, 2016.

SCOTTER, M. The chemistry and analysis of annatto food colouring: A review. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 26, n. 8, p. 1123–1145, 2009.

SELIGRA, P. G. et al. Biodegradable and non-retrogradable eco-films based on starch–glycerol with citric acid as crosslinking agent. **Carbohydrate Polymers**, v. 138, p. 66–74, 2016.

SHEGOKAR, R.; MITRI, K. Carotenoid lutein: A promising candidate for pharmaceutical and nutraceutical applications. **Journal of Dietary Supplements**, v. 9, n. 3, p. 183–210, 2012.

SHUMSKAYA, M.; WURTZEL, E. T. The carotenoid biosynthetic pathway: Thinking in all dimensions. **Plant Science**, v. 208, p. 58–63, 2013.

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

SIWACH, R.; TOKAS, J.; SETH, R. Use of lycopene as a natural antioxidant in extending the shelf-life of anhydrous cow milk fat. **Food Chemistry**, v. 199, p. 541–546, 2016.

SOLYMOSI, K. et al. **Food colour additives of natural origin**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2015.

SOUZA, A. C. et al. Cassava starch biodegradable films: Influence of glycerol and clay nanoparticles content on tensile and barrier properties and glass transition temperature. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 110–117, 2012.

SPARROW, J.; KIM, S. The Carotenoids of Macular Pigment and Bisretinoid Lipofuscin Precursors in Photoreceptor Outer Segments. In: LANDRUM, J. T. (Ed.). . **Carotenoids: Physical, chemical, and biological functions and properties**. [s.l: s.n.]. p. 355–363.

STANCIK, C. M. et al. Accelerated light protection performance measurement technology validated for dairy milk packaging design. **Packaging Technology and Science**, v. 30, n. 12, p. 771–780, 2017.

STOLL, L. et al. Active biodegradable film with encapsulated anthocyanins: Effect on the quality attributes of extra-virgin olive oil during storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, n. May, 2017.

STOLL, L. et al. Poly(acid lactic) films with carotenoids extracts: Release study and effect on sunflower oil preservation. **Food Chemistry**, v. 281, p. 213–221, 2019.

STRAUB, O. **Key to Carotenoids**. Basel: Birkhäuser Basel, 1987.

SUWANARUANG, T. Analyzing Lycopene Content in Fruits. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 11, p. 46–48, 2016.

TRACHE, D. et al. Microcrystalline cellulose: Isolation, characterization and bio-composites application—A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 789–804, 2016.

VALENCIA-SULLCA, C. et al. Thermoplastic cassava starch-chitosan bilayer films containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, 2017.

VARGAS, C. G. et al. Comparative study on the properties of films based on red rice (*Oryza glaberrima*) flour and starch. **Food Hydrocolloids**, v. 65, p. 96–106, abr. 2017.

WAN DAUD, W. R.; DJUNED, F. M. Cellulose acetate from oil palm empty fruit bunch via a one step heterogeneous acetylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 252–260, 2015.

WANG, L. F.; RHIM, J. W. Grapefruit seed extract incorporated antimicrobial LDPE and PLA films: Effect of type of polymer matrix. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 338–345, 2016.

WANG, W.; JUNG, J.; ZHAO, Y. Chitosan-cellulose nanocrystal microencapsulation to improve encapsulation efficiency and stability of entrapped fruit anthocyanins. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1246–1253, 2017.

XAVIER, A. A. O.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Carotenoids as a Source of Antioxidants in the Diet. In: **Carotenoids in Nature: Biosynthesis, Regulation and Function**. [s.l: s.n.]. p. 359–375.