



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS QUÍMICA E BIOLÓGICA –
PPGTQB

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES DE PVC
INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS
DE ZINCO PARA CONSERVAÇÃO DE
ALIMENTOS**

Maria Graciele Jesus Oliveira

Orientador: Prof. Fabricio Machado Silva, D.Sc.
Coorientadora: Profa. Lilian Rodrigues Braga, D.Sc.

Brasília, março de 2018.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS QUÍMICA E BIOLÓGICA – PPGTQB

DESENVOLVIMENTO DE FILMES DE PVC INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ZINCO PARA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia Química.

Maria Graciele Jesus Oliveira

Orientador: Prof. Fabricio Machado Silva, D.Sc.

Coorientadora: Profa. Lilian Rodrigues Braga, D.Sc.

Brasília, março de 2018.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Maria Graciele Jesus Oliveira**, matrícula nº **16/0099153**, intitulada ***“DESENVOLVIMENTO DE FILMES DE PVC INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ZINCO PARA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS”***, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 19 de março de 2018.

Prof. Dr. Fabricio Machado Silva
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof.^a Dra. Ana Cristi Basile Dias
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof.^a Dra. Simone Monteiro e Silva
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof.^a Dra. Ellen Tanus Rangel
Membro Suplente (UNIP)

Em 19 de março de 2018.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu amado filho, Eduardo Dal Pizzol e ao meu porto seguro, Ricardo Dal Pizzol, por todo apoio e incentivo.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e por ter me dado forças para chegar até aqui. Agradeço ao meu esposo, Ricardo Dal Pizzol e ao meu filho, Eduardo Dal Pizzol, aos meus familiares, pela paciência e compreensão não só agora no mestrado, mas durante toda a minha vida acadêmica. Obrigada pelas palavras de incentivo e pelas cobranças. Sou muito grata a vocês por tudo!

Não poderia deixar de agradecer ao professor Fabricio Machado, por todo apoio, incentivo e ensino. Obrigada pela orientação e por depositar tanta confiança em mim. Agradeço igualmente a pesquisadora Lilian R. Braga pela co-orientação, conselhos, paciência e empenho em me ajudar, sanar dúvidas e buscar alternativas juntas para que a pesquisa tivesse andamento. Todo esse empenho; tenho certeza que me fez crescer, amadurecer e aprender muito como profissional.

Agradeço também a professora e pesquisadora Ellen Tanus Rangel, por me auxiliar nos ensaios microbiológicos.

Agradeço às doutorandas Fabiana, Camila que estiveram comigo durante praticamente toda essa caminhada de dois anos por me darem ideias, por procurarem me ajudar. Muito obrigada a mestrandas Valéria, pelas discussões, trocas de conhecimentos e por sempre dizer que tudo iria dar certo, mesmo quando as coisas não estavam caminhando bem.

Gostaria de agradecer o empenho e carinho ao pessoal do laboratório de Laboratório de Desenvolvimento de Processos Químicos – LDPQ e do Laboratório de automação e instrumentação analítica – LIAMA.

Agradeço também ao pessoal do laboratório de microscopia eletrônica, por todo empenho e dedicação, em me auxiliarem nas análises de MEV e MET. Agradeço também aos pesquisadores, Leonardo Pérez e Marina del V. Soazo da Universidade de Rosário (UNR) do Instituto de Química de Rosário, na Argentina pelo apoio e condução dos testes de propriedades mecânicas. Agradeço de igual forma ao pesquisador Anderson Mendonça Medeiros do Laboratório de Química, Catálise, Polímeros e Processos (C2P2) da Universidade Claude Bernard – Lyon, França.

Agradeço também ao pessoal da escola onde leciono por todo carinho e compreensão e por acreditarem que sempre daria certo.

"De tudo ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um novo caminho. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro."

Fernando Sabino

Resumo

Com a necessidade crescente por alimentos com características nutricionais e organolépticas preservadas e com intuito de atender um público cada vez mais exigente por alimentos saudáveis e com o mínimo de conservantes ou aditivos incorporados diretamente ao produto surge o interesse em desenvolver embalagens ativas com propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Este trabalho teve por objetivo desenvolver filmes baseados em poli(cloreto de vinila) (PVC) incorporados com nanopartículas de zinco (ZnNPs) com os antioxidantes naturais, quercetina (Q), morina (M) e ácido cítrico (AC) nas concentrações de 0,5 % e 1,0 % empregando o método *casting*. Na primeira etapa deste estudo foram sintetizadas as nanopartículas de zinco com os antioxidantes naturais (ZnQ%, ZnM% e ZnAC%) e, posteriormente na segunda etapa as nanopartículas sintetizadas foram empregadas no desenvolvimento dos filmes (PVC_{ZnQ%}, PVC_{ZnM%} PVC_{ZnAC%}). A incorporação de ZnQ%, ZnM% e ZnAC% na matriz de PVC afetou consideravelmente as propriedades físico-químicas, ópticas, mecânica e térmica dos filmes empregando diferentes técnicas de caracterização. Os resultados morfológicos confirmaram que a incorporação das nanopartículas na matriz polimérica dispersaram adequadamente, de modo a produzir filmes com superfícies homogêneas, lisas e isentas de poros. Além disso, notou-se que o aumento da concentração das nanopartículas de 0,5 % para 1,0 % favoreceu na redução das taxas de transmitância permitindo a obtenção de filmes transparentes e barreiras a luz UV. Os ensaios mecânicos e térmicos confirmaram melhorias nas propriedades dos filmes com a incorporação das nanopartículas. A capacidade antioxidante dos filmes foi avaliada pelo método DPPH e a ordem foi PVC_{ZnQ%} > PVC_{ZnM%} > PVC_{ZnAC%} > PVC, assim como o ensaio antimicrobiano revelou que os filmes confeccionados podem exercer atividade de controle no crescimento de microrganismos indesejáveis na conservação de alimentos. Além disso, os resultados com o presunto pré-cozido embalados com os filmes antioxidantes mostrou um percentual de perda de massa inferior ao do filme controle. Também apresentaram um aumento nos valores de acidez do presunto o que sugere um aumento no tempo de armazenamento do produto. Em conclusão, os filmes ativos podem ser uma boa alternativa para serem aplicados em alimentos gordurosos com o objetivo de reduzir a oxidação lipídica e diminuir o crescimento de bactérias e fungos e prevenir a sua degradação.

Palavras-chave: Embalagem ativa, PVC, morina, quercetina e ácido cítrico.

Abstract

With the growing need for foods with preserved nutritional and organoleptic characteristics and in order to meet an increasingly demanding public for healthy foods and with the minimum of preservatives or additives directly incorporated into the product, the interest arises in developing active packaging with antioxidant and antimicrobial properties. This paper to develop films based on poly(vinyl chloride) (PVC) incorporated with zinc nanoparticles (ZnNPs) with natural antioxidants, quercetin (Q), morin (M) and citric acid (AC) at concentrations of 0, 5% and 1.0% using the casting method. In the first stage of this study, the nanoparticles of zinc with the natural antioxidants (ZnQ%, ZnM% and ZnAC%) were synthesized and, in the second stage, the nanoparticles synthesized were used in the development of the films (PVC_{ZnQ%}, PVC_{ZnM%} PVC_{ZnAC%}). The incorporation of ZnQ%, ZnM% and ZnAC% in the PVC matrix considerably affected the physical-chemical, optical, mechanical and thermal properties of the films using different characterization techniques. The morphological results confirmed that the incorporation of the nanoparticles into the polymer matrix adequately dispersed in order to produce films with homogeneous, smooth and pore-free surfaces. In addition, it was noticed that the increase in nanoparticle concentration from 0,5% to 1,0% favored the reduction of the transmittance rates allowing the production of films with transparency and barriers to UV light. The mechanical and thermal tests confirmed improvements in the properties of the films with the incorporation of the nanoparticles. The antioxidant capacity of the films was evaluated by the DPPH method and the order was PVC_{ZnQ%} > PVC_{ZnM%} > PVC_{ZnAC%} > PVC, as well as the antimicrobial assay showed that the ready, made films can exert control activity in the growth of undesirable microorganisms in food preservation. In addition, the results with the precooked ham packed with the antioxidant films showed a lower percentage of mass loss than the control film. They also showed an increase in the ham acidity values, which suggests an increase in the product storage time. In conclusion, active films can be a good alternative to be applied in fatty foods with the objective of reducing lipid oxidation and decreasing the growth of bacteria and fungi and preventing their degradation.

Key words: active packaging, PVC, morin, quercetin and citric acid.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVO GERAL	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO DA BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. EMBALAGENS ATIVAS	4
3.2. SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES	7
3.2.1. Quercetina	7
3.2.2. Morina	8
3.2.3. Ácido Cítrico	9
3.3. EMBALAGENS ANTIOXIDANTES	9
3.4. APLICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS NAS EMBALAGENS ANTIOXIDANTES	14
3.5. APLICAÇÕES DAS EMBALAGENS ANTIOXIDANTES	15
3.6. EMBALAGENS ANTIMICROBIANAS	17
3.7. LEGISLAÇÃO APLICADA ÀS EMBALAGENS ATIVAS	18
4.MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1. REAGENTES	21
4.2. EQUIPAMENTOS	21
4.3. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE ZINCO COM ANTIOXIDANTES	22
4.4. PRODUÇÃO DOS FILMES ANTIOXIDANTES	23
4.5. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES ANTIOXIDANTES	24
4.5.1. Avaliação da Transmissão de luz e transparência dos filmes antioxidantes	24
4.5.2. Avaliação morfológica por MEV	24
4.5.3. Avaliação das nanopartículas por Microscopia de Transmissão	24
4.5.4. Avaliação estrutural por FTIR-ATR	25
4.5.5. Análise Termogravimétrica – TGA	25
4.5.6. Propriedades Mecânicas	25
4.5.7. Determinação da atividade antioxidante dos filmes	26
4.5.8. Determinação da atividade antimicrobiana dos filmes	27
4.6. APLICAÇÃO DOS FILMES ANTIOXIDANTES AO PRESUNTO FATIADO	27
4.6.1. Perda de massa (%)	27
4.6.2. Determinação do pH	28
4.6.3. Acidez Titulável Total	28
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. ASPECTO VISUAL E ESPESSURA	29
5.2. ENSAIO DE TRANSMITÂNCIA E TRANSPARÊNCIA	30
5.3. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA DE VARREDURA ELETRÔNICA - MEV	32
5.4. MICROSCOPIA DE TRANSMISSÃO ELETRÔNICA – MET	33

5.5.ESPECTROS DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER -FTIR-ATR	35
5.6.ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA – TGA.....	39
5.7.PROPRIEDADES MECÂNICAS	40
5.8.ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	42
5.9. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	45
6. APLICAÇÃO DOS FILMES ANTIOXIDANTES EM PRESUNTO FATIADO.....	44
6.1. PERDA DE MASSA(%)	44
6.2. DETERMINAÇÃO DO pH.....	46
6.3. ACIDEZ TITULÁVEL	47
7.CONCLUSÕES	48
7.1. Sugestões para trabalhos futuros	53

Índice de Figuras

FIGURA 1 – ESQUEMA DA CLASSIFICAÇÃO DOS ADITIVOS DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CNS/MS N.º 04, DE 24 DE NOVEMBRO DE 1988. (*) ²²	05
FIGURA 2 – ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES.	06
FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCETINA.	07
FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DA MORINA.....	08
FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO CÍTRICO	08
FIGURA 6 – ESTRUTURA DO MONÔMERO DE CLORETO DE VINILA (PVC)	11
FIGURA 7 – ESQUEMA DA METODOLOGIA DE <i>CASTING</i>	14
FIGURA 8 – ESQUEMA DO PROCESSO DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA, ADAPTADO DE JOHNSON & DECKER, 2015. ⁷⁴	16
FIGURA 9 – ESQUEMA SIMPLIFICADO DAS ETAPAS DA SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE ZINCO COM ANTIOXIDANTES.	22
FIGURA 10 – ESQUEMA SIMPLICADO DAS ETAPAS DE SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE ZINCO COM ANTIOXIDANTE QUERCETINA (ADAPATADO DE MALLAKPOUR E JAVADPOUR)	23
FIGURA 11 – ESQUEMA DA METOLOGIA DE <i>CASTING</i>	24
FIGURA 12 – FILMES ANTIOXIDANTES INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ZINCO SINTETIZADOS PELO MÉTODO DE <i>CASTING</i>	30
FIGURA 13 – VALORES (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO, N = 5), PROPRIEDADE ÓPTICA DE TRANSMITÂNCIA (%) DOS FILMES ATIVOS INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ZINCO E ANTIOXIDANTES	31
FIGURA 14 – VALORES (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO, N = 5), PROPRIEDADE ÓPTICA DE TRANSPARÊNCIA (%) DOS FILMES ATIVOS INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ZINCO E ANTIOXIDANTES E.	31
FIGURA 15 – FOTOMICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DOS FILMES COM AUMENTO DE 5.000 VEZES DOS FILMES DE PVC (A), PVC _{ZnQ0,5%} (B), PVC _{ZnQ1%} (C), PVC _{ZnM0,5%} (D), PVC _{ZnM1,0%} (E), PVC _{ZnAc0,5%} (F) E PVC _{ZnAc1,0%} (G).....	34
FIGURA 16 – IMAGENS DO MET DOS FILMES DE PVCZnQ1,0% (A) E (B) E PVCZnQ1,0% (C) E (D) COM 20 NM E 50 NM, RESPECTIVAMENTE.....	35
FIGURA 17 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO (A) PADRÃO DE MORINA, (B) PLASTIFICANTE, (C) PVC CONTROLE, (D) PVC _{ZnM0,5%} E (E) PVC _{ZnM1,0%}	37
FIGURA 18 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO (A) PADRÃO DE QUERCETINA, (B) PLASTIFICANTE, (C) PVC CONTROLE, (D) PVC _{ZnQ0,5%} E (E) PVC _{ZnQ1,0%}	39
FIGURA 19 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO (A) PADRÃO DE ÁCIDO CÍTRICO, (B) PLASTIFICANTE, (C) PVC CONTROLE, (D) PVC _{ZnAc0,5%} E (E) PVC _{ZnAc1,0%}	40
FIGURA 20 – TERMOGRAMAS DE TGA DOS FILMES DE PVC ANTIOXIDANTES E CONTROLE. ...	41
FIGURA 21 – PORCENTAGEM DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS FILMES ANTIOXIDANTES NOS DIFERENTES TEMPOS 3 H E 24 H.	44
FIGURA 22 – PRESUNTOS PRÉ-COZIDOS E EMBALADOS EM FILMES DE PVC CONTROLE (A), PVC _{ZnQ0,5%} (B), PVC _{ZnQ1,0%} (C), PVC _{ZnM0,5%} (D), PVC _{ZnM1,0%} (E), PVC _{ZnAc0,5%} (F), PVC _{ZnAc1,0%} (G).....	47
FIGURA 23 – PERDA DE MASSA DO PRESUNTO FATIADO EMBALADOS EM FILMES ANTIOXIDANTES E PVC CONTROLE POR 5 DIAS.	47

FIGURA 24 – VALORES DE pH DOS PRESUNTOS FATIADOS ARMAZENADOS EM FILMES ANTIOXIDANTES E CONTROLE.....	41
FIGURA 25 – VALORES DE ACIDEZ TITULÁVEL DO PRESUNTO FATIADO ARMAZENADOS EM FILMES ANTIOXIDANTES E CONTROLE.....	49

Índice de Tabelas

TABELA 1: SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES INCORPORADOS DIRETAMENTE NOS POLÍMEROS.....	12
TABELA 2: PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS FILMES ANTIOXIDANTES E PVC CONTROLE.	42

Índice de Abreviaturas e Siglas

- AAT – Atividade antioxidante total
- ABS_{DPPH} – Absorbância da solução de DPPH
- ABS_{AMOSTRA} – Absorbância da amostra
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ASTM – *American Society for Testing and Material*
- BHA – Butil-hidroxianisol
- BHT – Butil-hidroxitolueno
- CE – Comissão Europeia
- DPPH – 2,2-difenil-1picril-hidrazil
- ECHA – Agência Européia de Produtos Químicos
- EFSA – *European Food Safety Authority*
- EMA – *European Medicines Agency*
- ESO – Óleo de soja epoxidado
- EVA – Poli(etileno-co-acetato de vinila)
- EVOH – Poli(etileno-co-álcool vinílico)
- %E – Elongação máxima
- FDA – *Food and Drug Administration*
- FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
- GRAS – Geralmente reconhecido como seguro
- IV – Espectroscopia no infravermelho
- IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- LIAMA – Laboratório de Instrumentação, Automação e Miniaturização Analítica
- LLDPE – Polietileno linear de baixa densidade
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- MET – Microscopia eletrônica de transmissão
- MY – Módulo de Young
- NPs – Nanopartículas metálicas
- PM – Perda de massa
- PP – Polipropileno
- PEAD – Polietileno de alta densidade
- PEBD – Polietileno de baixa densidade

PET – Poli(tereftalato de etileno)
PG – Propil galato
PUFA – Ácidos graxos poli-insaturados
PVC – Poli(cloreto de vinila)
PVC controle – Filme de PVC puro
PVC_{ZnQ0,5%} – Filme de PVC com quercetina 0,5%
PVC_{ZnQ1,0%} – Filme de PVC com quercetina 1%
PVC_{ZnM0,5%} – Filme de PVC com morina 0,5%
PVC_{ZnM1,0%} – Filme de PVC com morina 1%
PVC_{ZnAC0,5%} – Filme de PVC com ácido cítrico 0,5%
PVC_{ZnAC1,0%} – Filme de PVC com ácido cítrico 1%
Q – Quercetina
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
TG – Temperatura de transição vítrea
TGA – Análise Termogravimétrica
TR – Tensão de ruptura
THF – Tetrahidrofurano

1. INTRODUÇÃO

Diante da demanda dos consumidores por alimentos saudáveis, com sabores e características sensoriais preservadas, vem crescendo exponencialmente o interesse das indústrias alimentícias e dos grupos científicos no desenvolvimento de novas tecnologias em embalagens que possam garantir maior qualidade e integridade, frescor e elevar a segurança ao produto embalado.

Conceitos inovadores como as embalagens ativas têm influenciado o modo como as indústrias comercializam alimentos. Embalagens ativas são definidas como um sistema que modifica o meio em que o alimento se encontra com intuito de aumentar o tempo de prateleira mantendo as condições organolépticas.¹

De um modo geral, as embalagens ativas são uma tendência em países europeus e nos EUA, entretanto, no Brasil essa tecnologia tem se mostrado promissora, ainda que de maneira sutil. Nesse sentido não existe uma legislação específica aplicada às embalagens ativas, que disponibilize uma lista positiva de substâncias que podem ter contato com alimentos,² ademais ainda são utilizadas algumas orientações do MERCOSUL assim como regulamentos do órgão regulador americano – FDA e regulamentos europeus.

Nesse sentido, surge o interesse em explorar as embalagens antioxidantes que caracterizam-se como um tipo de embalagem ativa que visa a manutenção da qualidade do alimento diminuindo ou retardando processos degradativos como a oxidação lipídica.³ A oxidação lipídica é umas das principais causas de deterioração em alimentos que possuem algum teor de gordura em sua composição, ademais a exposição desse tipo alimento à luz favorece ainda mais esse processo.

Com intuito de retardar a oxidação lipídica, tornou-se uma prática industrial a adição de antioxidantes sintéticos como o BHA (butil-hidroxianisol) e BHT (butil-hidroxitolueno) diretamente ao alimento com objetivo de remover o oxigênio do meio e assim impedir a reação em cadeia que culmina na deterioração do produto. Esse tipo de antioxidante tem levado a uma série de discussões sobre a sua segurança e a incidência de doenças para o homem.^{4,5} Na busca por antioxidantes naturais, surge o interesse pelos compostos fenólicos, como quercetina, morina^{6,7} e o ácido cítrico,^{8,9} que é amplamente utilizado na indústria alimentícia. Neste cenário, a utilização de antioxidantes incorporados diretamente ao filme consiste em uma alternativa viável, em detrimento ao uso comum destes agentes diretamente ao alimento.

Diante do exposto e das demandas do mercado de alimentos, essa dissertação de mestrado propõe o desenvolvimento e caracterização de filmes alimentícios baseados em poli(cloreto de vinila) – PVC incorporados com nanopartículas de zinco. As nanopartículas foram empregadas como uma alternativa ao uso de antioxidantes naturais (quercetina, morina e ácido cítrico) principalmente por sua relativa facilidade de obtenção e por favorecer a dispersão do antioxidante na matriz polimérica. Os filmes alimentícios podem ser indicados para aumentar a qualidade, a segurança e minimizar a oxidação lipídica dos alimentos gordurosos e diminuir o crescimento de microrganismos indesejáveis devido à sua ação antimicrobiana.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar filmes de poli(cloreto de vinila) incorporados com nanopartículas de zinco combinadas a antioxidantes naturais (quercetina, morina e ácido cítrico) e avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana dos filmes em alimentos.

2.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar as nanopartículas de zinco incorporadas com antioxidantes naturais (quercetina, morina e ácido cítrico).
- Desenvolver os filmes de PVC com 0,5 % e 1,0 % de nanopartículas de zinco incorporadas com antioxidantes naturais.
- Caracterizar os filmes quanto às suas propriedades físicas, físico-químicas, ópticas, térmicas e mecânicas.
- Avaliar a atividade antioxidante dos filmes ativos aplicando-os *in vitro* pelo método DPPH e em alimento (presunto pré-cozido).
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes por um teste qualitativo de barreira contra os patógenos *Bacillus subtilis* e *Acinetobacter* sp.

3. REVISÃO DA BIBLIOGRÁFICA

3.1. Embalagens Ativas

Avanços na tecnologia de embalagens para alimentos têm aumentado consideravelmente devido aos anseios de uma população que busca alimentos saudáveis, seguros, de qualidade e com um maior tempo de vida útil.¹⁰ A embalagem de um modo geral possui quatro funções básicas: proteção, comunicação, conveniência e contenção.¹¹ A embalagem é idealizada para proteger o alimento de fatores externos, tais como, temperatura, umidade, ar e luz, que podem levar à sua degradação, e ainda precisa agradar ao consumidor e minimizar o impacto ambiental. No entanto, a perda da qualidade do alimento pode ocorrer durante a distribuição, processamento e armazenamento, devido principalmente à degradação química, biológica e física.^{12,13,14}

Diante destes avanços, surgem tecnologias projetadas para proteger não apenas para proteger o alimento, como também para permitir à embalagem tradicional tenha uma maior interação com o produto, o que poderá trazer benefícios extras como prolongamento da vida útil, segurança e melhorias nas propriedades do alimento, tais inovações são denominadas embalagem ativa e embalagem inteligente.¹⁵

De acordo com o regulamento das Comunidades Europeias (CE) n.º 450/2004 a embalagem ativa é definida “materiais e artigos que se destinam a estender ou manter o prazo de validade ou melhorar o estado dos alimentos embalados. Eles são projetados para incorporar deliberadamente componentes que liberam ou absorvem substâncias nos alimentos embalados ou o ambiente que envolve os alimentos”. Embalagem inteligente, de acordo com o regulamento citado acima, (CE) n.º 450/2004, é definida “materiais e artigos que monitoram a condição de alimentos embalados ou o ambiente que envolve os alimentos”. Em um conceito mais abrangente a embalagem inteligente é tida como uma tecnologia que utiliza sistemas de comunicação aplicados às embalagens através do monitoramento de mudanças internas e externas.¹¹

Contrário à embalagem ativa que visa prolongar o tempo de vida do alimento, a embalagem inteligente busca transmitir informações aos segmentos específicos como fabricantes, varejistas e consumidores, indicando por exemplo a temperatura de determinado produto.

Para um sistema atuar como embalagem ativa pode ser necessário incorporar ou absorver substâncias (aditivos) diretamente na embalagem para haver uma estreita interação desejável entre a embalagem/alimento para aumentar a vida de prateleira do alimento.^{16,5}

De acordo com a *European Food Safety Authority (EFSA)* aditivos são quaisquer substâncias que normalmente não são consumidas como alimento ou ingrediente, que não possui valor nutricional, mas que tenha sido adicionada ao alimento ou embalagem que o envolva com um propósito definido. Os aditivos alimentares são essenciais para que o alimento mantenha seu sabor e qualidade nutricional, no entanto, muitas vezes a adição dessas substâncias diretamente ao alimento levanta sérias discussões sobre sua segurança, como o risco de desenvolvimento doenças cancerígenas e a toxicidade alimentar.^{12,17,18}

Desse modo, a incorporação do aditivo na embalagem ativa, traz inúmeros benefícios em comparação à embalagem passiva, como menor quantidade de substâncias ativas necessárias, a migração do aditivo ocorre do filme para a superfície do alimento, que é onde inicia o processo de oxidação lipídica, redução do número de etapas do processo industrial como pulverização ou imersão.¹⁹

De acordo com a *Food and Drug Administration (FDA)*, existem mais de 3.000 aditivos alimentares permitido nos EUA e estes são classificados de diversas formas de acordo com o país de origem. Por exemplo, na União Europeia os aditivos são divididos em 9 classes e 3 subclasses, já nos EUA são divididos em seis classes.¹⁸ No Brasil o uso de aditivos é regulamentado pelo Decreto n.º 55.871 de 1965 e por uma série de portarias publicadas, como a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n.º 27 de agosto de 2010 e Portaria n.º 540 de 27 de outubro de 1997 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e Ministério da saúde, respectivamente, e são classificados de acordo com a ação que exercem no alimento, conforme Figura 1, sendo que um mesmo aditivo pode ter mais de uma classificação.^{20, 21,22}



Figura 1. Esquema da classificação dos aditivos de acordo com a Resolução CNS/MS n.º 04, de 24 de novembro de 1988.²³

Diante dos diferentes tipos de aditivos, os antioxidantes destacam-se na indústria alimentícia como alternativa para diminuir os efeitos da deterioração nos alimentos.^{5,24,25} Os antioxidantes são definidos como compostos ou substâncias químicas que inibem a oxidação lipídica, ou ainda qualquer substância que mesmo em concentrações mínimas, diminui a oxidação. Na indústria alimentícia as substâncias antioxidantes sintéticas são comumente adicionadas em alimentos para interromper algumas reações oxidativas, retardando o desenvolvimento de sabores desagradáveis e odores, mantendo a cor e a estabilidade do alimento.²⁶ Dentre os antioxidantes sintéticos adicionados diretamente aos alimentos destacam-se, butil hidroxitolueno (BHT), butil hidroxianisol (BHA), terc-butil hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG).^{27,28}

Atualmente, a sociedade tem demonstrado preocupação com a adição de antioxidantes sintéticos aos alimentos, uma vez que esses podem ser tóxicos ou cancerígenos, desse modo, tem crescido bastante o número de pesquisas com plantas e vegetais a procura de compostos antioxidantes naturais, como por exemplo, α -tocoferol, quercetina, ácido cítrico, ácido ascórbico e extratos de vegetais, que são geralmente seguros e fornecem vários benefícios para a saúde.^{29,30,31}

Entre os antioxidantes naturais, os compostos fenólicos têm chamado atenção de muitos pesquisadores por conta de suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Os grupos fenólicos caracterizam-se por apresentar pelo menos uma hidroxila fenólica responsável pela atividade antioxidante. O mecanismo de ação dos antioxidantes fenólicos parece ser a transferência de átomos de hidrogênio de um de seus anéis (A, B ou C) para o radical reativo estabilizando-o de modo que fenômenos de degradação do alimento possam ser diminuídos.²⁴

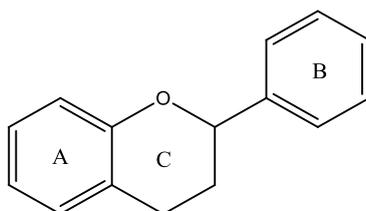


Figura 2. Estrutura básica dos flavonóides.

No que se refere aos antioxidantes fenólicos, uma classe que tem sido bastante estudada, são os flavonoides, Figura 2, os quais apresentam estrutura química peculiar, sendo encontrados em grãos, frutas, vegetais e outros. Tal classe é reconhecidamente eficiente em prevenir a oxidação lipídica por meio da inibição de radicais livres em alimentos ricos em gorduras, sendo que a parte responsável pela eliminação destes radicais são o grupo orto-dihidroxilo no anel B.³² Nessa classe encontram-se algumas moléculas com comprovada atividade antioxidante (quercetina, morina, rutina, miricetina e entre outros).³³⁻³⁵

3.2. Substâncias antioxidantes

Considerando os diversos antioxidantes naturais disponíveis, a seguir é apresentada uma breve revisão referente aos antioxidantes selecionados para este estudo.

3.2.1. Quercetina

A quercetina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi flavona), o principal representante dos flavonoides, presente em plantas e alimentos de origem vegetal, possui propriedades antibacterianas, antioxidantes e antivirais.³⁶ A atividade antioxidante da quercetina foi atribuída à capacidade de eliminar radicais livres na fase aquosa o que promove o aumento da resistência dos lipídios contra a peroxidação, é também conhecida por suas propriedades quelantes e estabilizadoras de ferro.^{37,38}

Entre os flavonoides de origem natural, a quercetina está entre os antioxidantes com maior potencial frente a espécies reativas ao oxigênio, pois seu mecanismo de doação de elétrons é destinado a estabilizar radicais livres. De acordo com Lin *et al.*³⁹, quanto maior a capacidade de doação de elétrons maior será seu potencial antioxidante e maior será sua interação com as moléculas envolvidas no processo de oxidação.

A quercetina impede a formação de radicais livres a partir de três mecanismos: a) iniciação, ocorre pela interação com íons superóxidos; b) formação de radicais hidroxil, ocorre pela quelação com íons metálicos e c) peroxidação lipídica, que se dá pela reação de radicais peróxi provenientes de lipídios no alimento.

A quelação de metais realizada pela quercetina é devida a estrutura química, composta por 2 anéis fenil ligados por 1 anel pirano, estabelecidos por letras A, B ou C, conforme Figura 3. Estas estruturas cíclicas contêm substituintes -OH que favorecem a doação de hidrogênio a fim de estabilizar o radical livre, nas posições 3, 5, 7, 3', 4'.⁴⁰

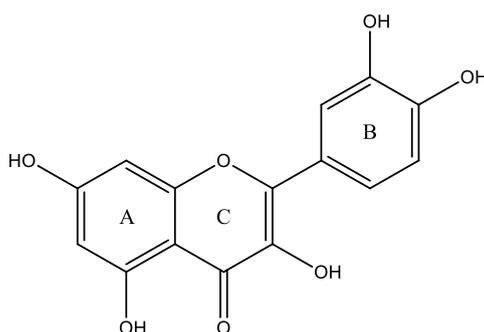


Figura 3. Estrutura química da quercetina.

3.2.2. Morina

O flavonoide morina (3,5,7,20,40-penta-hidroxi-flavona), conforme Figura 4, foi identificado em vegetais e frutas diversas, devido à sua variedade de ações farmacológicas, antioxidantes e antimicrobianas, vem se destacando em pesquisas e estudos em várias áreas.^{41,42,7}

Assim como outros flavonoides, sua atividade bioquímica depende da orientação dos grupos moleculares presentes e de sua estrutura química. A atividade antioxidante da morina refere-se à eliminação de grupamentos OH e o ânion superóxido, que se mostram como espécies altamente reativas na primeira fase do processo de peroxidação lipídica. Ela inibe uma enzima geradora de radicais livres, denominada xantina oxidase, com funções de ativação ou modificação na estrutura dessa enzima.³³ É conhecida também por sua atividade

quelante de íons metálicos através da doação de oxigênio presentes em sua estrutura molecular.⁴¹

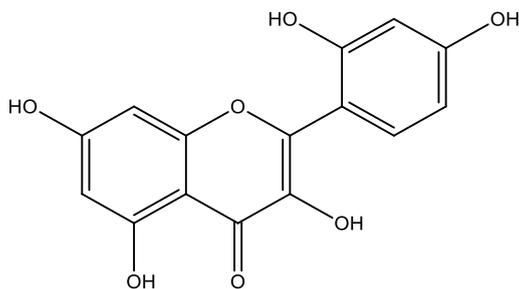


Figura 4. Estrutura química da morina.

3.2.3. Ácido Cítrico

O ácido cítrico é um ácido orgânico de origem natural é encontrado em hortaliças e frutas cítricas podendo ser sintetizado em laboratório por fermentação. Utilizado amplamente na indústria alimentícia como acidificante, aromatizante. Possui ainda a propriedade de atuar como quelante para retirada de metais prejudiciais do meio em que se encontram.⁴³

O ácido cítrico é classificado como antioxidante sinérgico, ou seja, possui pouca atividade quando aplicado isoladamente, entretanto pode aumentar consideravelmente a atividade antioxidante quando usado em combinação com outros antioxidantes.

Ademais, o ácido cítrico, Figura 5, possui atividade antibacteriana e pode ser usado ainda como plastificantes em embalagens para alimentos, por ser seguro seu uso em alimentos, do inglês (*GRAS –Reconhecidamente seguro*) para uso em filmes alimentícios de acordo com o FDA.

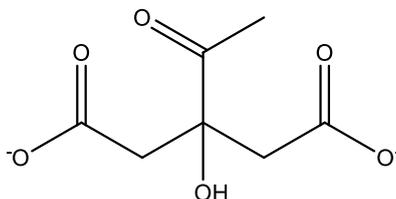


Figura 5. Estrutura química do ácido cítrico.

3.3. Embalagens Antioxidantes

A embalagem antioxidante é um sistema de embalagem ativa idealizada para interagir com a superfície do alimento e assim reduzir reações indesejáveis, como a oxidação.^{10,44}

Níveis elevados de O₂ no interior da embalagem de produtos cárneos podem acelerar o crescimento microbiano e o desenvolvimento da oxidação lipídica que resulta em alterações de sabor, odor, mudança de cor e perdas nutricionais. A oxidação lipídica ocorre pela degradação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) e traz como característica principal rancidez e formação de aldeídos tóxicos que acarretam a perda da qualidade nutricional. Desse modo, torna-se necessário o controle dos níveis de oxigênio no interior da embalagem afim de desacelerar os processos de deterioração do alimento, e é com esse propósito que a embalagem antioxidante atua, ou seja, com mecanismos que alteram ou diminuem os níveis de oxigênio do meio no qual o alimento se encontra de modo que haja uma comunicação entre o polímero e a superfície do alimento com a função precípua de proteção desse produto.^{5, 45}

Há basicamente dois modos de ação dos antioxidantes na embalagem ativa: a) a liberação de compostos presentes no filme para o alimento a uma velocidade controlada e b) a eliminação de gases nocivos (O₂, espécies oxidativas ou íons metálicos) à qualidade do alimento por meio de substâncias que reagem removendo ou modificando o meio no qual estão inseridas, conhecidas como captadoras ou do inglês *scavengers*.⁴⁶

Uma das vantagens em incorporar o antioxidante à embalagem é o fato do aditivo ser liberado para o alimento de forma controlada e a concentração a ser mantida no alimento é conhecida, trazendo segurança para o consumidor. No entanto, quando o antioxidante é adicionado diretamente no alimento têm-se uma grande concentração dessa substância no início do tempo de prateleira - *shelf life* e com o passar do tempo as concentrações podem ser insuficientes para manter as qualidades organolépticas desse produto.^{27,47}

A tecnologia de embalagem antioxidante pode ser dividida em dois grupos, com base na metodologia de fabricação:^{5, 45}

- a) *Dispositivos independentes*: trata-se de um “pacote” independente, como sachê, almofada ou rótulo com a substância antioxidante impregnada, sendo os eliminadores de oxigênio como o único representante desse tipo de embalagem antioxidante. Nesse caso a embalagem onde o produto é acondicionado é tratada como recipiente passivo, pois o dispositivo é que terá função ativa.
- b) *Embalagens antioxidantes*: nesse caso a substância antioxidante será inserida na matriz da embalagem e sua ação se dará através da eliminação de compostos indesejáveis no interior da embalagem, de modo que o antioxidante será liberado para o alimento ou para o meio que o circunda.

As embalagens antioxidantes na forma de sachês, bolsas ou almofadas desempenham muito bem suas funções na preservação de alimentos, especialmente a nível comercial. O primeiro sachê desenvolvido pela *Mitsubishi Gas Chemical Company* na década de 70 foi o absorvedor de oxigênio - Ageless[®], posteriormente várias outras empresas investiram nesta tecnologia e atualmente temos uma infinidade de variedades dessas embalagens antioxidantes com indicações específicas e funções variadas para o tipo de alimento a que se deseja proteger.⁴⁸

Atualmente, há inúmeras pesquisas e patentes distribuídas pelo mundo que aplicam antioxidantes diretamente à matriz polimérica ou na superfície do filme não só para produtos cárneos, mas também para infinidades de alimentos.^{30,31,46} Contudo, vale lembrar que como esse filme estará em contato com o alimento, se faz necessário seguir normas e regulamentos com relação à concentração máxima do antioxidante. A empresa Artibal S.A. desenvolveu um filme antioxidante Atox[®] com óleo essencial de orégano para embalar carne fresca, cujo mecanismo de ação resultou na inibição da oxidação lipídica e manutenção da cor da carne.⁵ Bolumar *et al.*¹⁹ desenvolveram embalagem antioxidante com polietileno de baixa densidade (PEBD) impregnado com extrato de alecrim. A embalagem foi caracterizada e aplicada para embalar carne de frango, cujos os resultados após 25 dias de análise demonstraram que o filme antioxidante foi capaz de inibir os níveis de oxidação lipídica.

Vargas Jr. *et al.*⁴⁹ desenvolveram um filme incorporados com ácido cítrico com duas propriedades muito interessantes (antimicrobiana e antioxidante) para embalar alimentos cárneos. Os filmes com polietileno de baixa densidade incorporados com ácido cítrico foram caracterizados e avaliados por ensaios de atividade antioxidante e contagem de microrganismos. Ao término dos ensaios, os autores conseguiram demonstrar que a carne bovina embalada manteve sua cor e característica organolépticas mantidas por mais tempo quando comparadas com o filme controle (sem a adição do ácido cítrico).

Vários ensaios e caracterizações podem ser realizados para confirmar a efetividade e aplicabilidade da embalagem antioxidante. Diante disso, a escolha do antioxidante e do material polimérico precisam ter afinidade entre si para que dispersão seja homogênea. É bem sabido que a polaridade do meio tem grande influência sobre a atividade antioxidante dos compostos fenólicos, e que alguns estudos demonstram que antioxidantes apolares possuem maior afinidade para alimentos ricos em lipídios, daí a importância de se escolher o antioxidante em função do alimento a ser embalado. Na Tabela 1 são apresentados exemplos de substâncias antioxidantes aplicadas diretamente em diferentes polímeros.^{5,50}

Tabela 1: Substâncias antioxidantes incorporados diretamente nos polímeros.

Substâncias antioxidantes	Polímeros	Alimento embalado	Referências
Óleo essencial de canela, orégano e cravo	Parafina	Tomate cereja	51
Ácido cítrico	LLDPE+amido	carne	49
Ácido cafeico	PP	Suco de laranja	52
Extrato de cevada	LLDPE	Salmão congelado	53
α -tocoferol	PEAD, LLDPE e EVOH	Leite	54
Ácido ascórbico, ácido ferúlico, quercetina, e extrato de chá verde	EVOH	Sardinhas	55
Extrato de alecrim	LLDPE	Frango resfriado	19
Tocoferóis	LLDPE	Peixe	44

Os polímeros sintéticos quando usados como embalagens apresentam interessantes vantagens, tais como, excelentes propriedades de barreira, alta transparência, boa resistência mecânica e fácil manipulação. Dentre os polímeros sintéticos ressaltados na Tabela 1 destacam-se como embalagens antioxidantes o polipropileno (PP), o polietileno linear de baixa densidade (LDPE), o poli(tereftalato de etileno) (PET), o poli(etileno-*co*-álcool vinílico) (EVOH), o poli(etileno-*co*-acetato de vinila) (EVA) e o poli(cloreto de vinila) (PVC).^{56,57,58}

O PVC, obtido do cloreto de vinila, Figura 6, é considerado o segundo termoplástico mais utilizado no mundo e atualmente é uma das maiores *commodities*, sendo amplamente utilizado em virtude de suas propriedades, boa resistência química, inerte, baixo preço, baixa inflamabilidade, boa processabilidade o que garante sua aplicabilidade em diversas áreas, como materiais médicos hospitalares, indústria de alimentos e entre outros.^{59,43,60,61}

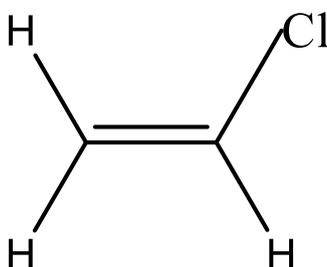


Figura 6. Estrutura química do monômero de cloreto de vinila.

Apesar da versatilidade do PVC, ainda assim, há muitas vezes a necessidade de utilizar substâncias auxiliares para melhorar algumas características desejáveis do polímero, como é o

caso dos plastificantes, que de acordo com a definição da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), o plastificante é uma substância ou material, incorporado em um material plástico ou elastômero, utilizado para aumentar, sua flexibilidade. Com base na regulamentação vigente no país, a Resolução n.º 17, de 17 de março de 2008, regulamenta o uso de aditivos para materiais plásticos e sugere que filmes de PVC sejam seguros para uso em alimentos.²

De acordo com Coltro e Duarte⁶² existem aproximadamente 300 substâncias que podem ser utilizadas como plastificantes, no entanto pouco mais de 100 delas despertam interesse industrial. O uso de plastificantes se faz necessário não apenas para melhorar a flexibilidade do polímero, que resulta da redução da temperatura de transição vítrea, que gira em torno de 80° C.⁶³

A temperatura de transição vítrea, T_g , é um dos parâmetros a ser considerado, pois acima dessa temperatura o PVC apresenta características mais flexíveis e maleáveis, entretanto abaixo dessa temperatura o polímero tem comportamento mais rígido.¹⁴ Alguns plastificantes quando adicionados ao PVC podem conferir melhor flexibilidade e maleabilidade, como os ftalatos. Contudo, os ftalatos têm causado discussões por conta do risco de serem contaminantes e considerados carcinogênicos, uma vez que estes não são ligados quimicamente ao PVC existindo a possibilidade de serem transferidos ao alimento embalado. Desse modo, o uso de plastificantes de origem vegetal, tais como o óleo de girassol, óleo de linhaça e o óleo de soja epoxidado tem crescido como uma alternativa no sentido de prevenir danos ao meio ambiente e aos seres humanos.⁶⁴

O óleo de soja epoxidado (ESO) é usado na indústria principalmente como plastificante e estabilizante para filmes de PVC que terá contato direto com alimentos.⁶⁴ Bueno-Ferrer *et al.*⁶⁴ avaliaram diferentes concentrações de ESO, como único plastificante na matriz do PVC, e após caracterização via análise termogravimétrica, concluíram que o óleo de soja epoxidado pode ser utilizado como único plastificantes para filmes e embalagens de PVC. Com relação à segurança do óleo de soja epoxidado, ou seja, ao fato dele ser transferido para o produto em contato com a embalagem, não há na literatura alguma menção a esse risco, ademais, a Agência Europeia de Produtos Químicos (ECHA) classificou o óleo de soja epoxidado como não tóxico.⁶⁵

Para produção dos filmes e a incorporação de substâncias auxiliares (plastificantes) e aditivos (antioxidantes) na matriz polimérica o método *casting* se destaca por ser um método relativamente simples e barato, que permite a produção de filmes homogêneos e aplicado em pequena escala nos laboratórios de pesquisa.^{66,67}

O método *casting*, Figura 7, caracteriza-se pela mistura do solvente, normalmente orgânico com o polímero e plastificante, quando for o caso, após a solubilização, a mistura é vertida sobre uma placa para posterior evaporação do solvente, que pode ocorrer por horas ou dias. Por fim, o filme remanescente é retirado do recipiente onde foi formado.^{68,69} A obtenção do filme do *casting* depende em muito do grau de coesão entre as moléculas do polímero, dos procedimentos e parâmetros de fabricação (temperatura, tempo de secagem, técnica de evaporação), depende também do plastificante utilizado. Nesta técnica não se tem total controle sobre a espessura do filme, uma vez que esta pode variar bastante de acordo com o polímero e o solvente utilizados.⁷⁰

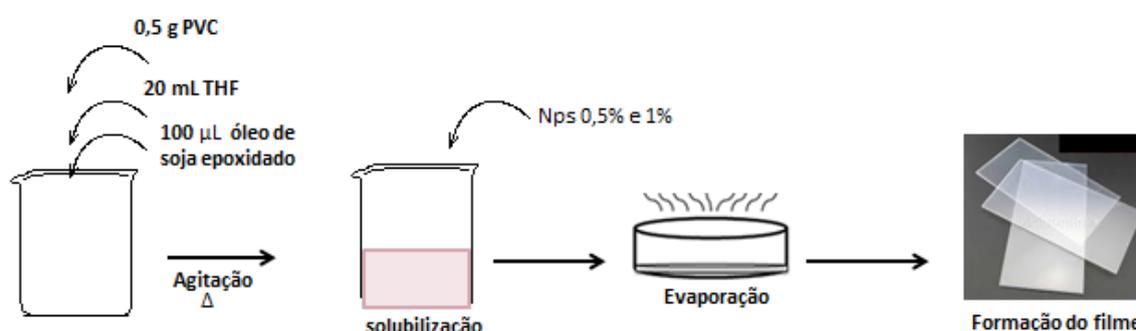


Figura 7. Esquema do método *Casting*.

3.4. Aplicação das nanopartículas metálicas nas embalagens antioxidantes

Atualmente os filmes incorporados com antioxidantes em presença de nanopartículas metálicas (NPs) em matrizes poliméricas têm demonstrado resultados promissores devido à maior dispersão das substâncias antioxidantes na matriz polimérica.^{43,71,72}

Mallakpour e Javadpour⁴³ sintetizaram filmes de PVC imobilizado com óxido de zinco incorporados com ácido cítrico (PVC/ZnO-CA) em diferentes concentrações de ZnO-CA (4, 8 e 12 %). O estudo mostrou que as nanopartículas (NPs) se dispersaram uniformemente na matriz de PVC sem aglomerações e permitiu um controle do tamanho das NPs, além de aumentar a estabilidade térmica dos filmes e serem antimicrobianas, desse modo, tais filmes podem ser aplicados em diversas áreas, entre eles como dispositivos médicos-hospitalares.

Krehula *et al.*¹³ estudaram as propriedades do filme de PVC incorporados com nanopartículas de dióxido de titânio e nitrato de prata e cobre (nano-TiO₂/Ag-Cu), após caracterizações físico-químicas, termogravimétricas e antimicrobianas, os autores relataram

que a incorporação da nanopartículas melhorou a estabilidade dos filmes com a incorporação das nano-TiO₂/Ag-Cu.

Afzal e Akthar⁷³ observaram o efeito de NPs de prata em blendas poliméricas. Após caracterizações por MET, FTIR e MEV e concluíram que a inserção das NPs de prata nos polímeros melhorou as propriedades mecânicas dos nanocompósitos abrindo espaço para uma variedade de aplicações.

Diante do exposto, a síntese de um filme de PVC com a incorporação de nanopartículas metálicas com antioxidante baseado no método *casting* pode agregar uma nova proposta de reduzir a quantidade de antioxidante diretamente ao alimento, inibir a oxidação lipídica, aumentar o *shelf life* (tempo de prateleira), controlar o crescimento de microrganismos indesejáveis e assim trazer segurança para o consumidor aliando questões econômicas, industriais e de saúde pública.

3.5. Aplicações das embalagens antioxidantes

Aliado a esta proposta surge o interesse nas embalagens ativas indicadas para os diversos tipos alimentos, principalmente para os produtos cárneos embutidos, como os salames, salsichas, mortadelas, presuntos. Nos produtos cárneos uma das principais causas de deterioração é a oxidação lipídica, pois este processo pode ocorrer em alimentos que tenha percentual de gordura de até 1%, ela não só causa a perda de nutrientes e o aparecimento de sabor desagradável como diminui a aceitabilidade do consumidor, limita a vida de prateleira de inúmero alimentos, produzindo compostos com baixo peso molecular e o aparecimentos de substâncias tóxicas e maléficas à saúde humana.⁷⁴

A busca por alimentos saudáveis tem feito com que a indústria substitua óleos hidrogenados por ácidos graxos insaturados, os quais são suscetíveis às reações químicas com o oxigênio presente na atmosfera, causando assim a deterioração dos lipídios. O fenômeno da oxidação lipídica envolve ao menos duas formas de oxigênio: o oxigênio singlete (¹O₂) que favorece rapidamente a oxidação em alimentos fotossensíveis e o oxigênio triplete (³O₂) que é responsável pela formação de radicais livres no processo de oxidação lipídica. Ademais, é correto afirmar que ambos os processos contribuem para a perda de nutrientes, formação de substâncias voláteis.⁷⁵

Os substratos gerados na oxidação lipídica são os ácidos graxos insaturados, uma vez que a presença de ligações duplas nessas moléculas favorece a reação com o oxigênio. A taxa

de oxidação é dependente do grau de instauração da molécula e tende a aumentar com acréscimo de ligações duplas provenientes dos ácidos graxos.⁷⁶

As reações de oxidação nos lipídios ocorrem por diversas rotas, como reações de fotoxidação, autoxidação, hidrólises e enzimáticas.

O fenômeno da oxidação lipídica envolve ao menos duas formas de oxigênio: o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) que favorece rapidamente a oxidação em alimentos fotossensíveis e o oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$) que é responsável pela formação de radicais livres no processo de oxidação lipídica. Ademais, é correto afirmar que ambos os processos contribuem para a perda de nutrientes, formação de substâncias voláteis de baixo peso molecular.⁷⁵

O mecanismo de oxidação lipídica ocorre em três fases simultâneas: iniciação, propagação e terminação, conforme Figura 8. O processo de oxidação de lipídios inicia-se quando um átomo de hidrogênio é extraído de um ácido graxo, em condições favoráveis, como luz e temperatura, formando um radical alquilo ($\text{L}\cdot$). A fase de propagação é caracterizada pela estabilização do radical livre e desse modo tornam-se suscetíveis a ação do oxigênio da atmosfera, ocorrendo a formação de produtos primários, como peróxidos ($\text{LOO}\cdot$) e hidroperóxidos ($\text{LOOH}\cdot$). Esses radicais livres formados passam a atuar como propagadores da reação, formando um processo autocatalítico. Por fim, a etapa de terminação se dá quando os dois radicais ($\text{LOO}\cdot$) e ($\text{L}\cdot$) reagem dando origem a produtos estáveis (produtos secundários da reação).^{75,76}

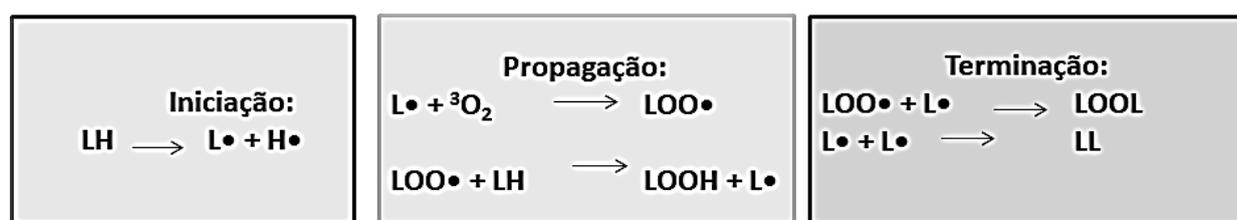


Figura 8. Esquema do processo de oxidação lipídica. Adaptado de Johnson e Decker⁷⁵.

Os alimentos são sistemas químicos extremamente complexos, onde a presença de moléculas diversas, substâncias e elementos variados no alimento ou ao seu redor podem contribuir ou retardar o processo de oxidação lipídica. Diante disso, vários fatores influenciam o processo de autoxidação tornando difícil nomear uma única causa deste processo. Composição lipídica, equilíbrio entre fase aquosa e lipídica, fatores externos, como temperatura, umidade e luz são os principais fatores que determinam a velocidade e a susceptibilidade à oxidação em alimentos ricos em lipídios.^{75,56}

Morelo *et al.*⁷⁷ desenvolveram microcápsulas de quercetina e epicatequina usando inulina como polímero insolúvel em gorduras, e posteriormente avaliaram seus efeitos na estabilidade oxidativa do óleo de girassol, concluindo que a quercetina tem capacidade para ser encapsulada e usada como antioxidante em óleos e gorduras.

No estudo reportado por Lopez-De-Discatillo *et al.*⁵⁵ foi preparada uma embalagem antioxidante a partir de um copolímero, poli(etileno-co-álcool vinílico) (EVOH), incorporados com antioxidantes naturais (quercetina e catequina). Os autores avaliaram as propriedades antioxidantes dos filmes expostos a alimentos sólidos e ricos em gorduras e concluíram que os filmes com quercetina e catequina foram capazes de reduzir a oxidação lipídica em 63% e 59% respectivamente, quando comparados com filmes sem adição dos flavonoides.

Koontz *at al.*⁶ avaliaram a liberação de substâncias naturais, entre elas, a quercetina em um filme a base de polietileno linear de baixa densidade (LLDPE) utilizado para armazenar óleo de coco. Após as caracterizações realizadas para verificar a atividade antioxidante das substâncias naturais os autores puderam demonstrar que a quercetina tem potencial para aumentar o tempo de prateleira mantendo as características sensoriais e organolépticas do óleo de coco embalado.

3.6. Embalagens Antimicrobianas

Na sociedade moderna tem aumentado a preocupação com a alimentação e doenças advindas por contaminação alimentar principalmente por microrganismos que desencadeiam uma série de patologias para o homem.¹⁰ Desse modo as embalagens antimicrobianas tornaram-se muito importantes, principalmente para alimentos cárneos, pois estes tipos de alimentos fornecem nutrientes para o crescimento de bactérias, leveduras e fungos patogênicos como *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* e *Escherichia coli*.^{78,37,66,79}

As embalagens antimicrobianas são um tipo de embalagem ativa que interage com o alimento ou com o espaço entre o filme e o produto para exercer sua atividade, ou seja, diminuir a população microbiana indesejada.

Vários agentes antimicrobianos podem ser incorporados em embalagens poliméricas, os quais podem ser divididos em três grupos principais: agentes químicos, extratos naturais e probióticos.⁸⁰ Dentre os agentes químicos podemos citar os ácidos benzoicos, acéticos, lácticos, entre outros ácidos orgânicos e inorgânicos. Há atualmente uma série de pesquisas muito promissoras em relação aos extratos vegetais de variadas plantas, como é o caso do

estudo conduzido por Mejlholm & Dalgaard, (2002) no qual foi comprovado que 0,05% de óleo essencial de orégano foi suficiente para inibir o crescimento microbiano e prolongou a vida útil de filé de bacalhau.⁸¹ Entre os polímeros antimicrobianos o caso mais reconhecido é o da quitosana, que de acordo com Darmadji & Izumimoto, (1994) inibe várias enzimas microbianas. A quitosana é um polímero natural obtido principalmente de crustáceos e atualmente é produzida comercialmente por fontes marinhas. Duan et. Al, (2010) concluíram que 5g/L de quitosana é suficiente para prolongar a vida útil de ostras de por até 15 dias, quando o usual são 8 dias e diminuir a população de *Pseudomonas*. O ensaio foi realizado com imersão das ostras em uma solução de quitosana por 10 minutos.⁷⁸

Diante do exposto, o uso de embalagens antimicrobianas visam diminuir a população desses microrganismo de quatro modos diferentes:⁴⁵

- a) Incorporação de substâncias antimicrobianas em sachê, almofada ou *pad*;
- b) Incorporação direta de agentes antimicrobianos no polímero;
- c) Uso de substância voláteis na matriz da embalagem que poderá ser liberada na superfície do alimento no momento oportuno;
- d) Uso de polímeros que são genuinamente antimicrobianos, como a quitosana.

Os filmes antimicrobianos do tipo sachê agem de modo que o composto antimicrobiano libere ou absorva gases ou líquidos no interior da embalagem. Nestes sachês podem ser impregnados nanopartículas de prata, cobre ou zinco.⁴⁸

Muriel-Galet, Cerisuelo, López-Carballo, Lara, Gavara & Muñoz. (2012), analisaram um filme polipropileno (PP) incorporado com óleo essencial de orégano e citral ao comparar com filme controle PP, observaram que o filme antimicrobiano reduziu com sucesso o número de *E. coli*, *Salmonella enteric* e *L. monocytogenes* em salada após armazenamento e refrigeração por dois dias.⁸⁰ Kuuliala & Kolppo. (2015), caracterizaram uma embalagem incorporada com prata para acondicionar carne e os resultados apresentados demonstraram que a prata foi eficiente em reduzir o número de microrganismos causadores de deterioração da carne.⁸²

Embalagens antimicrobianas são uma tecnologia inovadora e promissora em especial alinhada às embalagens antioxidantes, pois oferecem maior segurança ao consumidor, é economicamente viável.

3.7. Legislação aplicada às embalagens ativas

Visando a segurança do consumidor, torna-se necessário que todos os aditivos ou substâncias que venham a ter contato com o alimento obedeçam a requisitos que contribuam para não causar mal à saúde. O Brasil não dispõe de uma legislação específica sobre quais materiais não podem ser usados em confecção de embalagens para alimentos, o que se tem atualmente é uma lista positiva de substância que podem ser colocadas em contato com alimentos com a quantidade máxima permitida. A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 17 de 2008 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), traz essa lista positiva de aditivos para confecção de embalagens para alimentos com limites de migração total e migração específica para os alimentos que estejam em contato com as embalagens plásticas.²

O uso de substâncias permitidas para entrar em contato com os alimentos seguem alguns requisitos contidos em regulamentações específicas e que variam de acordo com o país.⁸³

No que diz respeito às instruções normativas para embalagens plásticas estas estão de acordo com as normas preconizadas pela legislação do mercado comum do sul (MERCOSUL). Assim como a RDC n.º 56 de 2012 traz a lista de monômeros positivos e polímeros que podem ser utilizados na confecção de filmes para alimentos.⁸⁴ As RDC's 45 e 46 de 2010 trazem a lista de aditivos que podem ser adicionados diretamente aos alimentos e nas embalagens para acondicionar alimento. Algumas legislações internacionais são reconhecidas e devendo ser respeitadas no Brasil, como *European Medicines Agency (EMA)* e *Food and Drug Administration (FDA)*.

Em outros países alguns avanços já foram alcançados no quesito segurança, por exemplo, na União Europeia para confecção de embalagens para alimentos a questão da migração deve ser levada em consideração e seguir padrões mínimos de boas práticas de fabricação e a diretiva 82/711 da CE estabelece os critérios aceitos para migração de substâncias das embalagens para os alimentos. O regulamento da comissão europeia (CE) 1935/2004 traz as diretrizes que aprovam o uso de embalagens ativas e inteligentes com intuito de melhorar a qualidade de vida do consumidor.¹²

Com relação às nanopartículas, ainda não há nenhuma legislação específica, o que o órgão regulador - Anvisa entende é que para a confecção das nanopartículas deve-se seguir normalmente as legislações vigentes referentes às substâncias que se deseja utilizar, um exemplo é a RDC n.º 56 de 2010, que traz a lista positiva de substâncias preconizadas pelo órgão.⁸³

Neste contexto, convém ressaltar que a embalagens ativas são uma área em expansão e têm se mostrado como uma alternativa às embalagens passivas, visto que a sociedade tem demonstrado interesse em promover a saúde e desse modo tem buscado inovações que garantam a qualidade dos alimentos consumidos. Ademais, embalagens incorporadas com compostos naturais com funções antioxidantes e antimicrobianas e podem ser usadas como embalagens ativas, visando a redução da oxidação e o crescimento de microrganismos indesejáveis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos os materiais e os métodos usados para as sínteses das nanopartículas de zinco com os antioxidantes naturais, a produção dos filmes alimentícios, as caracterizações para avaliar as propriedades físicas, físico-químicas, ópticas, térmicas, mecânicas e os ensaios antioxidantes e antimicrobianos.

4.1. Reagentes

- Poli (cloreto de vinila), (massa molar 130 kDa)
- Quercetina Anidra, pureza ≥ 95 %, Aldrich
- Morina Anidra, pureza ≥ 95 %, Aldrich
- Ácido cítrico monohidratado, pureza ≥ 95 %, Dinâmica
- Óxido de zinco, Dinâmica
- Hidróxido de sódio, Reagen
- Óleo de soja epoxidado
- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Tedia)
- Metanol, Tedia
- Tetraidrofurano (THF), Tedia

4.2. Equipamentos

- Estufa, marca Splabor, modelo Sp 102/2000;
- Agitador magnético com aquecimento Go-Stirrer MS-H-S Go-LabÁgua Milli-Q
- Balança analítica, Shimadzu, precisão de 0,0001 g
- Banho ultra-som, Unique, modelo 1400
- Bomba de vácuo, marca Büchi, modelo V-700
- Estufa com circulação e renovação de ar, marca Marconi, modelo MA 035/3BX;
- pHmetro, marca: HANNA, modelo HI 2221
- Espectrofotômetro UV-Vis, Agilent, modelo 8453
- Espectrômetro de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Varian, Modelo 640-IR
- Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), Modelo JEOL JSM-7001F
- Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), Modelo JEOL JEM-1011

4.3. Síntese das Nanopartículas de zinco com antioxidantes

As nanopartículas de zinco combinadas com os antioxidantes naturais (quercetina, morina e ácido cítrico) foram sintetizadas conforme reportado por Mallakpour e Javadpour⁴³, com adaptações. Para a síntese das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO), foram pesados em balança analítica 0,5000 g de ZnO, em seguida foram adicionados 50 mL água/etanol (8:2 v/v). Esta mistura foi colocada em ultrassom por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, pesou-se 0,0125 g de antioxidante (quercetina, morina e ácido cítrico), na proporção de (1:3 ZnO/Antioxidante em m/m) e usou-se 750 µL de metanol para solubilizar o antioxidante. Utilizou-se solução de NaOH (3 mol/L) para ajustar o pH da suspensão entre 7 e 8. Agitou-se a suspensão por 3 h e posteriormente a mistura ficou em repouso por mais 3 h. Após a mistura foi conduzida para estufa por 24 h a 65° C, conforme esquema abaixo. A Figura 9 abaixo ilustra a processo de síntese das nanopartículas de zinco (ZnNP) com os antioxidantes.

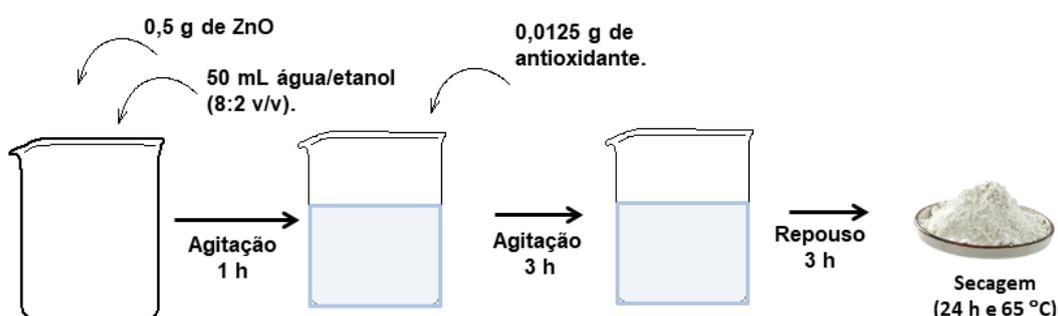


Figura 9. Esquema simplificado das etapas da síntese das nanopartículas de zinco.

A Figura 10 ilustra as etapas do processo de síntese das nanopartículas de zinco com o antioxidante (Ex. quercetina) e mostram as possíveis interações entre os grupos OH com a superfície das nanopartículas de ZnO.⁴³ O mesmo procedimento foi executado em paralelo com os outros compostos antioxidantes (morina e ácido cítrico).

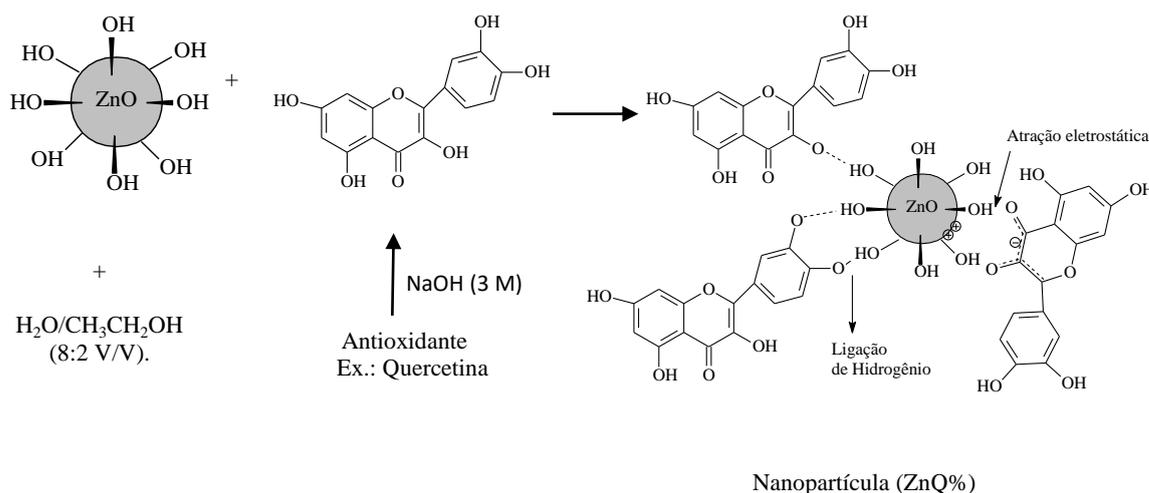


Figura 10. Esquema simplificado das etapas da síntese das nanopartículas de zinco com antioxidante quercetina (adaptado de Mallakpour e Javadpour⁴³).

4.4. Produção dos Filmes antioxidantes

Os filmes foram produzidos pelo método de “*casting*” descrito por Amar e Parisi⁸⁴ e Braga *et al.*⁷², com modificações. Inicialmente, 0,5 g de PVC foi dissolvido em 20 mL de THF contendo 100 μ L do plastificante (óleo de soja epoxidado), a mistura foi mantida sob agitação constante com auxílio de agitador magnético e aquecimento até 60 °C. O THF foi empregado por ser um solvente que solubiliza o PVC e uma vez que após a síntese sofre evaporação total. Em seguida foi adicionada a mistura homogênea concentrações de 0,5 e 1,0 % de nanopartículas de zinco com antioxidante (quercetina, morina ou ácido cítrico). Posteriormente a mistura foi vertida sobre placas de vidro (aproximadamente 30x20 cm) previamente limpas e sanitizadas e mantidas a 25 °C até a secagem e a evaporação completa do solvente ao abrigo da luz por 24 h até a formação dos filmes ativos (PVC_{ZnQ%}, PVC_{ZnM%} e PVC_{ZnAC%}), conforme esquema abaixo (Figura 11). Em paralelo foi confeccionado o filme controle (PVC) com ausência das nanopartículas de zinco com os antioxidantes.⁸⁵

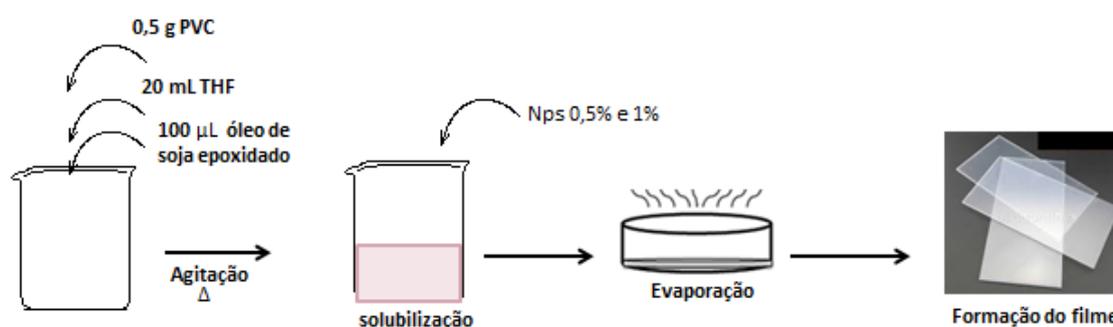


Figura 11. Esquema da metodologia de *Casting*.

Para avaliar o aspecto visual e a espessura dos filmes produzidos foram utilizados câmera digital e um micrômetro manual (modelo Kingtools) com sensibilidade de 0.01 mm. A espessura foi calculada com a média de 10 medidas em diferentes localizações em cada filme.

4.5. Métodos de Caracterização dos filmes antioxidantes

4.5.1. Avaliação da Transmissão de luz e transparência dos filmes antioxidantes

Para avaliar a perda de transparência dos filmes estimou-se a porcentagem de transmissão de luz conforme descrito por Ramos *et al.*⁸⁶. Os filmes foram cortados em tamanhos de 2 x 4 cm e assim fixados na cubeta de quartzo de modo que o feixe de luz incidisse sobre a superfície dos filmes. A célula vazia foi utilizada como controle e as medidas foram realizadas em comprimentos de onda variando de 250 a 600 nm usando um Espectrofotômetro UV-VIS (Modelo 8453, Agilent). Os ensaios foram conduzidos em quintuplicata.

Para determinação da transparência dos filmes foi utilizada a norma ASTM-D1746 com algumas modificações. A transparência (T_{600}) dos filmes foi medida em 600 nm e calculada pela equação:^{86,87}

$$T_{600} = \frac{Abs_{600}}{\varepsilon}$$

Onde: Abs_{600} é a absorbância do filme, ε é a espessura do filme (mm).

4.5.2. Avaliação morfológica por Microscopia de Varredura Eletrônica – MEV

Para avaliar a morfologia dos filmes foi realizado ensaio no Microscópio Eletrônico de varredura (MEV) (Modelo JEOL JSM-7001F), pertencente ao Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Ciências Biológicas da UnB. Cada uma das amostras foi fixada em suportes metálicos (*stubs*), e em seguida foram metalizadas com ouro em ambiente inerte, (argônio) por 1 h, para que as superfícies dos filmes tornassem condutoras. Os filmes ativos foram registrados com ampliação de 5.000 vezes.

4.5.3. Avaliação das nanopartículas por Microscopia de Eletrônica Transmissão – MET

Para avaliar a formação das nanopartículas nos filmes confeccionado, foram realizadas

análises no Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) (Modelo JEOL JEM-1011). Inicialmente, os filmes foram solubilizados em THF e as partículas foram depositadas em uma grade revestida de carbono, com auxílio de pipeta de Pasteur. Em seguida foi depositado uma gota da suspensão sobre a grade e após evaporação do solvente as análises foram realizadas no MET.

4.5.4. Avaliação estrutural por FTIR-ATR

Para avaliar os grupamentos existentes nos filmes e possíveis interações intermoleculares entre a matriz polimérica de PVC e as nanopartículas de zinco com antioxidante empregou-se a espectroscopia de infravermelho. As medidas foram realizadas em triplicata e conduzidas por um espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier, VARIAN (Modelo 640-IR), com acessório de reflectância total atenuada (FTIR - ATR) com resolução de 4 cm^{-1} , medidas entre 400 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} e 64 varreduras.

4.5.5. Análise Termogravimétrica – TGA

Os ensaios realizados por análise termogravimétrica (TGA) nos filmes ativos ($\text{PVC}_{\text{ZnQ}0,5\%}$, $\text{PVC}_{\text{ZnQ}1,0\%}$, $\text{PVC}_{\text{ZnM}1,0\%}$, $\text{PVC}_{\text{ZnAc}0,5\%}$ e $\text{PVC}_{\text{ZnAc}1\%}$) e no PVC controle, foram executados com aproximadamente 10 mg de amostras e foram depositadas em cadinhos de alumínio, posteriormente foram expostos a uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ em uma faixa de temperatura compreendida entre $25\text{ }^\circ\text{C}$ a $1000\text{ }^\circ\text{C}$. Para os filmes incorporados com morina 0,5% não foi possível realizar a análise.

4.5.6. Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas, tensão de ruptura (TR), alongação máxima (% E) e módulo de *Young* (MY), dos filmes foram realizadas com um Multitest 2.5d (Mecmesin, Stenling, VA, USA) equipados com medidor digital de força de 100 N. Foram preparadas 10 amostras de filmes retangulares (60 x 7 mm). As extremidades dos filmes foram fixadas com fita dupla face em papel para que não rasgassem ao colocar no dispositivo do teste. O comprimento da amostra do filme e distância inicial foi de 30 mm e a velocidade foi ajustada em 0,05 mm. Para cada teste de tração, as amostras foram expostas a temperatura de $25\text{ }^\circ\text{C}$ e umidade de 58 % durante 24 horas.⁸⁸

4.5.7. Determinação da atividade antioxidante dos filmes

A determinação da atividade antioxidante *in vitro* dos filmes foi determinada pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). O método é baseado na capacidade de que os antioxidantes (quercetina, morina e ácido cítrico) presentes nos filmes sejam capazes de reduzir o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil e assim produzir uma redução da absorvância a 515 nm.⁵

O teste foi conduzido de acordo com Siripatrawan e Harte⁸⁹, com modificações. Inicialmente, foi preparada uma solução de metanol:água destilada (80:20). Os filmes foram cortados em pequenos pedaços de modo que sua massa atingisse 0,025 g e em seguida foram colocados em frascos âmbar com 3 mL da solução recém preparada de metanol:água. Os frascos foram agitados por 3 minutos e posteriormente mantidos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 3 horas. Nesse período foi preparada uma solução de DPPH, conforme descrito por Siripatrawan e Harte.⁸⁸ Uma alíquota (0,1 mL) foi solubilizada com 3,9 mL da solução de DPPH a 0,06 mM. A mistura foi agitada por aproximadamente um minuto e determinada a absorvância a 517 nm no espectrofotômetro UV-Vis após 3 h e 24 h.^{90,91, 92,93} Para calcular a porcentagem da atividade antioxidante (AAT) dos filmes em porcentagem de sequestro do DPPH foi empregada a equação:

$$AAT (\%) = \frac{[Abs_{DPPH} - Abs_{amostra}]}{[Abs_{DPPH}]} * 100$$

Onde: AAT = Atividade antioxidante total (% de sequestro do radical DPPH•); Abs_{DPPH}= absorvância da solução de DPPH; Abs_{amostra} = Absorvância da amostra. O equipamento foi zerado com o branco metanol: água (80:20) e os ensaios foram conduzidos em triplicata.⁹⁴

4.5.8. Determinação da atividade antimicrobiana dos filmes

Com o objetivo de avaliar o desempenho dos filmes para prevenir a contaminação foi desenvolvido um ensaio biológico de barreira em microplaca de acordo com Pérez et al., 2014 com modificações.⁹⁵

O ágar nutriente autoclavado foi vertido na placa de 24 poços com 1 mL em cada poço. O inóculo bacteriano foi preparado a partir de colônias de bactérias cultivadas em ágar nutriente por 24 h a 35 °C em seguida foi selecionado colônias bem isoladas com uma alça bacteriológica, e transferida para um tubo de solução salina 0,85 %. A suspensão bacteriana

então foi comparada com o padrão 0,5 da escala McFarland (aproximadamente 5×10^3 UFC / ml).

O inóculo das cepas bacterianas foi das bactérias padrão *Bacillus subtilis* 00002 ATCC 19659 e *Acinetobacter* sp. 00087 ATCC 14293 (Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária - CMRVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ). Os filmes de PVC_{ZnQ0,5%}, PVC_{ZnQ1,0%}, PVC_{ZnM1,0%}, PVC_{ZnAc0,5%} e PVC_{ZnAc1,0%} foram cortados em discos de 6 mm de diâmetro assepticamente e aplicados na superfície dos poços preenchidos com ágar nutriente. Então, 10 microlitros do inóculo para cada cepa foram semeados nos discos de filme. As microplacas foram incubadas a 37 ° C por 24 h até observação ocular. Os testes foram realizados em triplicata.

4.6. Aplicação dos filmes antioxidantes ao presunto fatiado

Os ensaios foram conduzidos com presunto pré-cozido fatiado, refrigerado e adquirido em comércio local da região de Brasília. Após a compra, o presunto foi acondicionado em caixa de isopor, previamente limpa, e transportado ao Laboratório de Instrumentalização, Automação e Miniaturização Analítica - LIAMA da UnB e acondicionado em refrigerador com temperatura média de 3 °C. Para realização dos ensaios, as amostras de presunto foram manuseadas seguindo protocolos de higiene e boas práticas de fabricação, assim o presunto foi cortado em retângulos de 1,5 x 3,5 cm e empilhados de modo que sua espessura não ultrapassasse 5 mm. O presunto foi embalado com os filmes de PVC controle e os PVC antioxidantes. Os presuntos embalados foram mantidos sob refrigeração de 3 °C durante o intervalo de 3 e 5 dias. Posteriormente, os ensaios físico-químicos realizados foram perda de massa (%), pH e acidez titulável.

A seguir são descritos em detalhe cada um dos ensaios físico-químicos realizados com os filmes usados para embalar o presunto fatiado.

4.6.1. Perda de massa (%)

Os presuntos pré-cozidos que foram cortados e empilhados com uma massa de aproximada de 3 g foram embalados com os filmes avaliados em triplicata. Em seguida foram realizadas as pesagens no 1º, 3º e 5º dia das análises, utilizando uma balança analítica, Shimadzu, precisão de 0,0001 g. A perda de peso (%) durante o armazenamento foi determinada utilizando a Equação (0).

$$PM = \frac{m_n}{m_0} \times 100$$

Onde

m_0 = é a massa da amostra embalada no 1º dia de armazenamento.

m_n = é a massa para os dias subsequentes (3º e 5º dia) da análise.

4.6.2. Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em pHmetro digital, marca HANNA, modelo HI 2221, previamente calibrado com soluções tampão de pH 4 e 7 seguindo a metodologia preconizada pelo Instituto Adolfo Lutz.⁹⁶ A análise foi realizada com aproximadamente 1,5 g de amostra de presunto pré-cozido que foi transferida para um béquer e homogeneizada com 15 mL de água destilada. As leituras no pHmetro foram realizadas em duplicata no 3º e 5º dia de análises.

4.6.3. Acidez Titulável Total

As amostras de presunto pré-cozido, com peso de aproximadamente 1,5 g, foram pesadas em balança analítica com precisão de 0,0001 g, em seguida foram transferidas para um erlenmeyer, trituradas e adicionados 20 mL de água destilada. Posteriormente, foram colocadas sob agitação por 5 minutos, em temperatura ambiente, com objetivo de extrair a porção gordurosa. A próxima etapa foi a adição de 2 gotas do indicador fenolftaleína a 1 %. A titulação foi realizada com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M e a titulação foi conduzida até o ponto de viragem (aparecimento de coloração rósea permanente por 30 segundos).

O teor de acidez foi calculado através da fórmula:

$$\text{Teor de Acidez (\%)} = \frac{V \times f \times 100}{P}$$

Onde:

V = volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio

P = em g da amostra utilizada na titulação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Aspecto visual e espessura

Os filmes ativos incorporados com nanopartículas de zinco em diferentes concentrações foram preparados pelo método *casting* (Figura 12). Pode-se observar pelas fotografias que os filmes $PVC_{ZnM\%}$ (Fig. 12B e 12C) e $PVC_{ZnAc\%}$ (Fig. 12F e 12G) apresentaram flexibilidade, transparência e brilho similar ao PVC controle (Fig. 12A). Contudo, notou-se uma sutil mudança na transparência e na cor dos filmes incorporados com nanopartículas de quercetina (Figuras 12D-E), entretanto estes continuaram transparentes.

Quanto a espessura dos filmes verificou-se que a incorporação de $ZnQ\%$, $ZnM\%$, e $ZnAc\%$ na matriz de PVC influenciou no valor médio, ou seja, os filmes ativos apresentaram-se mais espessos ($31,2 \pm 6,0 \mu m$) que o filme controle ($25,0 \pm 5,3 \mu m$). Esses valores estão próximos aos relatados por outros autores na síntese dos filmes sintéticos de LDPE com nanopartículas de prata (Ag), óxido de cobre II (CuO) óxido de zinco (ZnO) usando o método *casting*.⁹⁷

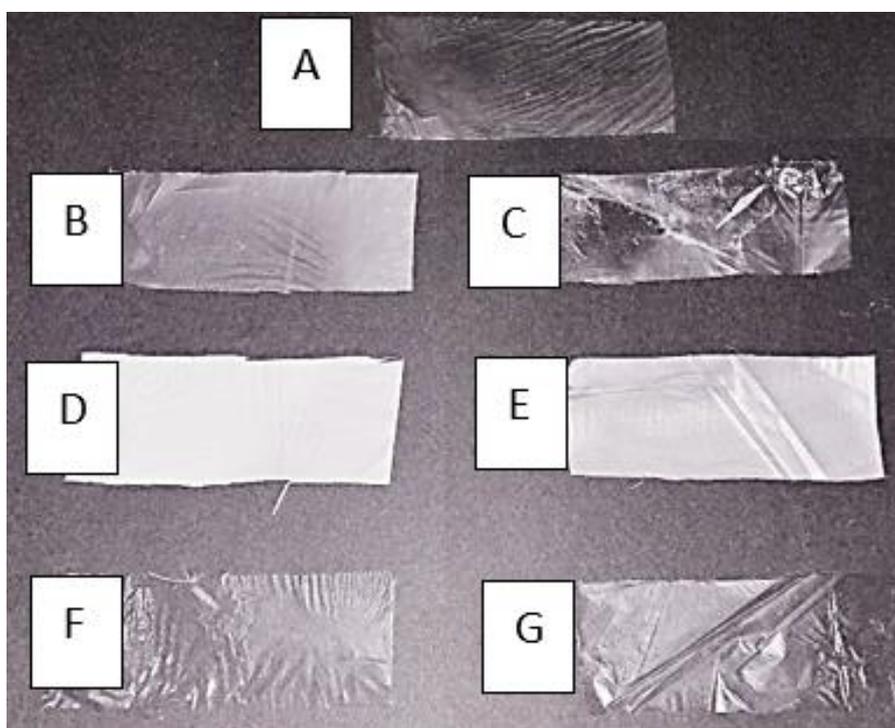


Figura 12. Filmes antioxidantes incorporados com nanopartículas de zinco sintetizados pelo método *casting*. (A) PVC controle, (B) $PVC_{ZnM0,5\%}$, (C) $PVC_{ZnM1,0\%}$, (D) $PVC_{ZnQ0,5\%}$, (E) $PVC_{ZnQ1,0\%}$, (F) $PVC_{ZnAc0,5\%}$ (G) e $PVC_{ZnAc1,0\%}$.

5.2. Ensaio de Transmitância e Transparência

As propriedades ópticas são essenciais, pois permitem verificar a aplicabilidade dos filmes a alimentos específicos. A Figura 13 apresenta os resultados de transmitância da luz UV nas regiões entre 250 a 400 nm dos filmes.

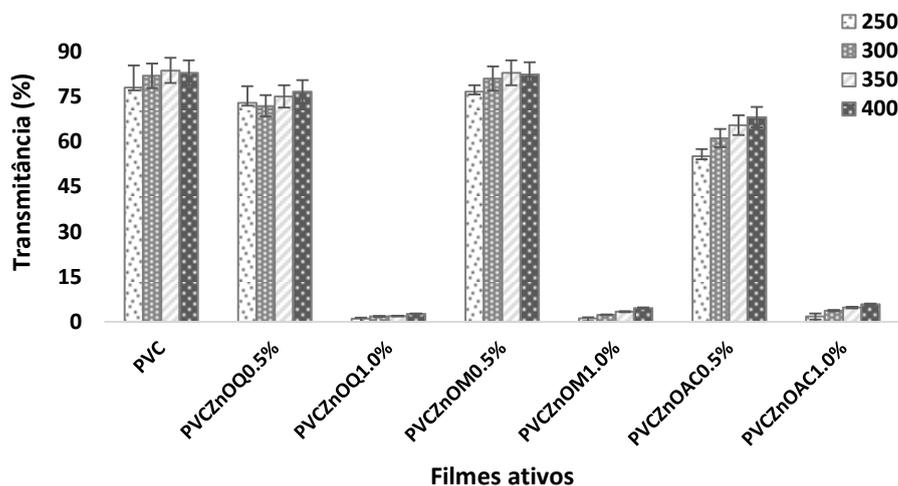


Figura 13. Valores (média \pm desvio padrão, $n = 5$), propriedade óptica de transmitância (%) dos filmes ativos incorporados com nanopartículas de zinco e antioxidantes.

O filme de PVC controle apresentou uma elevada taxa de transmitância nas regiões do UV, demonstrando que o filme de PVC possui baixa propriedade de barreira a luz o que condiz com a literatura.^{98,99} Este resultado de PVC controle comparados aos filmes de PVC contendo 0,5 % de nanopartículas com antioxidantes apresentaram similaridades nas taxas de transmitância. Porém, pode-se observar que o aumento para 1,0 % de nanopartículas com antioxidantes obtiveram consideráveis reduções nas taxas de transmitância, visto que estes filmes apresentam barreiras a luz, o que favorece a inibição da oxidação lipídica causada pela incidência da luz UV nos alimentos expostos à luminosidade.^{99,34} Outro fato que contribui para a diminuição da transmitância nos filmes PVC_{ZnQ1,0%} e PVC_{ZnM1,0%}, diz respeito à presença dos compostos fenólicos (grupos aromáticos) que apresentam ligações insaturadas nas estruturas químicas das moléculas de morina e quercetina, respectivamente. No caso do filme de PVC_{ZnAc1,0%} tem a presença do grupo ácido carboxílico da molécula de ácido cítrico. Esses grupos são ditos cromóforos que são responsáveis em absorver a radiação UV e proteger os alimentos sensíveis a passagem de luz.^{99,100,101}

Além dos grupos cromóforos as nanopartículas também podem se dispersar na matriz polimérica e bloquear a luz UV devido à opacidade das nanopartículas e evitar a passagem de luz de acordo com estudos reportados por Arfat, *et al.*, 2016.¹⁰²

A opacidade é um outro parâmetro importante para avaliar o comportamento das moléculas envolvidas na confecção dos filmes. Em materiais transparentes, porém não uniformes, a cadeia polimérica pode causar alterações nas propriedades ópticas. A opacidade tem relação direta com a absorbância, ou seja, quanto menor for a absorbância, menor será a transparência, revelando assim que os constituintes dos filmes estão bem associados e assim a fração de luz que venha a incidir sobre este poderá ser absorvida.¹⁰³

A Figura 14 apresenta os resultados de transparência dos filmes. Pode-se observar que os filmes contendo 0,5 % de nanopartícula exibiram transparência similar ao PVC controle. Contudo, com o aumento de 1,0 % de nanopartícula o filme de PVC_{ZnQ1,0%} apresentou-se menos transparente em relação aos filmes PVC_{ZnAc1,0%} e PVC_{ZnM1,0%}, indicando uma menor dispersão das nanopartículas na matriz polimérica. Nota-se pela Figura 14 que os níveis de opacidade desses filmes aumentaram em comparação ao PVC controle, mas que ainda mantiveram uma transparência adequada.^{99,101,102,104} Os filmes PVC_{ZnQ1,0%}, PVC_{ZnM1,0%} e PVC_{ZnAc1,0%}, apresentaram excelente barreira à radiação UV e transparência e podem ser indicados para embalar alimentos propensos a oxidação lipídica.^{101,102,104}

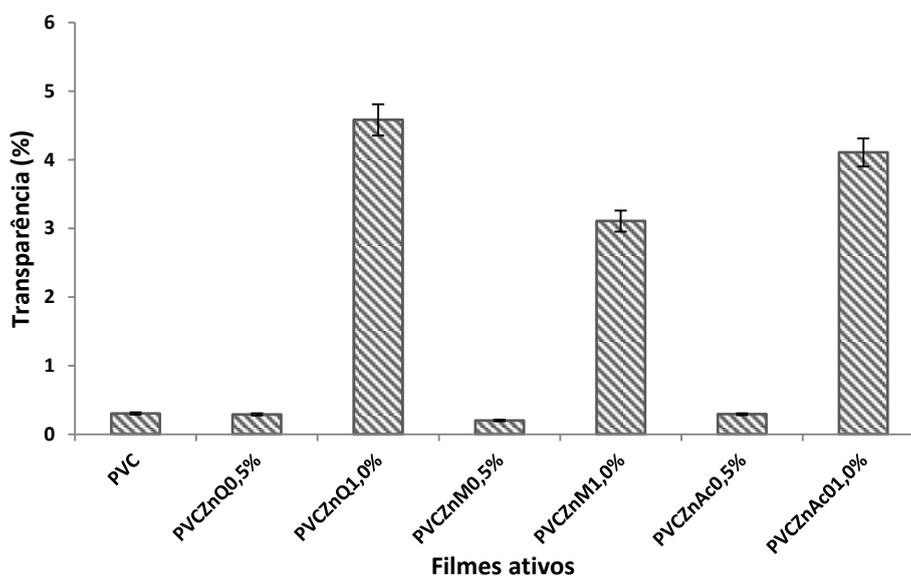


Figura 14. Valores (média \pm desvio padrão, n = 5) da transparência dos filmes baseado em nanopartículas com diferentes concentrações de antioxidantes.

5.3. Avaliação morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A Figura 15 ilustra as fotomicrografias dos filmes obtidas com aumento de 5.000 vezes. Pode-se observar na Figura 15A que o filme de PVC controle apresenta pequenos poros dispersos na matriz polimérica que exibem irregularidade na forma geométrica e diâmetros que variam de aproximadamente 0,5 μm a 0,9 μm . Por outro lado, com a incorporação de nanopartícula de zinco com o antioxidante (Figuras 15B a 15F) notou-se uma mudança visível, como diminuição dos poros, na superfície dos filmes quando comparadas com o PVC controle.¹⁰⁵

As Figuras (15B-E) mostram uma superfície homogênea, lisa e isenta de poros, revelando melhor dispersão das nanopartículas com antioxidantes na matriz de PVC.¹⁰⁶ Nos filmes de PVC_{ZnM0,5%}, PVC_{ZnM1,0%}, PVC_{ZnQ0,5%}, e PVC_{ZnQ1,0%} pode-se sugerir que a presença das nanopartículas com os antioxidantes morina e quercetina, respectivamente, foram de grande importância, pois proporcionaram uma maior dispersão na matriz polimérica o que pode resultar em melhorias nas propriedades mecânicas dos filmes.¹³

É notável que a incorporação de nanopartícula de zinco com ácido cítrico, Figuras (15F-G), respectivamente, de PVC_{ZnAc0,5%} e PVC_{ZnAc1,0%}, demonstram uma superfície com presença de rugosidades e de acordo com Bonilla *et al.*¹⁰⁷ ela pode ser atribuída a presença do ácido cítrico na forma de cristais, revelando filmes mais heterogêneos e com presença de poros irregulares sendo mais nítido em maior concentração (ZnAC1,0 %).¹⁰⁸

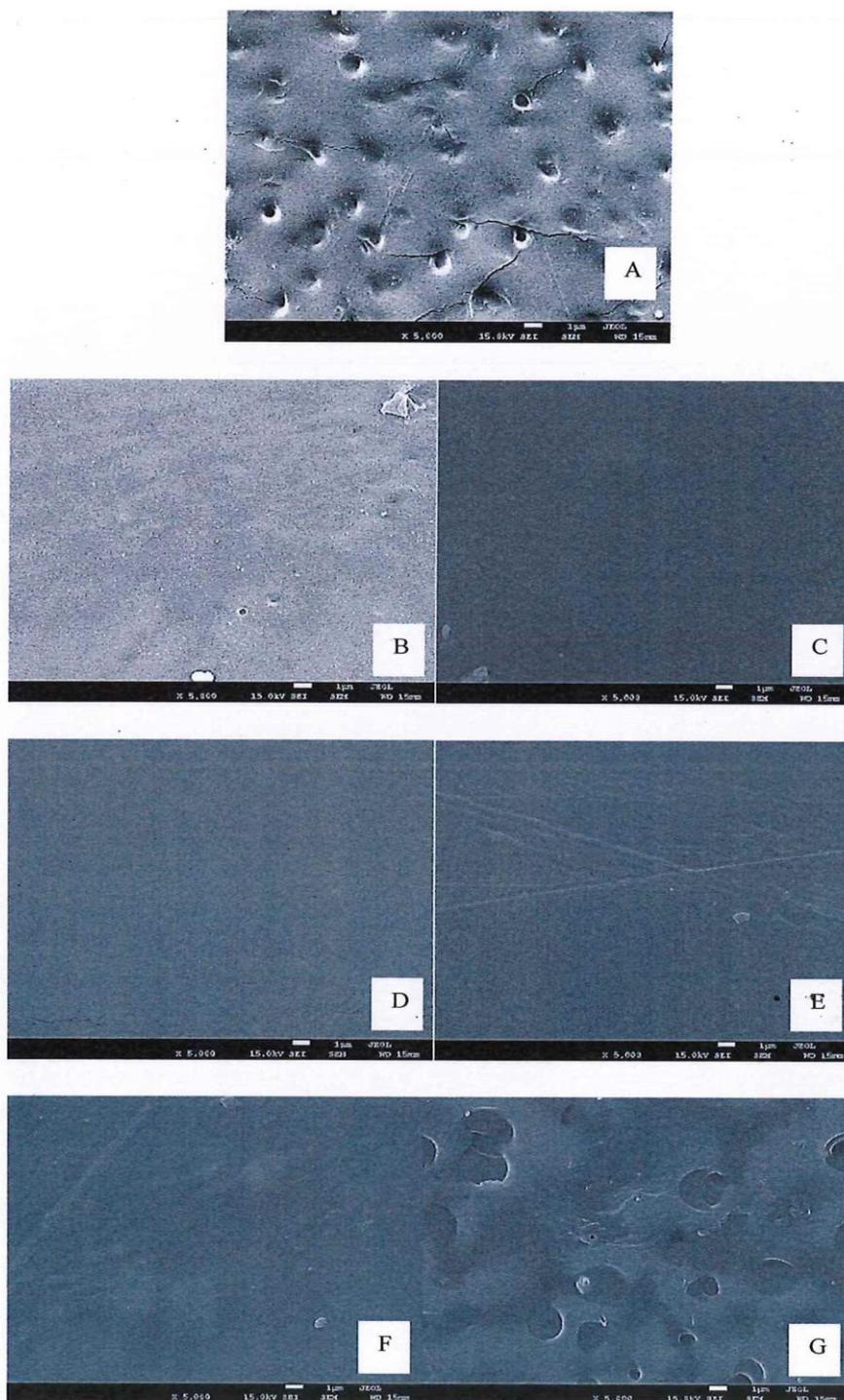


Figura 15 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos filmes com aumento de 5.000 vezes dos filmes de PVC (A), PVC_{ZnO}0,5% (B), PVC_{ZnO}1% (C), PVC_{ZnM}0,5% (D), PVC_{ZnM}1,0% (E), PVC_{ZnAc}0,5% (F) e PVC_{ZnAc}1,0% (G).

5.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é baseada na dispersão de elétrons através da incidência sobre a amostra.¹⁰⁹ Na Figura 16 são apresentadas as micrografias obtidas por MET dos filmes ativos incorporados com nanopartículas de zinco com 1,0 % de quercetina ou ácido cítrico. Tais imagens foram conduzidas com intuito de demonstrar a

estrutura interna dos filmes e formação das nanopartículas de zinco (ZnNP) com antioxidantes na matriz do PVC.⁴³ Os resultados mostram que o óxido de zinco (ZnO) desempenhou papel significativo na redução do tamanho das nanopartículas, possivelmente devido ao impedimento estérico entre ZnO, PVC, quercetina e ácido cítrico.^{71,110} Contudo, esta técnica não permitiu analisar os filmes com baixas concentrações de nanopartículas (PVC_{ZnQ0.5%}, PVC_{ZnM0.5%} e PVC_{ZnAc0.5%}) e também PVC_{MQ1.0%}.

As imagens mostram a morfologia das ZnNPs, caracterizados por apresentar uma geometria esférica e sem agregação.¹⁰⁹ As Figuras 16A e 16B correspondem a PVC_{ZnQ1.0%} com aumentos de 20 nm e 50 nm, respectivamente. Tais imagens sugerem a formação das NPs entre ZnO e quercetina, com superfícies lisas de natureza esférica, desprovidas de quaisquer aglomerações.¹¹¹

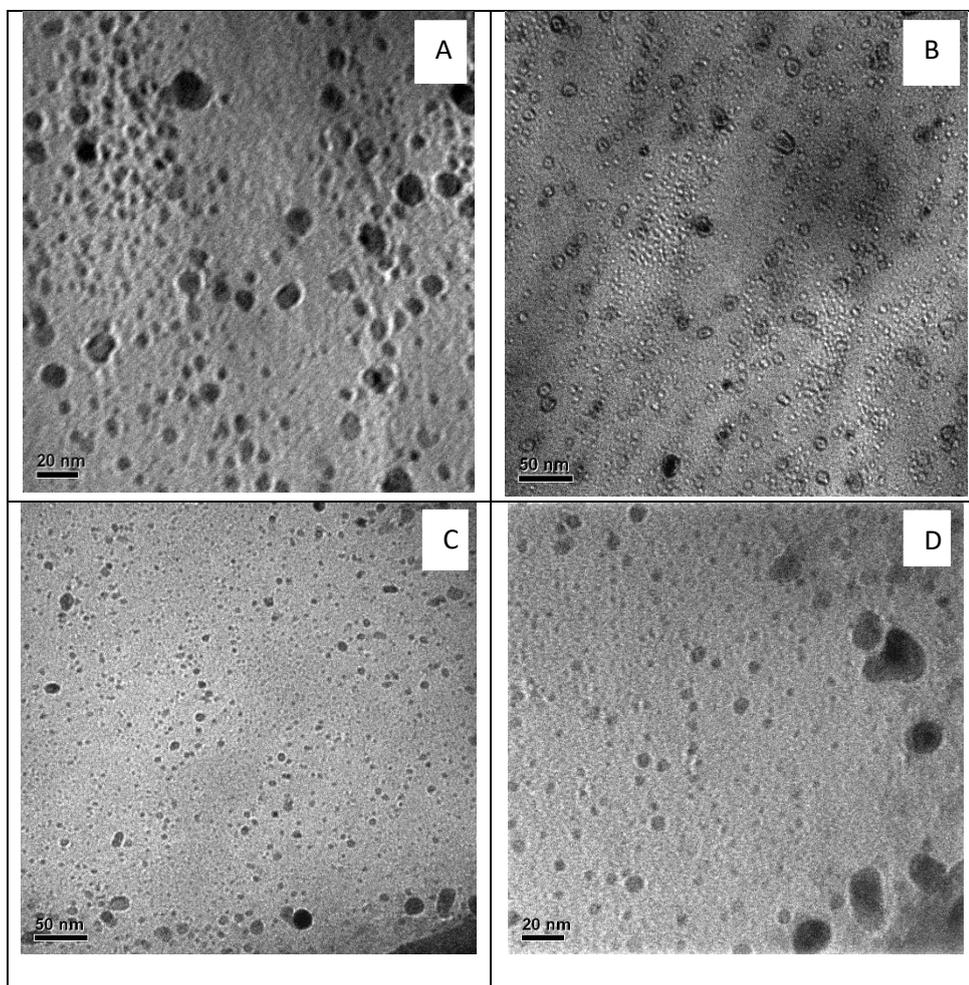


Figura 16. Imagens do MET dos filmes de PVC_{ZnQ1.0%} (A) e (B) e PVC_{ZnAc1.0%} (C) e (D) com 20 nm e 50 nm, respectivamente.

As imagens 16C-D referem-se PVC_{ZnAc1.0%}, com aumentos de 20 nm e 50 nm, respectivamente, e mostram uma superfície lisa e com NPs bem dispersas com ausências de

aglomerações.¹¹² Imagens semelhantes foram encontrados nos trabalhos de Mallakpour e Javadpour¹¹², no qual os autores incorporaram nanopartículas de óxido de zinco incorporados com ácido cítrico em uma matriz polimérica de PVA, tais pesquisadores também desenvolveram um filme de PVC incorporado com NPs de óxido de zinco com ácido cítrico, obtendo imagens muito semelhantes.⁴³

5.5. Espectros de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier – FTIR-ATR

A análise do FTIR-ATR foi realizada com intuito de obter informações qualitativas sobre os constituintes dos filmes produzidos após as interações entre PVC e nanopartículas de zinco e os antioxidantes. Os espectros de infravermelho (IV) dos filmes ativos são apresentados pelas Figuras 17 a 19.

A Figura 17 mostra os espectros dos filmes do padrão de morina, plastificante (óleo de soja epoxidado), PVC controle, PVC_{ZnM0,5%} e PVC_{ZnM1,0%}. No espectro do padrão de morina, Figura 17A, pode-se observar uma banda larga entre 3000-3500 cm⁻¹ o que sugere a presença dos grupos (O-H). As bandas em 1608 cm⁻¹ e 1452 cm⁻¹ são provenientes das ligações duplas entre (C=O) e vibrações (C=C) derivados dos anéis benzênicos assimétricos, respectivamente.¹ As bandas entre 1200 cm⁻¹ e 1173 cm⁻¹ podem ser atribuídas aos estiramentos vibracionais entre as ligações (C-O) dos grupamentos presentes na molécula. Foram observadas também bandas em 1348 cm⁻¹, 1165 cm⁻¹ e entre 970 – 794 cm⁻¹ os quais podem ser atribuídas aos grupos (O-H) dos fenóis, estiramento vibracional (C-O-C) e deformação angular dos anéis aromáticos, respectivamente.^{41,42,33}

Na Figura 17B é possível constatar as bandas características do plastificante (óleo de soja epoxidado) que foi empregado na confecção de todos os filmes. As bandas de absorção em 2900 cm⁻¹ e 2851 cm⁻¹, correspondem ao estiramento assimétrico e simétrico (C-H) dos alcanos (CH₂), respectivamente. A banda em 1740 cm⁻¹ corresponde ao estiramento (C=O) dos ésteres alifáticos e as bandas em 1460 cm⁻¹ e 1380 cm⁻¹ são atribuídos à ligação C-H de hidrocarbonetos alifáticos dos grupos (CH₂ e CH₃), respectivamente. A banda situada na região de 1155 cm⁻¹ refere-se à frequência de vibração do grupo éster (C-O) e entre 800 e 830 cm⁻¹ que são discretas bandas correspondendo ao grupo epóxi.^{113,114}

Na Figura 17C encontram-se as bandas características do PVC controle que coincidem com as bandas citadas pela literatura.^{6,7,8} As bandas em 2800 cm⁻¹ e 2915 cm⁻¹

referem-se ao estiramento (C-H) do HCl e a deformação axial (C-H) do grupamento metila, respectivamente.⁴² Em 1250 cm^{-1} há uma banda proeminente o qual remete a vibração entre C-H que está próximo do átomo de cloro. Na faixa entre 1000 e 1100 cm^{-1} ocorre um estiramento entre C-C. Em aproximadamente 966 cm^{-1} observa-se uma banda de absorção referente ao grupo metileno ($-\text{CH}_2$). As bandas que se estendem entre 690 e 650 cm^{-1} relacionam-se ao estiramento conformacional entre C-Cl.^{43,115,116,59}

Por outro lado, pode-se averiguar que os filmes $\text{PVC}_{\text{ZnM}0,5\%}$ e $\text{PVC}_{\text{ZnM}1,0\%}$, Figura 17D e 17E, respectivamente, apresentaram similaridades com as bandas do PVC controle, ou seja, nenhuma mudança visível nas intensidades após a interações com as nanopartículas. Mas, pode-se verificar um sutil deslocamento da banda de 829 cm^{-1} para 820 cm^{-1} , possivelmente pode ter ocorrido a abertura do anel epóxi que sofreu reação com (H^+) do cloreto de hidrogênio do PVC ou com a nanopartícula ($\text{ZnM}\%$) para formar o complexo, o que pode também conferir estabilidade ao filme.⁶⁴

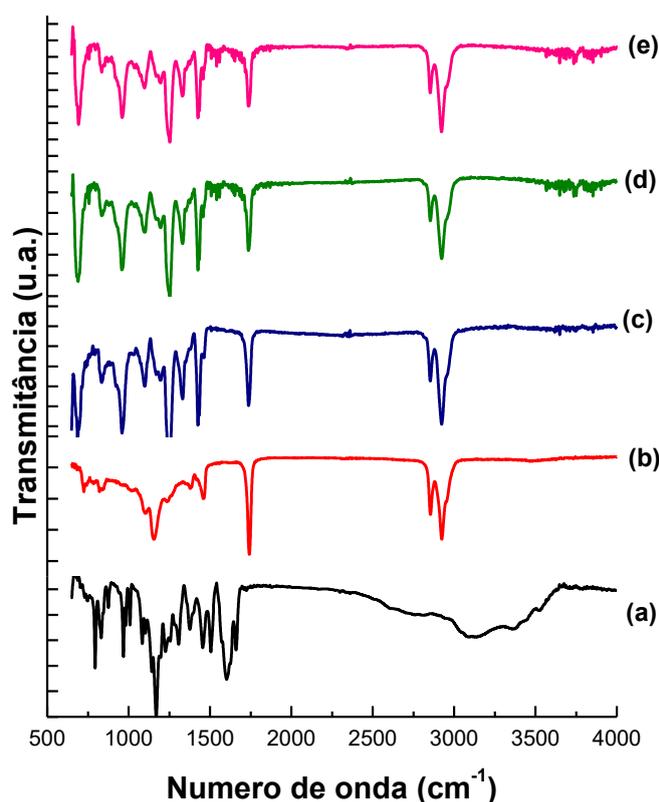


Figura 17. Espectros de infravermelho (a) padrão de morina, (b) plastificante, (c) PVC controle, (d) $\text{PVC}_{\text{ZnM}0,5\%}$ e (e) $\text{PVC}_{\text{ZnM}1,0\%}$.

A Figura 18 mostra os espectros do padrão de quercetina, plastificante, PVC controle, $\text{PVC}_{\text{ZnQ}0,5\%}$ e $\text{PVC}_{\text{ZnQ}1,0\%}$. A Figura 18A apresenta as bandas típicas do padrão de quercetina em $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ que correspondem às ligações (O-H), bandas em 1680 , 1650

e 1600 cm^{-1} exibem estiramento entre (C-C), (C=O) e (C=C), respectivamente. A banda em 1519 cm^{-1} refere-se ao anel benzênico, bandas entre 1456 a 866 cm^{-1} são referentes ao (C-H), já as bandas em 1270 cm^{-1} e 1197 cm^{-1} faz referência ao estiramento (C-O) do fenol e o estiramento assimétrico proveniente do grupamento (C-O-C). A região compreendida entre 1150 e 1087 cm^{-1} corresponde ao estiramento entre C-O.^{94,117,118,91}

As Figuras 18B-C referem ao plastificante (óleo de soja epoxidado) e o PVC controle, respectivamente, ambos espectros foram também mencionadas e discutidas anteriormente na Figura 17 e as mesmas bandas foram reproduzidas na Figura 18 e 19.¹¹⁹ Os espectros obtidos após interações do PVC com as nanopartículas de ZnQ0.5% e ZnQ1.0%, Figuras 18D e 18E, respectivamente não demonstraram mudanças nas intensidades das bandas. Contudo, uma mudança no deslocamento da banda de 829 cm^{-1} para 820 cm^{-1} também foi observada e pode indicar a abertura do anel epóxi em presença da nanopartícula (ZnQ%) formando um complexo. Comportamento análogo ao verificado com a incorporação de ZnM% na matriz. Isso provavelmente se deve à similaridade da estrutura química da quercetina e morina por pertencer a mesma classe dos flavonoides.^{114, 94,117,118,91,119,120,121}

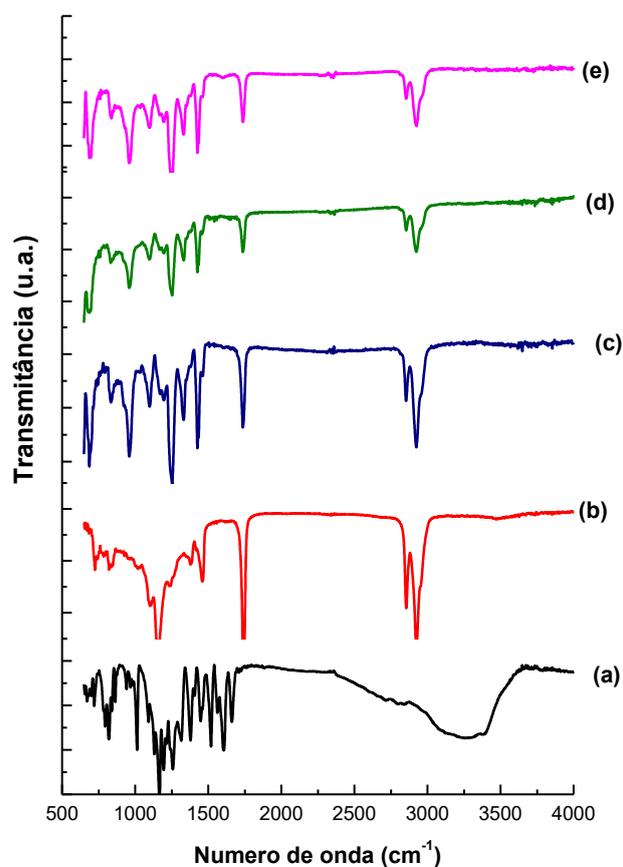


Figura 18. Espectros de infravermelho (a) padrão de Quercetina, (b) Plastificante, (c) PVC controle, (d) $\text{PVC}_{\text{ZnQ}0.5\%}$ e (e) $\text{PVC}_{\text{ZnQ}1.0\%}$.

A Figura 19 mostra os espectros dos filmes do padrão de ácido cítrico, plastificante, PVC controle, PVC_{ZnAc0,5%} e PVC_{ZnAc1%}. No espectro padrão de ácido cítrico, Figura 19A é possível observar uma banda larga entre 3279- 3491 cm⁻¹ referentes ao estiramento vibracional (O-H). As bandas entre 1739 e 1405 cm⁻¹ são atribuídas ao estiramento (C=O) do grupo carbonila. Já as bandas em 1217 cm⁻¹ são atribuídas ao estiramento (C-O) e em 1129 cm⁻¹ são provenientes da deformação axial no plano (O-H) do ácido carboxílico.^{122,123,8}

Após as interações de PVC_{ZnAc0,5%} e PVC_{ZnAc1%}, Figura 19D e 19E, respectivamente, pode-se constatar uma sutil diminuição na intensidade da banda entre 3279 – 3491 cm⁻¹ com o aumento da concentração de ácido cítrico. Fato também observado em 1740 cm⁻¹ para a Figura 19E, isso se deve possivelmente interação do PVC com a nanopartícula (ZnAc%). Os resultados confirmam que os filmes antioxidantes com as nanopartículas de zinco foram produzidos adequadamente.

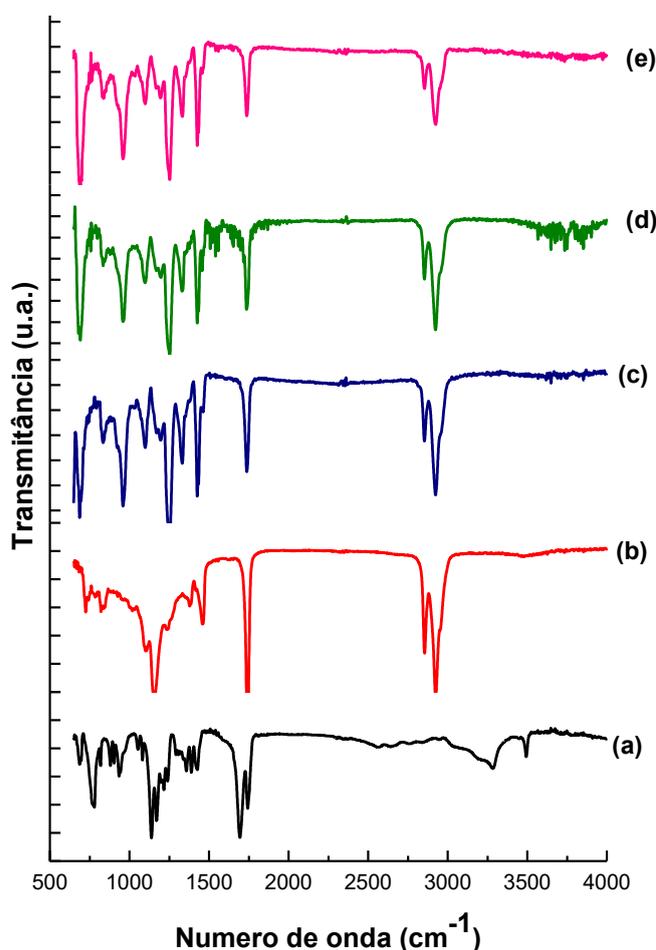


Figura 19. Espectros de infravermelho (a) padrão de ácido cítrico, (b) plastificante, (c) PVC controle, (d) PVC_{ZnAc0,5%} e (e) PVC_{ZnAc1,0%}.

5.6. Análise Termogravimétrica – TGA

A análise termogravimétrica (TGA) caracteriza-se como uma técnica analítica usualmente empregada para determinar a estabilidade térmica de um material e a perda de componentes voláteis. A técnica emprega a medida de massa de uma amostra à medida que esta é submetida a uma taxa de aquecimento.^{124,125} A Figura 20 mostra as curvas de TGA dos filmes ativos e PVC controle com perda de massa em função do aquecimento na faixa de temperatura entre 25 a 1000 °C.

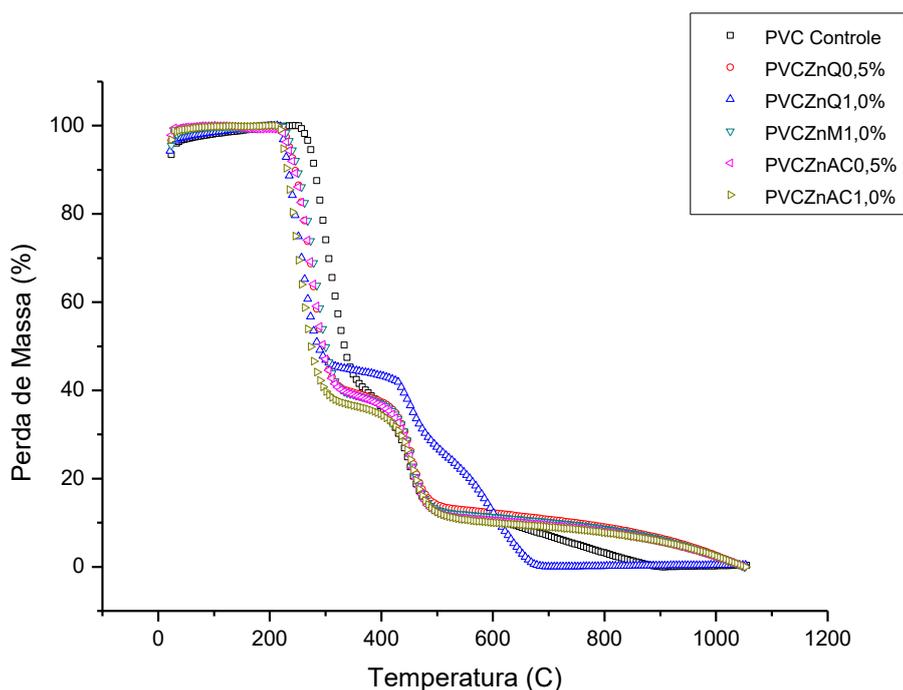


Figura 20. Termogramas de TGA, normalizados entre 0 e 1, dos filmes de PVC antioxidantes e controle.

Como pode ser visto, a degradação térmica de todos os filmes à base de PVC ocorre em duas etapas de degradação. É possível perceber que em alguns casos as curvas dos filmes antioxidantes chegam a se sobrepor evidenciando comportamento similar com o filme controle.

O primeiro estágio de degradação iniciou por volta de 25 °C e terminou em aproximadamente 200 °C com uma perda de massa mínima que pode estar associada a quantidades de solvente presente na amostra.⁴³ A perda de massa em torno de 250 °C é atribuída à desidratação e entre 300 e 400 °C a perda pode estar relacionada à desidrocloração perda do HCl, já o decaimento de massa entre 400 e 500 °C pode sugerir a degradação de estruturas complexas das cadeias polimérica do próprio PVC com formação de sequências de polienos conjugados.^{43,114} Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Mallakpour e

Jarahiyan,¹²⁵ que desenvolveram um filme de PVC incorporados com NPs de óxido de cobre impregnadas com ácido cítrico e ácido ascórbico.¹²⁶

No que se refere aos filmes antioxidantes de PVC_{ZnQ0,5%}, verifica-se que os termogramas foram muito próximos do PVC controle denotando que a inserção das NPs não alterou o comportamento do filme. Porém à medida que a concentração de ZnQ0.5% foi aumentada para ZnQ1,0% observou-se um aumento na temperatura de degradação, índice de perda de massa e um aumento significativo na estabilidade do filme em relação aos outros filmes.¹²⁷

Os filmes PVC_{ZnAc0,5%} e PVC_{ZnAc1%} apresentaram comportamento similar ao PVC controle, contudo, revelou que as nanopartículas interferiram na degradação e estabilidade térmica do polímero. O termograma em torno de 390 °C tem uma perda de massa de aproximadamente 37% enquanto que o PVC controle foi próximo de 50%, ademais, as curvas de PVC_{ZnAc0,5%} e PVC_{ZnAc1%} situadas em menor e maior temperatura, respectivamente, do que o PVC controle pode sugerir efeito catalítico entre ZnO e AC, sugerindo que PVC_{ZnAc0,5%} pode sofrer decomposição térmica mais eficaz que o PVC controle.^{125,43}

Krehula *et al.*¹³ desenvolveram um filme de PVC incorporado com NPs de TiO₂, nitrato de prata e cobre. Após as análises por TGA os autores concluíram que os nanocompósitos apresentavam melhor estabilidade térmica a determinada temperatura devido a mecanismos de degradação térmica modificados.

Os resultados mostraram que a incorporação de nanopartículas de quercetina, morina e ácido cítrico podem contribuir para melhorar a estabilidade térmica dos filmes de PVC, devendo-se levar em consideração a concentração das substâncias antioxidantes incorporados, para que estas possam contribuir na reorganização da estrutura polimérica.

5.7. Propriedades Mecânicas

Os estudos das propriedades mecânicas foram realizados para averiguar a resistência dos filmes que é um importante fator para manter a integridade estrutural e as propriedades de barreira das embalagens alimentícias. Pode-se observar alterações na matriz polimérica a partir da adição das ZnQ%, ZnM% e ZnAC%. Os valores médios e os desvios dos ensaios de tensão (T), deformação (%) e Módulo de Young (MY) são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Propriedades mecânicas dos filmes PVC ativos e controle.

Filmes	Tensão (MPa)	Deformação (%)	Módulo de Young (MPa)
PVC controle	10,86 ± 1,50	16,97 ± 3,20	6,03 ± 0,78
PVC _{ZnQ0,5%}	9,80 ± 1,20	8,51 ± 1,07	3,74 ± 0,82
PVC _{ZnQ1,0%}	5,67 ± 0,45	8,69 ± 3,66	3,50 ± 0,35
PVC _{ZnM0,5%}	21,16 ± 3,24	10,52 ± 2,77	11,22 ± 0,69
PVC _{ZnM1,0%}	13,77 ± 0,98	6,86 ± 3,06	6,64 ± 1,29
PVC _{ZnAC0,5%}	5,62 ± 1,73	4,58 ± 1,19	2,04 ± 0,41
PVC _{ZnAC1%}	10,40 ± 0,91	8,28 ± 5,19	2,58 ± 0,50

Os valores obtidos para o ensaio de tensão (T) dos filmes variaram em relação ao PVC controle, o valor máximo atingido foi de 21,16 ± 3,24 MPa para o PVC_{ZnM0,5%} e o mínimo foi de 5,62 ± 1,73 MPa para o PVC_{ZnAc0,5%}. Comparando os filmes, a diminuição na tensão para os filmes com PVC_{ZnQ%} e PVC_{ZnAC%} pode ser atribuída pela alteração nas ligações intramoleculares com a adição de ZnQ e ZnAC na matriz polimérica confirmando a menor resistência a tração e alongação.⁷¹ Fato contrário observado para os filmes PVC_{ZnM0,5%} e PVC_{ZnM1,0%} que apresentaram um aumento considerável nos valores de tensão, demonstrando melhor resistência a tração, entretanto, os valores de TG variaram em torno 300 e 400 °C demonstrando menor mobilidade entre as cadeias de PVC e ZnM% tornando-os menos flexíveis do que PVC controle.

Vadukumpully et al.¹²⁸ obtiveram redução nos valores de deformação ao elaborar um compósito de PVC/grafeno. De acordo com estes pesquisadores, uma redução nos parâmetros de deformação (%) e aumento nos valores de tração da ordem de 130 % foram observados. Das *et al.*¹²⁹ obtiveram aumento na porcentagem de deformação e diminuição da resistência à tração, de um compósito de PVC dopado com ZnO/Fe, de acordo com os pesquisadores tais resultados são devidos à compatibilidade entre o PVC e ZnO/Fe.

Além disso, é possível perceber que os valores para o módulo de Young (MY) também apresentaram variações quando comparados ao PVC controle, sendo que o valor máximo atingido foi de 11,22 ± 0,69 MPa para o filme PVC_{ZnM0,5%} e o valor mínimo foi de 2,04 ± 0,41 MPa para o filme PVC_{ZnAc0,5%}. A redução do MY nos filmes antioxidantes PVC_{ZnQ%} e PVC_{ZnAC%} conduziram a formação de filmes menos rígidos do que PVC_{ZnM%} e PVC controle. Os resultados obtidos relacionam se com resultados obtidos por Silva *et al.*¹³⁰, no qual observaram as alterações nas propriedades mecânicas de blendas de PS/PVC, nos quais os valores de MY sofreram alterações.

5.8. Determinação da atividade antioxidante dos filmes

Para avaliar a porcentagem da atividade antioxidante dos filmes PVC controle, PVC_{ZnQ0,5%}, PVC_{ZnQ1,0%}, PVC_{ZnM0,5%}, PVC_{ZnM1,0%}, PVC_{ZnAC0,5%}, PVC_{ZnAC1,0%} foi empregado o método DPPH• para monitorar o sequestro dos radicais livres no meio racional após 3 h e 24 h, como pode ser observada na Figura 21.

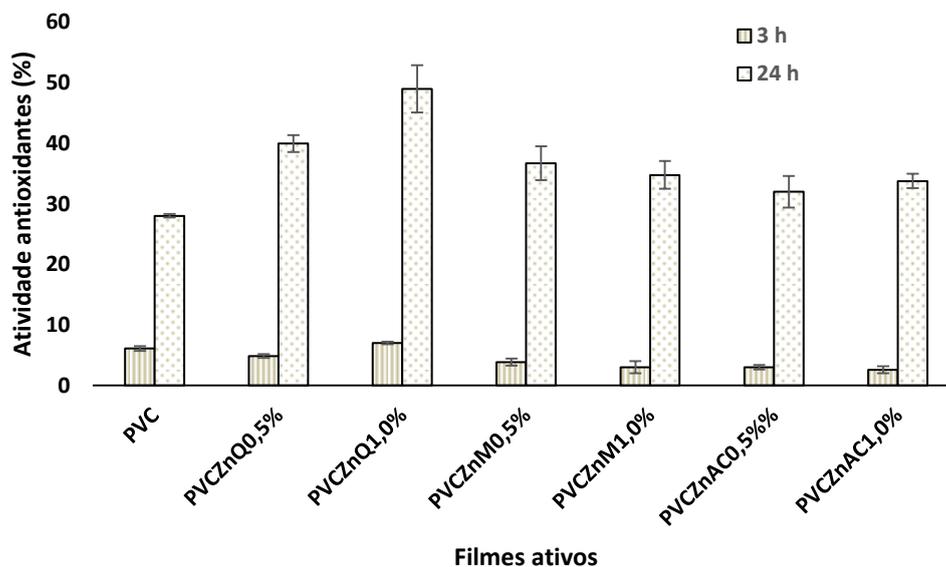


Figura 21. Porcentagem de atividade antioxidante dos filmes antioxidantes nos diferentes tempos 3 h e 24 h.

A Figura 21 mostra que após 3 h de contato entre os filmes avaliados e a solução de DPPH a atividade antioxidante variou entre 6 % e 2 %. Já os resultados monitorados após 24 h de ensaio (Figura 21) mostraram que os filmes (PVC_{ZnQ1,0%} > PVC_{ZnQ0,5%} > PVC_{ZnM0,5%} > PVC_{ZnM1,0%}) apresentaram maior potencial sequestrador de radical DPPH do que o PVC controle. Os demais filmes não apresentaram diferença significativa, considerando um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Levando-se em consideração a presença das nanopartículas com antioxidantes incorporadas na matriz de PVC foi possível observar o que um aumento na concentração dos antioxidantes (quercetina, morina e ácido cítrico), proporcionou um aumento na atividade antioxidante dos filmes. Os resultados obtidos confirmam uma diferença significativa para PVC_{ZnQ1,0%} comparada aos demais filmes produzidos.⁸⁷ Provavelmente, a quercetina por apresentar uma estrutura química de um polifenol da classe dos flavonóides apresenta grupamentos hidroxilas provenientes do anel B (ver Figura 3) que podem ter, de acordo com Masek e Chrzescijanska⁹⁴, a função de dominar a atividade antioxidante na quercetina favorecendo a transferência de átomos de H e assim estabilizado o radical DPPH• reduzindo-o, fator que se torna importante quando se trata de retardar, por exemplo,

a oxidação lipídica de alimentos minimamente processados.^{92,93,94} Embora a morina apresente estrutura muito similar à quercetina, com muitas hidroxilas, principalmente na posição C3 (responsável pela atividade antioxidante) nesses ensaios sua atividade antioxidante não foi tão expressiva como fora encontrado em outros trabalhos. Yang e Lee⁷ caracterizaram a quercetina presente em frutos de *Morus alba* L onde a atividade antioxidante pelo método DPPH• foi de 100%.

O ácido cítrico, componente multifuncional, geralmente reconhecido como seguro (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA), tem recebido atenção de pesquisadores, no que se refere ao seu uso em embalagens ativas, principalmente por seus atributos como antioxidantes e antimicrobianos. Os resultados dos filmes com ácido cítrico, Figura 18, apresentaram níveis inferiores de atividade antioxidante quando comparados aos filmes com morina e quercetina, possivelmente porque as nanopartículas de ácido cítrico não tiveram boa dispersão na matriz polimérica prejudicando o comportamento como filme antioxidante e pelo fato desta molécula atuar como antioxidante sinérgico.

Trifunski e Ardelean⁹¹ utilizaram o método DPPH• para verificar a capacidade de captura do radical livre de um complexo entre quercetina e os íons Co(II) e Cd(II) e verificaram um comportamento similar ao observado no presente estudo.¹³¹ Ramadan²⁵ verificou as características antioxidantes da quercetina em matrizes lipídicas, de posse de ensaios de oxidação lipídica, aumento da temperatura e teste pelo método do DPPH•, obtendo resultados satisfatórios para capacidade antioxidante da quercetina, o que demonstra que ela pode ser usada em formulações farmacêutica e alimentares e ser uma alternativa aos antioxidantes sintéticos.

É interessante notar que, entre os filmes avaliados, o filme PVC_{ZnQ1,0%} foi o mais eficaz como antioxidante e tem propriedades atraentes como remoção de radicais livres, remoção de oxigênio singlete e quelação de metais de transição oferecendo excelente potencial para redução da oxidação lipídica.¹³² Além de reduzir a quantidade total de conservantes nos alimentos, os filmes antioxidantes são uma alternativa à melhoria da saúde pública e ao consumo excessivo de aditivos químicos usualmente utilizados na preservação de alimentos.⁴⁹

5.9. Determinação da atividade antimicrobiana dos filmes

Sabendo que contaminação superficial bacteriana é importante para os alimentos⁷², uma vez que o crescimento de determinadas populações de microrganismos acelera a

degradação e pode causar males à saúde, os filmes produzidos foram avaliados por sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano em meio de cultura.

Os resultados do teste de barreira com os filmes ativos podem simular o que aconteceria se a contaminação ocorresse nos alimentos revestidos e podem gerar perspectivas de futuras aplicações em amostras reais de alimentos.

Pode-se perceber que o crescimento bacteriano foi inibido igualmente em todos os filmes testados para a cepa de *Bacillus subtilis*, porém para a cepa de *Acinetobacter* sp. os filmes de ácido cítrico não mostraram eficiência total na inibição do crescimento bacteriano na triplicata tanto para a concentração de 0,5% como para 1,0%. Estes resultados sugerem fortemente a importância da realização de outros ensaios antimicrobianos complementares, já que cada tipo de teste permite uma perspectiva de avaliação diferente.

Os *Bacillus subtilis* são gram-positivos, saprófitos não patogênicos que podem ser encontrados tanto em solo como em água. São bacilos conhecidos como bacilos do meio ambiente e sobrevivem em condições ambientais atípicas e dessa forma possuem grande importância para a indústria alimentícia, pois estão presentes com frequência nos alimentos que começam a estragar, conferindo aquela consistência grudada aos alimentos, o que diminui o tempo de prateleira.^{133,134}

Acinetobacter spp são bastonetes, gram-negativos, aeróbios, que vivem principalmente no solo e na água, podendo provocar problemas na deterioração dos alimentos conservados pelo frio, especialmente carnes e pescados não processados.¹³⁵ Além disso este gênero tem a capacidade de formar biofilmes em tubos de ventilação, filtros de areia e filtros de carvão ativado, comprometendo a qualidade da água. As bactérias do gênero *Acinetobacter* são consideradas patógenos oportunistas (causam infecções principalmente em indivíduos imunocomprometidos) que resultam em pneumonias, infecções urinárias, infecções de feridas, osteomielites e sepse, dentre outras.¹³⁶

6. APLICAÇÃO DOS FILMES ANTIOXIDANTES EM PRESUNTO FATIADO

6.1. Perda de Massa (%)

A perda de massa é um dos parâmetros usados para indicar a redução da vida útil do presunto, assim, sua composição rica em proteínas e água, facilita a proliferação de microrganismos. Ademais, a incorreta manipulação deste favorece a diminuição da vida de prateleira ou do chamado *shelf life*.⁵¹

Os presuntos pré-cozidos fatiados foram embalados com filmes ativos confeccionados para avaliar a perda de massa, cuja imagem é apresentada na Figura 22. É possível observar que o filmes apresentaram-se transparentes, um dos fatores principais para aceitabilidade do consumidor em relação às embalagens, ademais os filmes demonstraram excelentes resultados na conservação do presunto fatiado.

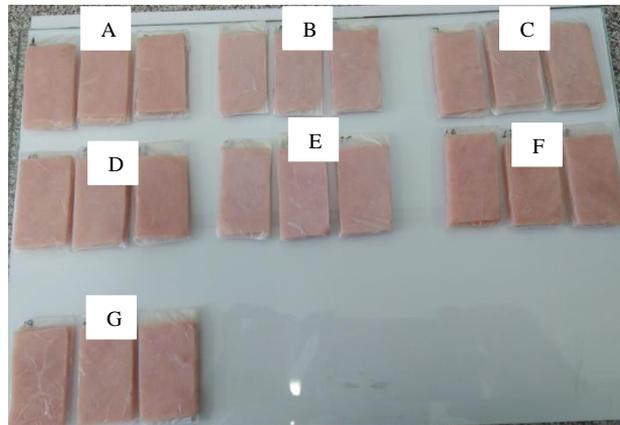


Figura 22. Presuntos pré-cozidos e embalados em filmes de PVC controle (A), PVC_{ZnQ0,5%} (B), PVC_{ZnQ1,0%} (C), PVC_{ZnM0,5%} (D), PVC_{ZnM1,0%} (E), PVC_{ZnAc0,5%} (F), PVC_{ZnAc1,0%} (G).

A Figura 23 apresenta os resultados da perda de massa dos presuntos fatiados que foram embalados (Figura 22) com os filmes ativos e controle no 3° e 5° dia. Pelas análises estatísticas, o percentual da perda de massa no 3° dia e 5° dia foi maior para os filmes PVC controle, PVC_{ZnQ0,5%}, PVC_{ZnQ1,0%} e PVC_{ZnM1,0%}. Enquanto que para os filmes PVC_{ZnM0,5%}, PVC_{ZnAc0,5%}, e PVC_{ZnAc1,0%} observou-se uma menor perda de massa do presunto embalado nos dias avaliados. Esse efeito pode ser devido ao fato que os antioxidantes morina (0,5%) e ácido cítrico (0,5% e 1,0 %) conseguirem absorver melhor a água existente no meio e assim prolongar a vida útil do alimento.^{51,137}

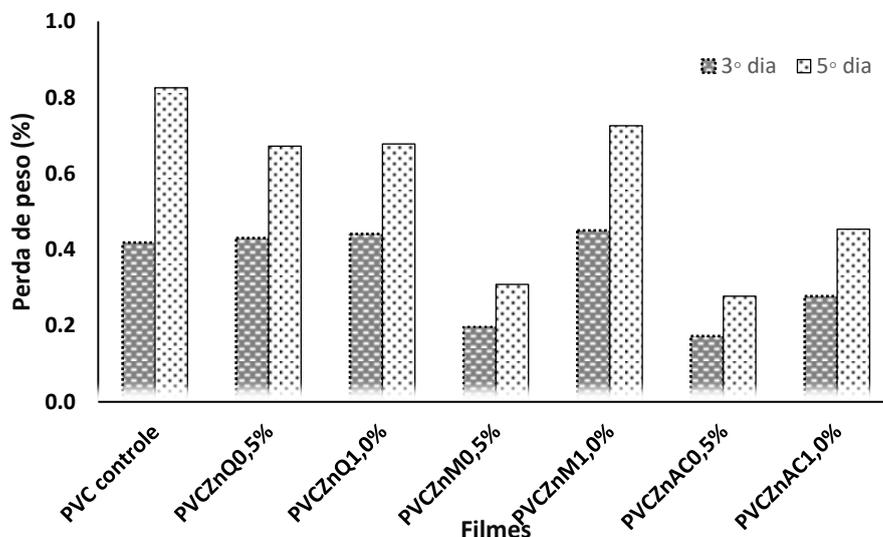


Figura 23. Perda de massa do presunto fatiado embalados em filmes ativos e controle por 5 dias.

6.2. Determinação do pH

O pH de determinado meio pode alterar significativamente o crescimento de microrganismos no produto. Pela literatura, o aparecimento de substâncias como aminas e amônias no meio pode aumentar o pH do presunto, por outro lado a redução do pH pode gerar o crescimento de bactérias lácticas com a produção do ácido lático e contribuir na conservação e segurança do produto.¹³⁸

A Figura 24 mostra os valores de pH dos presuntos fatiados e armazenados com filmes incorporados com NPs e controle durante 5 dias.

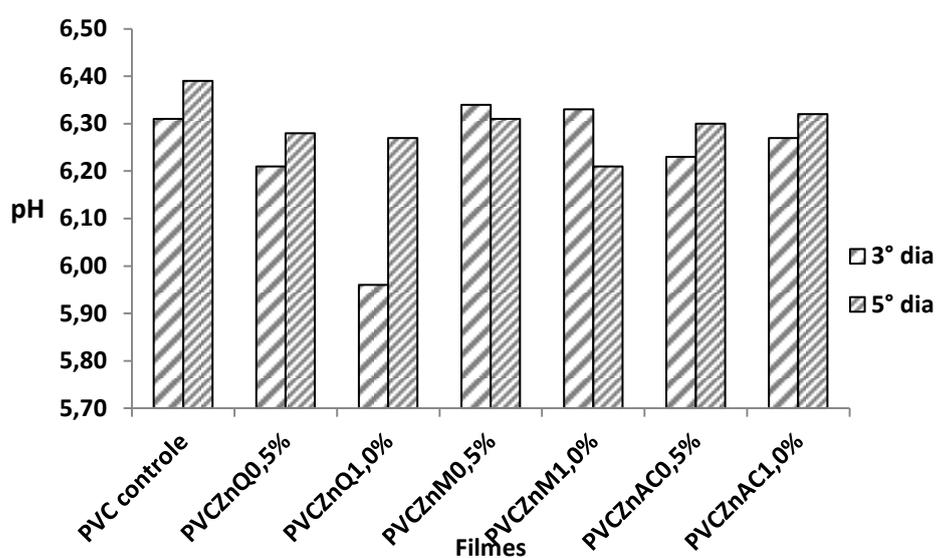


Figura 24. Valores de pH dos presuntos fatiados armazenados em filmes ativos e controle.

Pode-se observar que a variação do pH foi afetada pelo tempo de armazenamento. No 1º dia o pH do presunto pré-cozido foi de $6,16 \pm 0,0$ e após 3 dias embalados os valores de pH sofrem uma variação entre $5,96 \pm 0,22$ a $6,34 \pm 0,02$. O presunto embalado com PVC_{ZnQ1,0%} resultou em valor de pH inferior aos demais filmes. Tal fato pode ser explicado pelo crescimento de bactérias lácticas no meio reduzindo o pH do presunto. Já no 5º dia essa diferença na variação do pH foi maior entre os filmes avaliados entre $6,21 \pm 0,02$ a $6,39 \pm 0,04$. Contudo, esses valores finais de pH foram maiores que os obtidos por Mano *et al*, os quais embalaram carne de porco em filme com atmosfera modificada, neste mesmo trabalho os autores avaliaram a mudança de pH em carne de peru, obtendo valores de pH após 20 dias de armazenamento em torno de 7,0.¹³⁸ No caso dos filmes PCV_{ZnM0,5%}, PCV_{ZnAC0,5%} e PCV_{ZnAC1,0%}, os valores mantiveram-se muito próximos durante todo o período de armazenamento não havendo oscilação durante os ensaios, ademais, houve redução do pH no presunto com os filmes de PVC_{ZnM0,5%}, PVC_{ZnM1,0%} no período analisado,

demonstrando que estes podem ter reduzido a formação de produtos alcalinos a partir da proteína presente no presunto.^{51,137,139}

6.3. Acidez Titulável

O teor de acidez titulável é um ótimo indicador da qualidade de um alimento e os estudos foram baseados nos métodos físico-químicos do Instituto Adolfo Lutz e demais normas brasileiras.^{140,141}

A Figura 25 mostra os valores da acidez titulável dos presuntos fatiados e armazenados com filmes ativos e controle durante 5 dias.

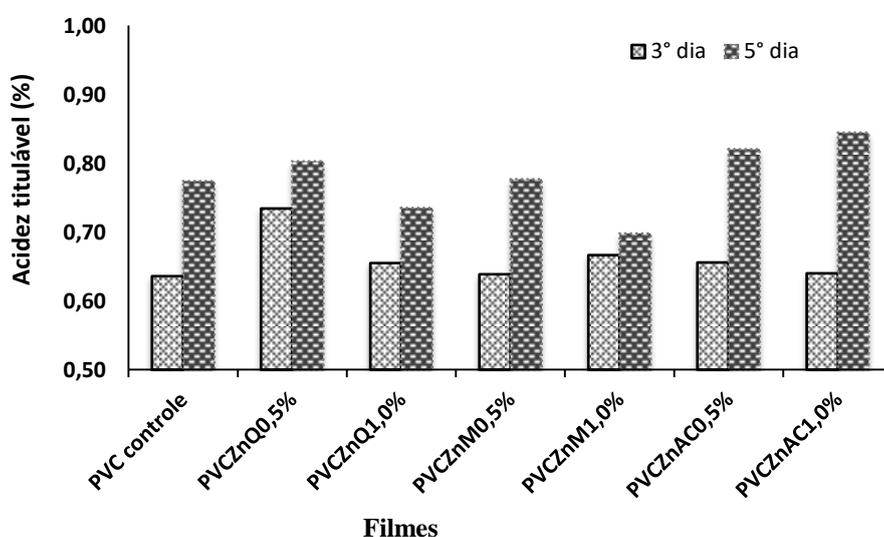


Figura 25. Valores de acidez titulável do presunto fatiado armazenados em filmes ativos e controle.

Na Figura 25 é possível observar que as amostras embaladas com os filmes antioxidantes tiveram aumento nos teores de acidez titulável com o passar dos dias, com exceção da amostra embalada com o filme PVC_{ZnM1,0%} sugerindo assim, que este filme rendeu melhor resultado no controle da acidez.¹⁴²

Com relação aos valores de pH da amostra embalada com o filme PVC_{ZnM1,0%}, fica claro que a redução do pH de $6,33 \pm 0,08$ para $6,21 \pm 0,02$ relaciona-se com o aumento da acidez, como pode ser visto pela Figura 22. O mesmo processo ocorre com o presunto embalado com o filme antioxidante de PVC_{ZnAC1,0%} cujo pH variou $6,32 \pm 0,08$ para $6,27 \pm 0,02$ culminando com o aumento do percentual de acidez (Figura 22). Tais resultados são muito promissores, pois a redução do pH aliado ao aumento do teor de acidez sugere que o alimento mantém suas características sensoriais, favorecendo ao aumento do tempo de prateleira e diminuindo o crescimento de microrganismos indesejáveis.^{19,143}

7. CONCLUSÕES

Os filmes baseados em PVC e incorporados com nanopartículas de zinco foram sintetizados pelo método *casting* de forma simples e rápida em duas etapas.

A síntese da nanopartícula de ZnO com a incorporação dos antioxidantes naturais (quercetina, morina e ácido cítrico) melhorou a funcionalidade e a dispersão das NPs na matriz polimérica.

A incorporação de (ZnQ%, ZnM%, ZnAC%) no PVC influenciou nas propriedades ópticas, estrutural, mecânicas, térmicas dos filmes. As superfícies dos filmes foram examinadas por MEV e MET e os resultados confirmaram a uniformidade das superfícies, lisas, isentas de poros e sem aglomerações, indicando a formação das nanopartículas.

Os resultados também mostraram que a incorporação das nanopartículas na matriz de PVC proporcionou adequada transparência e excelente propriedade de barreira à luz UV aos filmes ativos, principalmente para os filmes incorporados com morina e quercetina nas concentrações de 1,0 %, sendo desejável na apresentação visual e na prevenção da oxidação lipídica em alimentos gordurosos.

As incorporações nas diferentes concentrações de nanopartículas com antioxidantes (0,5 % e 1,0 %) foram reforçadas na matriz de PVC e foram confirmadas por FTIR, TGA mostrando as interações químicas e o aumento da estabilidade térmica dos filmes, com destaque para o filme PVC_{ZnQ1,0%}.

Os filmes produzidos apresentaram mudanças nas propriedades mecânicas. Os PVC_{ZnQ%} e PVC_{ZnAc%} apresentaram filmes menos resistentes a tração, contudo menos rígidos. Já fato contrário foi observado para PVC_{ZnM%}, filmes mais resistentes e rígidos. Isso mostra que cada tipo de substância antioxidante pode apresentar diferença na interação química (ligações de hidrogênio, atração eletrostática, quelação) entre os grupos funcionais e as nanopartículas o que pode favorecer ou não na compatibilidade com a matriz polimérica.

Para monitorar a porcentagem da atividade antioxidante dos filmes produzidos foi usado o método DPPH em diferentes tempos. Comparado ao filme PVC controle, todos os filmes antioxidantes foram capazes de reduzir os radicais livres com destaque ao PVC_{ZnQ1,0%} que foi mais eficiente na remoção dos radicais.

Os filmes PVC_{ZnQ%} e PVC_{ZnM%} mostraram-se eficazes para inibir o crescimento superficial de *Bacillus subtilis* e *Acinetobacter* sp. sugerindo que estes filmes ativos podem ser promissores para prevenir a disseminação microbiana em alimentos.

Ao embalar o presunto pré-cozido com os filmes ativos observou-se maior proteção contra o processo oxidativo frente aos ensaios de perda de massa, pH e acidez titulável quando comparado ao PVC controle.

Por fim, estes filmes ativos apresentaram características atrativas (aspecto visual, transparência, excelente barreira à luz UV e estabilidade térmica) para embalar alimentos ricos em lipídios com objetivo de retardar a oxidação lipídica e inibir o crescimento superficial bacteriano, aumentando o tempo de prateleira, tornando-se uma alternativa viável à utilização de antioxidantes sintéticos aplicados diretamente nos alimentos.

7.1 Sugestões para trabalhos futuros

Confeccionar filme de PVC incorporado apenas com nanopartículas de óxido de zinco e avaliar a capacidade antioxidante e antimicrobiana.

Realizar ensaios de migração dos filmes ativos empregando simulantes alimentícios de acordo com a RDC nº 51 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), que estabelece os limites de migração preconizados para determinadas substâncias em alimentos.

Realizar ensaios com outros tipos de alimentos e avaliar não apenas a oxidação lipídica, mas também a oxidação enzimática (ex., frutas), assim como analisar também a fotoxidação destes alimentos.

Realizar estudo com os mesmos antioxidantes naturais incorporados em matriz polimérica sintética, como por exemplo, polietileno (PE), poli(etileno-*co*-álcool vinílico) (EVOH), polietileno de baixa densidade (PEBD), polipropileno (PP) e entre outros), como também, em matriz polimérica biodegradável (ex., amido, poli(ácido láctico), quitosana, entre outros) e avaliar a capacidade antioxidante e antimicrobiana dos filmes ativos.

REFERÊNCIAS

1. Contini, C.; Katsikogianni, M. G.; O'Neill, F. T.; O'Sullivan, M.; Dowling, D. P.; Monahan, F. J. ;*Procedia Food Sci.* **2011**, *1*, 224.
2. Saúde, M. da; Sanitária, A. N. de V. *RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC N° 17, DE 17 DE MARÇO DE 2008*; 2008; pp. 1–36.
3. Ma, Q.; Ren, Y.; Wang, L. ;*Food Hydrocoll.* **2017**, *70*, 286.
4. McClements, D. J.; Decker, E. ;*J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 20.
5. Gomez-Estaca, J.; Lopez-de-Dicastillo, C.; Hernandez-Munhoz, P.; Catalr, R.; Gavara, R. ;*Trends Food Sci. Technol.* **2014**, *35*, 42.
6. Koontz, J. L.; Moffitt, R. D.; Marcy, J. E.; O'Keefe, S. F.; Duncan, S. E.; Long, T. E. ;*Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **2010**, *27*, 1598.
7. Yang, J. Y.; Lee, H. S. ;*J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **2012**, *55*, 485.
8. Li, L.; Mak, K. Y.; Leung, C. W.; Chan, K. Y.; Chan, W. K.; Zhong, W.; Pong, P. W. T. ;*Microelectron. Eng.* **2013**, *110*, 329.
9. Jose, J.; Al-Harathi, M. A. ;*Iran. Polym. J.* **2017**, *26*, 579.
10. Realini, C. E.; Marcos, B. ;*Meat Sci.* **2014**, *98*, 404.
11. Ghaani, M.; Cozzolino, C. A.; Castelli, G.; Farris, S. ;*Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *51*, 1.
12. Carocho, M.; Morales, P.; Ferreira, I. C. F. R. ;*Trends Food Sci. Technol.* **2015**, *45*, 284.
13. Krehula, L. K.; Papic, A.; Krehula, S.; Gilja, V.; Foglar, L.; Hrnjak-murgic, Z. **2017**, 1387.
14. Packaging, F.; Issues, E. ;*Inst. Food Technol.* **2007**, *72*, 39.
15. Ribeiro-Santos, R.; Andrade, M.; Melo, N. R. de; Sanches-Silva, A. ;*Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *61*, 132.
16. Europeias, D. A. S. C. **2009**.
17. Parliament, T. H. E. E.; Council, T. H. E.; The, O. F.; Union, P. **2008**.
18. Carocho, M.; Barreiro, M. F.; Morales, P.; Ferreira, I. C. F. R. ;*Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, *13*, 377.
19. Bolumar, T.; Andersen, M. L.; Orlien, V. ;*Food Chem.* **2011**, *129*, 1406.
20. ANVISA *RDC n.º 27 de 6 de agosto de 2010*; 2010.
21. Presidência da República ;*Diário Of. da União - DOU* **1965**, 9.
22. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. ;*Anvisa* **1997**, 2.
23. Saúde, C. N. de *RESOLUÇÃO CNS/MS N.º 04, DE 24 DE NOVEMBRO DE 1988 (*)*; 1988; Vol. 1988.
24. B. Kirschweg, D.Tatraaljai, E.Földes, B. P. ;*Polym. Degrad. Stab.* **2017**, *145*, 25.
25. Ramadan, M. F. ;*Ind. Crops Prod.* **2012**, *36*, 363.
26. Fukumoto, L. R.; Mazza, G. ;*J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3597.
27. Appendini, P.; Hotchkiss, J. H. ;*Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2002**, *3*, 113.
28. M. S. DOPICO-GARCIÁ, J. M. LOPEZ-VILARINO, AND GONZALEZ-RODRIGUEZ*, M. V. ;*J.Agric.FoodChem.* **2007**, *55*, 3225.
29. Kerry, J. P.; O'Grady, M. N.; Hogan, S. A. ;*Meat Sci.* **2006**, *74*, 113.
30. McMillin, K. W. ;*Meat Sci.* **2017**, *132*, 153.
31. Ahmed, I.; Lin, H.; Zou, L.; Brody, A. L.; Li, Z.; Qazi, I. M.; Pavase, T. R.; Lv, L. ;*Food Control* **2017**, *82*, 163.
32. Palma, M.; Robert, P.; Holgado, F.; Velasco, J.; Márquez-Ruiz, G. ;*J. Am. Oil Chem. Soc.* **2017**, *94*, 1189.
33. Nafisi, S.; Hashemi, M.; Rajabi, M.; Tajmir-Riahi, H. A. ;*DNA Cell Biol.* **2008**, *27*, 433.
34. Wu, J.; Chen, S.; Ge, S.; Miao, J.; Li, J.; Zhang, Q. ;*Food Hydrocoll.* **2013**, *32*, 42.
35. Miao, J.; Li, X.; Zhao, C.; Gao, X.; Wang, Y.; Gao, W. ;*Food Chem.* **2018**, *248*, 330.
36. Çakar, S.; Özacar, M. ;*J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2017**, *346*, 512.
37. Souza, M. P.; Vaz, A. F. M.; Silva, H. D.; Cerqueira, M. A.; Vicente, A. A.; Carneiro-da-Cunha, M. G. ;*Food Bioprocess Technol.* **2015**, *8*, 2183.
38. B, M.; Gorgieva, S.; Kokol, V. ;*Carbohydr. Polym.* **2012**, *89*, 854.
39. Lin, C.; Chen, C.-S.; Chen, C.; Liang, Y.-C.; Lin, J.-K. ;*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *294*, 167.

40. Vimalraj, S.; Rajalakshmi, S.; Raj Preeth, D.; Vinoth Kumar, S.; Deepak, T.; Gopinath, V.; Murugan, K.; Chatterjee, S. ;*Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *83*, 187.
41. Liu, X.; Li, Y.; Wang, X. ;*Mater. Lett.* **2006**, *60*, 1943.
42. Yue, H.-L.; Hu, Y.-J.; Huang, H.-G.; Jiang, S.; Tu, B. ;*Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *130*, 402.
43. Mallakpour, S.; Javadpour, M. ;*Colloid Polym. Sci.* **2015**, *293*, 2565.
44. Barbosa-Pereira, L.; Cruz, J. M.; Sendón, R.; Rodríguez Bernaldo de Quirós, A.; Ares, A.; Castro-López, M.; Abad, M. J.; Maroto, J.; Paseiro-Losada, P. ;*Food Control* **2013**, *31*, 236.
45. Fang, Z.; Zhao, Y.; Warner, R. D.; Johnson, S. K. ;*Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *61*, 60.
46. Mastromatteo, M.; Mastromatteo, M.; Conte, A.; Del Nobile, M. A. ;*Trends Food Sci. Technol.* **2010**, *21*, 591.
47. Alvarez, M. F. ;*Food Sci. Technol. Int.* **2000**, *6*, 97.
48. Otoni, C. G.; Espitia, P. J. P.; Avena-Bustillos, R. J.; McHugh, T. H. ;*Food Res. Int.* **2016**, *83*, 60.
49. Júnior, A. V.; Fronza, N.; Foralosso, F. B.; Antônio, R.; Machado, F.; Gabriela, M.; Quadri, N. ;*Food Bioprocess Technol* **2015**, *8*, 75.
50. Reddy, K. K.; Shanker, K. S.; Ravinder, T.; Prasad, R. B. N.; Kanjilal, S. ;*Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2010**, *112*, 600.
51. Rodriguez-Lafuente, A.; Nerin, C.; Batlle, R. ;*J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6780.
52. Arrua, D.; Strumia, M. C.; Nazareno, M. A. ;*J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 9228.
53. Pereira de Abreu, D. A.; Losada, P. P.; Maroto, J.; Cruz, J. M. ;*Food Res. Int.* **2010**, *43*, 1277.
54. Granda-Restrepo, D. M.; Soto-Valdez, H.; Peralta, E.; Troncoso-Rojas, R.; Vallejo-Córdoba, B.; Gámez-Meza, N.; Graciano-Verdugo, A. Z. ;*Food Res. Int.* **2009**, *42*, 1396.
55. Carol López-de-Dicastillo, Davinson Pezo, C. N.; Gracia López-Carballo, Ramón Catalá, R. G. and P. H.-M. ;*Packag. Technol. Sci.* **2012**, *25*, 457.
56. Tian, F.; Decker, E. A.; Goddard, J. M. ;*J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 7710.
57. Martínez-Abad, A.; Lagaron, J. M.; Ocio, M. J. ;*J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 5350.
58. Summers, J. W. ;*J. Vinyl Addit. Technol.* **1997**, *3*, 130.
59. Zeddám, C.; Belhaneche-Bensemra, N. ;*Polimery/Polymers* **2011**, *56*, 657.
60. L. Bernard, B. Décaudin, M. Lecouer, D. Richard, D. Bourdeaux, R. Cueff, V. S. Analytical methods for the determination of DEHP plasticizer alternatives present in medical devices: A review **2014**, 39–54.
61. Chiellini, F.; Ferri, M.; Morelli, A.; Dipaola, L.; Latini, G. ;*Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 1067.
62. Coltro, L.; Duarte, L. C. ;*Polímeros* **2013**, *23*, 128.
63. Radaniel, T.; Genay, S.; Simon, N.; Feutry, F.; Quagliozi, F.; Barthélémy, C.; Lecoeur, M.; Sautou, V.; Décaudin, B.; Odou, P. **2014**, *965*, 158.
64. Bueno-Ferrer, C.; Garrigós, M. C.; Jiménez, A. ;*Polym. Degrad. Stab.* **2010**, *95*, 2207.
65. Bui, T. T.; Giovanoulis, G.; Palm, A.; Magnér, J.; Cousins, I. T.; Wit, C. A. De ;*Sci. Total Environ.* **2016**, *541*, 451.
66. Merchan, M.; Sedlarikova, J.; Vesel, A.; MacHovsky, M.; Sedlarik, V.; Saha, P. ;*Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **2013**, *62*, 101.
67. Hannon, J. C.; Kerry, J.; Cruz-Romero, M.; Morris, M.; Cummins, E. ;*Trends Food Sci. Technol.* **2015**, *43*, 43.
68. Kithva, P. H.; Grøndahl, L.; Kumar, R.; Martin, D.; Trau, M. ;*Nanoscale* **2009**, *1*, 229.
69. Suntornnond, R.; An, J.; Yeong, W. Y.; Chua, C. K. ;*Macromol. Mater. Eng.* **2015**, *300*, 858.
70. Yang, D.; Peng, X.; Zhong, L.; Cao, X.; Chen, W.; Zhang, X.; Liu, S.; Sun, R. ;*Carbohydr. Polym.* **2014**, *103*, 198.
71. Mallakpour, S.; Javadpour, M. ;*Polym. Adv. Technol.* **2017**, *28*, 393.
72. Braga, L. R.; Rangel, E. T.; Suarez, P. A. Z.; Machado, F. ;*Food Packag. Shelf Life* **2017**, *15*, 122.
73. Afzal, A. B.; Akhtar, M. J. ;*J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **2010**, *20*, 783.
74. Choe, E.; Min, D. B. ;*Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2009**, *8*, 345.
75. Johnson, D. R.; Decker, E. A. ;*Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2015**, *6*, 171.
76. Ahmed, M.; Pickova, J.; Ahmad, T.; Liaquat, M.; Farid, A.; Jahangir, M. ;*Sarhad J. Agric.* **2016**, *32*, 230.

77. Morelo, G.; Márquez-Ruiz, G.; Holgado, F.; Giménez, B.; Robert, P. ;*Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2017**, *119*, 1700041.
78. Duan, J.; Jiang, Y.; Cherian, G.; Zhao, Y. ;*Food Chem.* **2010**, *122*, 1035.
79. Morris, M. A.; Padmanabhan, S. C.; Cruz-Romero, M. C.; Cummins, E.; Kerry, J. P. Development of active, nanoparticle, antimicrobial technologies for muscle-based packaging applications. *Meat Sci.* **2017**, *132*, 163–178.
80. Singh, S.; ho Lee, M.; Park, Insik; Shin, Y.; Lee, Y. S. ;*J. Food Sci. Technol.* **2016**, *53*, 2505.
81. Mejlholm, O.; Dalgaard, P. ;*Lett. Appl. Microbiol.* **2002**, *34*, 27.
82. Kuuliala, L.; Pippuri, T.; Hultman, J.; Auvinen, S. M.; Kolppo, K.; Nieminen, T.; Karp, M.; Björkroth, J.; Kuusipalo, J.; Jääskeläinen, E. ;*Food Packag. Shelf Life* **2015**, *6*, 53.
83. Ministério da Saúde - MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA *RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 91, DE 11 DE MAIO DE 2001*; 2007; Vol. 2007.
84. Saúde, M. da; Sanitária, A. N. de V. *RESOLUÇÃO - RDC Nº 56, DE 16 DE NOVEMBRO DE 2012*; 2012.
85. Amar, A.; Parisi, A. V. ;*J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2013**, *125*, 115.
86. 1 Effect of different combinations of glycerol and or trehalose on.
87. Tongnuanchan, P.; Benjakul, S.; Prodpran, T. ;*J. Food Eng.* **2013**, *117*, 350.
88. Pérez, L. M.; Piccirilli, G. N.; Delorenzi, N. J.; Verdini, R. A. ;*Food Hydrocoll.* **2016**, *56*, 352.
89. Siripatrawan, U.; Harte, B. R. ;*Food Hydrocoll.* **2010**, *24*, 770.
90. Lourith, N.; Kanlayavattanukul, M. ;*Agro Food Ind. Hi. Tech.* **2013**, *24*, 56.
91. Trifunski, S.; Ardelean, D. *revista de chimie.* 2016, pp. 2422–2424.
92. Tabart, J.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Defraigne, J. O.; Dommes, J. ;*Food Chem.* **2009**, *113*, 1226.
93. Dolatabadi, J. E. N.; Mokhtarzadeh, A.; Ghareghoran, S. M.; Dehghan, G. ;*Adv. Pharm. Bull.* **2014**, *4*, 101.
94. Masek, A.; Chrzescijanska, E. ;*Int. J. Electrochem. Sci.* **2015**, *10*, 5276.
95. Pérez, L. M.; Soazo, M. del V.; Balagué, C. E.; Rubiolo, A. C.; Verdini, R. A. ;*Food Control* **2014**, *37*, 298.
96. Lutz, A. ;*Métodos físicos-químicos para análise Aliment.* **2008**, 589.
97. Beigmohammadi, F.; Peighambardoust, S. H.; Hesari, J.; Azadmard-Damirchi, S.; Peighambardoust, S. J.; Khosrowshahi, N. K. ;*LWT - Food Sci. Technol.* **2016**, *65*, 106.
98. Qi, Y.; Yin, X.; Zhang, J. ;*Sol. Energy Mater. Sol. Cells* **2016**, *151*, 30.
99. Kaewprachu, P.; Osako, K.; Benjakul, S.; Rawdkuen, S. ;*J. Food Sci. Technol.* **2016**, *53*, 2083.
100. Ramos, Ó. L.; Reinas, I.; Silva, S. I.; Fernandes, J. C.; Cerqueira, M. A.; Pereira, R. N.; Vicente, A. A.; Poças, M. F.; Pintado, M. E.; Malcata, F. X. ;*Food Hydrocoll.* **2013**, *30*, 110.
101. Nazmi, N. N.; Isa, M. I. N.; Sarbon, N. M. ;*Food Biosci.* **2017**, *19*, 149.
102. Arfat, Y. A.; Ejaz, M.; Jacob, H.; Ahmed, J. ;*Carbohydr. Polym.* **2017**, *157*, 65.
103. 4 - Transparent and heat-insulation plasticized polyvinyl chloride (PVC).
104. Galotto, M.; Ulloa, P. ;*Packag. Technol. Sci.* **2010**, *23*, 253.
105. Biosafe organic diacid intercalated LDH-PVC nanocomposites versus pure.
106. Rafiq, M. Y.; Iqbal, F.; Aslam, F.; Bilal, M.; Munir, N.; Sultana, I.; Ashraf, F.; Manzoor, F.; Hassan, N.; Razaq, A. ;*J. Alloys Compd.* **2017**, *729*, 1072.
107. Bonilla, J.; Talón, E.; Atarés, L.; Vargas, M.; Chiralt, A. ;*J. Food Eng.* **2013**, *118*, 271.
108. Azeredo, H. M. C.; Kontou-Vrettou, C.; Moates, G. K.; Wellner, N.; Cross, K.; Pereira, P. H. F.; Waldron, K. W. ;*Food Hydrocoll.* **2015**, *50*, 1.
109. Kajbafvala, A.; Salabat, A.; Salimi, A. ;*Pharm. Dev. Technol.* **2016**, *0*, 1.
110. Jangde, R.; Singh, D. ;*Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* **2016**, *44*, 635.
111. Kumar, P.; Sharma, G.; Kumar, R.; Singh, B.; Malik, R.; Katare, O. P.; Raza, K. ;*Int. J. Pharm.* **2016**, *515*, 307.
112. Mallakpour, S.; Javadpour, M. ;*Compos. Interfaces* **2015**, *22*, 867.
113. Parreira, T. F.; Ferreira, M. M. C.; Sales, H. J. S.; De Almeida, W. B. ;*Appl. Spectrosc.* **2002**, *56*, 1607.
114. Chen, J.; Li, X.; Wang, Y.; Huang, J.; Li, K.; Nie, X.; Jiang, J. ;*Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2017**, *119*, 1600216.
115. Turhan, Y.; Doğan, M.; Alkan, M. ;*Ind. Eng. Chem. Res.* **2010**, *49*, 1503.

116. Ramesh, S.; Yi, L. J. ;*Ionics (Kiel)*. **2009**, *15*, 413.
117. Vergara-Castañeda, H.; Hernandez-Martinez, A. R.; Estevez, M.; Mendoza, S.; Luna-Barcenas, G.; Pool, H. ;*J. Colloid Interface Sci.* **2016**, *466*, 44.
118. Anwer, M. K.; Al-Mansoor, M. A.; Jamil, S.; Al-Shdefat, R.; Ansari, M. N.; Shakeel, F. ;*Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *92*, 213.
119. Giesecking, B.; Jäck, B.; Preis, E.; Jung, S.; Forster, M.; Scherf, U.; Deibel, C.; Dyakonov, V. ;*Adv. Energy Mater.* **2012**, *2*, 1477.
120. Pedersen, G. A.; Jensen, L. K.; Fankhauser, A.; Biedermann, S.; Petersen, J. H.; Fabech, B. ;*Food Addit. Contam. Part A* **2008**, *25*, 503.
121. Alghunaim, N. S. ;*Results Phys.* **2015**, *5*, 331.
122. Flores-Garay, K. A.; Martínez-Luévanos, A.; Cruz-Ortiz, B. R.; García-Cerda, L. A.; López-Badillo, C. M. ;*Boletín la Soc. Española Cerámica y Vidr.* **2016**, *55*, 239.
123. Durdureanu-Angheluta, A.; Mihasan, C.; Doroftei, F.; Dascalu, A.; Ursu, L.; Velegrakis, M.; Pinteala, M. *Revue Roumaine de Chimie.* 2014, pp. 151–159.
124. Elashmawi, I. S.; Hakeem, N. A.; Marei, L. K.; Hanna, F. F. ;*Phys. B Condens. Matter* **2010**, *405*, 4163.
125. Mallakpour, S.; Jarahiyan, A. ;*J. Thermoplast. Compos. Mater.* **2016**, *30*, 1267.
126. Zhu, H. M.; Jiang, X. G.; Yan, J. H.; Chi, Y.; Cen, K. F. ;*J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2008**, *82*, 1.
127. Trendafilova, I.; Szegedi, A.; Mihály, J.; Momekov, G.; Lihareva, N.; Popova, M. ;*Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *73*, 285.
128. Vadukumpully, S.; Paul, J.; Mahanta, N.; Valiyaveettil, S. ;*Carbon N. Y.* **2011**, *49*, 198.
129. Das, P.; Roy, A.; Chakrabarti, S. ;*J. Polym. Environ.* **2017**, *25*, 1231.
130. da Silva, F. F.; da S. Aquino, K. A.; Araújo, E. S. ;*Polym. Degrad. Stab.* **2008**, *93*, 2199.
131. Bondet, V.; Berset, C.; Chimie, L. De **1997**, *615*, 609.
132. Giteru, S. G.; Oey, I.; Ali, M. A.; Johnson, S. K.; Fang, Z. Effect of kafirin-based films incorporating citral and quercetin on storage of fresh chicken fillets. *Food Control* **2017**, *80*, 37–44.
133. A. Danchin Encyclopedia of Genetics. *Encycl. Genet.* **2001**.
134. Aizawa, S.-I. *20*. 2013,.
135. FRANCO, B. D. G. de M. *Microbiologia dos alimentos*.; 2005.
136. Blaser, J. E. B. & R. D. & M. J. *Principles and Practice of Infectious Diseases*; 2015.
137. Albertos, I.; Rico, D.; Diez, A. M.; González-Arnáiz, L.; García-Casas, M. J.; Jaime, I. ;*J. Sci. Food Agric.* **2015**, *95*, 2858.
138. Mano, S. ; Ordoñez, J. ; Garcia de Fernando, G. . ;*Food Microbiol.* **2000**, *17*, 657.
139. Gómez-Estaca, J.; López de Lacey, A.; López-Caballero, M. E.; Gómez-Guillén, M. C.; Montero, P. ;*Food Microbiol.* **2010**, *27*, 889.
140. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO SECRETARIA *INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 20, DE 21 DE JULHO DE 1999*; 1999; pp. 0–98.
141. Irene Cilla, Luis Martínez, Jose´ Antonio Beltra´n, P. R. * Effect of low-temperature preservation on the quality of vacuum-packaged dry-cured ham: Refrigerated boneless ham and frozen ham cuts **2006**, 12–21.
142. GRIGIO, M. L.; DURIGAN, M. F. B.; CHAGAS, E. A.; CHAGAS, P. C.; NASCIMENTO, C. R. do; ALMEIDA, M. S. ;*Food Sci. Technol.* **2015**, *35*, 652.
143. Mendes, A. C. G.; Rettore, D. M.; Ramos, A. de L. S.; Cunha, S. de F. V. da; Oliveira, L. C. de; Ramos, E. M. ;*Ciência Rural* **2014**, *44*, 1291.