

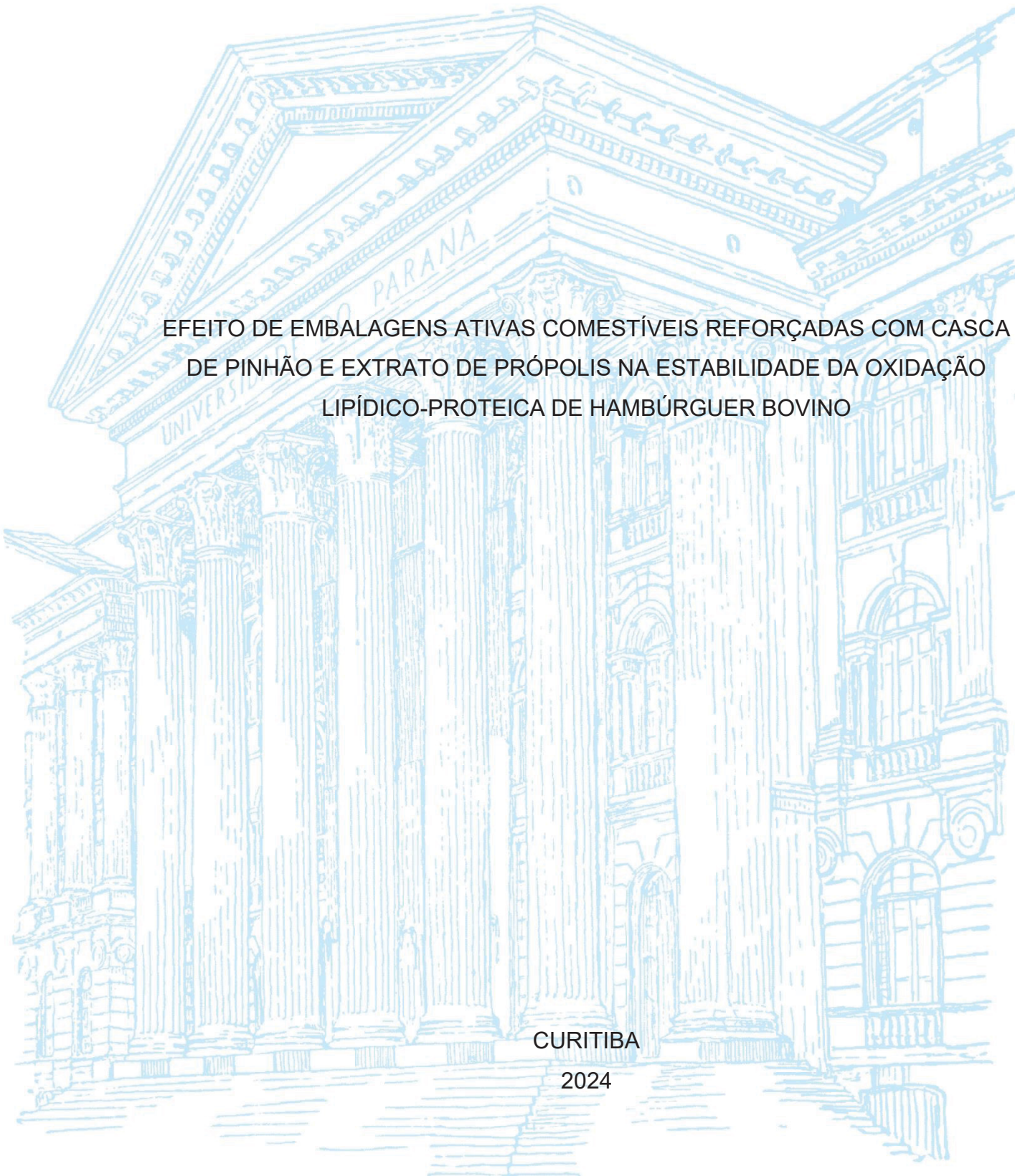
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DEOCLECIANO CASSIANO DE SANTANA NETO

EFEITO DE EMBALAGENS ATIVAS COMESTÍVEIS REFORÇADAS COM CASCA  
DE PINHÃO E EXTRATO DE PRÓPOLIS NA ESTABILIDADE DA OXIDAÇÃO  
LIPÍDICO-PROTEICA DE HAMBÚRGUER BOVINO

CURITIBA

2024



DEOCLECIANO CASSIANO DE SANTANA NETO

EFEITO DE EMBALAGENS ATIVAS COMESTÍVEIS REFORÇADAS COM CASCA  
DE PINHÃO E EXTRATO DE PRÓPOLIS NA ESTABILIDADE DA OXIDAÇÃO  
LIPÍDICO-PROTEICA DE HAMBÚRGUER BOVINO

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Maria Matos Jorge  
Coorientador: Prof. Dr. Fábio Anderson Pereira da Silva  
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Mário de Matos Jorge

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Santana Neto, Deocleciano Cassiano de

Efeito de embalagens ativas comestíveis reforçadas com casca de pinhão e extrato de própolis na estabilidade da oxidação lipídico-proteica de hambúrguer bovino / Deocleciano Cassiano de Santana Neto. – Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Regina Maria Matos Jorge

Coorientadores: Fábio Anderson Pereira da Silva; Luiz Mário de Matos Jorge

1. Plásticos biodegradáveis. 2. Antioxidantes. 3. Oxidação. 4. Embalagens - Aspectos ambientais. 5. Filmes comestíveis. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Jorge, Regina Maria Matos. IV. Silva, Fábio Anderson Pereira da. V. Jorge, Luiz Mário de Matos. VI. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **DEOCLECIANO CASSIANO DE SANTANA NETO** intitulada: **Efeito de embalagens ativas comestíveis reforçadas com casca de pinhão e extrato de própolis na estabilidade da oxidação lipídico-proteica de hambúguer bovino**, sob orientação da Profa. Dra. REGINA MARIA MATOS JORGE, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 24 de Abril de 2024.

Assinatura Eletrônica

25/04/2024 12:37:20.0

REGINA MARIA MATOS JORGE  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

25/04/2024 13:52:25.0

CRISTIANE VIEIRA HELM  
Avaliador Externo (EMBRAPA FLORESTAS)

Assinatura Eletrônica

15/05/2024 11:54:37.0

ARION ZANDONÁ FILHO  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

25/04/2024 16:24:58.0

SUELEN ÁVILA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ -  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO)

Assinatura Eletrônica

25/04/2024 22:58:43.0

LUÍS RICARDO SHIGUEYUKI KANDA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

*Dedico esta tese a meus pais, Francisco e Geovanny, por todo amor e dedicação em minha criação e educação. A meus irmãos Tiago, Albino e Maria Luíza por todo o apoio constante e amizade. Às minhas sobrinhas, Mariana, Manoela e Marcela, por trazerem tanta alegria e luz à minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e do aprendizado, bem como pela força para superar as dificuldades durante esse percurso.

Agradeço, em especial, a meus pais, Francisco e Geovanny, os quais sempre me instruíram desde criança aos estudos, mesmo que para isso ficássemos longe fisicamente. Aos meus irmãos, Tiago, Albino e Maria Luíza, que sempre estiveram ao meu lado, por todo o apoio e amizade sempre me ajudando em momentos difíceis.

À Universidade Federal do Paraná (UFPR) e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL/UFPR) por toda a estrutura física, que me proporcionou tal crescimento pessoal e profissional.

À CAPES pela concessão da bolsa, responsável pela realização desta pesquisa.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Regina Maria Matos Jorge, pela oportunidade, confiança e parceria no desenvolvimento deste projeto.

A meu coorientador, Prof. Dr. Fábio Anderson Pereira da Silva, que desempenhou papel de suma importância nos experimentos relativos às aplicações dos filmes ativos.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Agroalimentar (PPGTA), pela parceria e estrutura física, que me proporcionou realizar parte desta pesquisa.

À Embrapa Florestas e a pesquisadora Cristiane Helm pela parceria nesta pesquisa, desde a doação dos pinhões, como no auxílio prestado na realização das análises.

Agradeço, também, a todos os amigos feitos durante essa jornada por me ajudarem sempre. Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Engenharia de Processos e Sistemas Particulados (LEPSP): Ivisson, Kauyse, Thainnane, Gustavo, e aos amigos que encontrei durante essa jornada na UFPR, Luana, Rúbia, Pablo, Rodolfo, Ana Biz, Danilo Gazzoli, Ítalo, Bianca Peron, obrigado pela boa vivência, pelo amparo, conhecimento e risadas compartilhadas.

Agradeço ao Laboratório de Engenharia de Processos e Sistemas Particulados (LEPSP), Laboratório de Engenharia Bioquímica e Biotecnologia (LENGBIO), Laboratório de Catálise e Processos Químicos (LCPQ), a Central Analítica Multiusuária das Usinas Piloto (CAMUP), ao Centro de Microscopia Eletrônica e ao

Laboratório de Anatomia da Madeira da Engenharia Florestal da UFPR. Ao laboratório de Cromatografia e Espectrometria (LACE) e Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Cárneos (LPDPC) da UFPB.

Aos técnicos do laboratório de Cromatografia e Espectrometria do PPGTA/UFPB (LACE), José Evangelista e Valquíria Cardoso, por toda amizade, ajuda, apoio, ensinamentos e risos no laboratório durante a execução dos experimentos da aplicação dos filmes ativos.

E a todos os envolvidos que de alguma forma contribuíram para este momento.

Muito obrigado!

## RESUMO

O consumo de produtos amplamente difundidos na cultura local, como a própolis e o pinhão (semente da *Araucaria angustifolia*), está relacionado às suas características químicas, as quais incluem compostos com alto potencial antimicrobiano, antioxidante e sensoriais. No entanto, durante o processo de obtenção desses produtos, são gerados resíduos que não são aproveitados economicamente, mas que apresentam compostos bioativos com ação antimicrobiana e antioxidante, que apresentam potencial para uso na indústria de alimentos, além de proporcionar melhorias ambientais. Assim, o objetivo principal deste estudo foi desenvolver e avaliar o efeito de embalagens ativas comestíveis, reforçadas com a casca do fruto da *Araucaria angustifolia*, extrato da casca e própolis verde de abelha *Apis*, na estabilidade oxidativa de hambúrguer bovino. A otimização do processo de extração da casca de pinhão resultou em extratos com teores significativos de compostos fenólicos totais (337,05 mg EAG.g<sup>-1</sup>), flavonoides totais (157,37 mg EC.g<sup>-1</sup>) e taninos condensados (12,81%), além de alta atividade antioxidante (1533,31; 1822,71 e 30,32 μmol ET.g<sup>-1</sup> para DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> e FRAP, respectivamente), indicando seu potencial na indústria de alimentos. Os métodos de extração assistida por ultrassom (EA) e disruptor de célula (EC) foram efetivos para extração de compostos antioxidantes nas amostras de própolis verde (PV) e mandacaria (PM). Os extratos de PV apresentaram maior teor de compostos fenólicos, flavonoides, de ácidos 3,4-dihidroxibenzoico, cafeico e p-cumárico, miricetina, quercetina e catequina e atividade antioxidante. Por outro lado, os extratos obtidos de PM destacaram-se pela presença de ácidos elágico, vanílico, cafeico, miricetina, quercetina e hesperetina. Filmes comestíveis à base de farinha da amêndoa de pinhão e gelatina, caracterizados por sua resistência mecânica e de barreira, foram produzidos. A inclusão da casca de pinhão foi um fator contribuinte para a melhoria dessas propriedades. As formulações de filme de farinha da amêndoa de pinhão (5,0% de farinha da amêndoa de pinhão, 1,2% de glicerol e 0,4% de pó da casca de pinhão) e gelatina (5,0% de gelatina, 2,0% de glicerol e 0,4% de pó da casca de pinhão) apresentaram os melhores resultados (5,06 MPa para resistência à tração e 0,14 g.mm.kPa<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> para permeabilidade ao vapor de água) e (3,88 MPa para resistência à tração e 0,28 g.mm.kPa<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> para permeabilidade ao vapor de água), respectivamente. A aplicação dos filmes ativos à base de farinha da amêndoa de pinhão e à base de gelatina incorporados com extrato da casca de pinhão e própolis mostrou-se eficiente em retardar as reações de oxidação lipídica e proteica em hambúrgueres bovinos durante o armazenamento refrigerado. Esses filmes representam uma alternativa ecologicamente correta e eficaz para embalagens primárias de alimentos, prolongando a vida útil dos produtos. Os resultados desta pesquisa têm implicações significativas na produção de embalagens mais sustentáveis e eficazes na preservação da qualidade dos alimentos, contribuindo para a redução de impactos negativos no meio ambiente, na saúde humana, além de favorecer a preservação da espécie nativa *Araucaria angustifolia*.

Palavras-chave: Biodegradabilidade, compostos antioxidantes, filmes comestíveis, estabilidade oxidativa, embalagens sustentáveis.

## ABSTRACT

The consumption of products widely disseminated in local cultures, such as propolis and pine nuts (*Araucaria angustifolia* seed), is related to their chemical characteristics, which include compounds with high antimicrobial, antioxidant, and sensory potential. However, while obtaining these products, waste is generated that is not used economically but contains bioactive compounds with antimicrobial and antioxidant action, which have the potential for use in the food industry, providing environmental improvements. Thus, the main aim of this study was to develop and evaluate the effect of edible active packaging, reinforced with the husk of the *Araucaria angustifolia* fruit and extracts of husk and green propolis from *Apis* bee, on the oxidative stability of beef patties. The optimization of the pinhão husk extraction process resulted in extracts with significant levels of total phenolic compounds (337.05 mg EAG.g<sup>-1</sup>), total flavonoids (157.37 mg EC.g<sup>-1</sup>), and condensed tannins (12.81%), in addition to high antioxidant activity (1533.31, 1822.71 and 30.32 μmol ET.g<sup>-1</sup> for DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> and FRAP, respectively), indicating its potential in the food industry. The ultrasound-assisted extraction (EA) and cell disruptor (CE) methods were effective for extracting antioxidant compounds in green propolis (PV) and mandaçaia (PM) samples. PV extracts showed a higher content of phenolic compounds, flavonoids, 3,4-dihydroxybenzoic, caffeic, and p-coumaric acids, myricetin, quercetin, and catechin, and antioxidant activity. On the other hand, the extracts obtained from PM stood out for the presence of ellagic, vanillic, caffeic acids, myricetin, quercetin, and hesperetin. Edible films were produced based on pinhão flour and gelatin, characterized by their mechanical and barrier resistance. The inclusion of pinhão husk powder was a contributing factor to the improvement of these properties. The formulations of pinhão flour film (5.0% pinhão flour, 1.2% glycerol and 0.4% pinhão husk powder) and gelatin (5.0% gelatin, 2.0% glycerol and 0.4% pinhão husk powder) showed the best results (5.06 MPa for tensile strength and 0.14 g.mm.kPa<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> for water vapor permeability) and (3.88 MPa for tensile strength and 0.28 g.mm.kPa<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> for water vapor permeability), respectively. Applying active films based on pinhão flour and gelatin-based incorporated with pinhão husk extract and propolis proved efficient in delaying lipid and protein oxidation reactions in beef patties during refrigerated storage. These films represent an environmentally friendly and effective alternative to primary food packaging, extending the shelf life of products. The results of this research have significant implications for producing more sustainable and effective packaging in preserving food quality, reducing negative impacts on the environment and human health, and favoring the preservation of the native species *Araucaria angustifolia*.

Keywords: Biodegradability, antioxidant compounds, edible films, oxidative stability, sustainable packaging.

## LISTA DE FIGURAS

|   |     |
|---|-----|
| FIGURA 1 – PINHA (A); ESTRUTURAS DE UMA PINHA (PINHÕES CHEIOS, CHOCHOS E FALHAS) (B).....   | 31  |
| FIGURA 2 – AÇÕES DOS COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NOS FILMES ATIVOS SOBRE PRODUTOS CÁRNEOS E PESCADO .....   | 44  |
| FIGURA 3 – MECANISMO DA OXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS .....  | 46  |
| FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DA CASCA DE PINHÃO.....   | 53  |
| FIGURA 5 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA QUE ILUSTRAM OS EFEITOS INTERATIVOS DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO PARA AS VARIÁVEIS: COMPOSTOS FENÓLICOS ( $Y_1$ ) (A–C), FLAVONOIDES TOTAIS ( $Y_2$ ) (D–F) E TANINOS CONDENSADOS ( $Y_3$ ) (G–I).....  | 64  |
| FIGURA 6 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA QUE ILUSTRAM OS EFEITOS INTERATIVOS DE DIFERENTES PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: DPPH $\cdot$ ( $Y_4$ ) (A–C), ABTS $^{*+}$ (D–F) ( $Y_5$ ) E FRAP ( $Y_6$ ) (G–I).....  | 67  |
| FIGURA 7 – PERFIS DOS VALORES PREVISTOS E DESEJABILIDADE PARA O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES TOTAIS, TANINOS CONDENSADOS, ATIVIDADE SEQUESTRANTE DOS RADICAIS DPPH $\cdot$ , ABTS $^{*+}$ E PODER ANTIOXIDANTE DA REDUÇÃO DO FERRO (FRAP) DO EXTRATO DE CASCA DE PINHÃO ..... | 72  |
| FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA PRÓPOLIS.. ...   | 78  |
| FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DA ELABORAÇÃO DOS FILMES.....   | 99  |
| FIGURA 10 – SUPERFÍCIES DE RESPOSTA GERADAS PARA A VARIÁVEL ELONGAÇÃO (ELO %) EM FILMES DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO (A-C) E FILMES DE GELATINA (D-F) COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO.....  | 114 |
| FIGURA 11 – SUPERFÍCIES DE RESPOSTA GERADAS PARA A VARIÁVEL RESISTÊNCIA À TRAÇÃO (RT) EM FILMES DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO (A-C) E FILMES DE GELATINA (D-F) COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO .....   | 116 |
| FIGURA 12 – SUPERFÍCIES DE RESPOSTA GERADAS PARA A VARIÁVEL PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA (PVA) EM FILMES DE FARINHA DA   |     |

|  |     |
|--|-----|
| AMÊNDOA DE PINHÃO (A-C) E FILMES DE GELATINA (D-F) COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO.....   | 119 |
| FIGURA 13 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DAS SUPERFÍCIES (1000X) DOS FILMES COMESTÍVEIS DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO (PF) E FILMES COMESTÍVEIS DE GELATINA (GF) INCORPORADOS COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO.....                                 | 127 |
| FIGURA 14 – ESPECTROS DE FTIR DE FILMES COMESTÍVEIS DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO (A) E DOS FILMES COMESTÍVEIS DE GELATINA (B) COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO.....   | 130 |
| FIGURA 15 – ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTG) DOS FILMES COMESTÍVEIS DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO (A E C) E DOS FILMES COMESTÍVEIS DE GELATINA (B E D) COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO.....                                  | 132 |
| FIGURA 16 - FLUXOGRAMA DA ELABORAÇÃO DOS FILMES ATIVOS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO.....   | 140 |
| FIGURA 17 - FLUXOGRAMA DA APLICAÇÃO DOS FILMES ATIVOS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO EM HAMBÚRGUERES BOVINOS.....  | 145 |
| FIGURA 18 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DAS SUPERFÍCIES (1000X) DOS FILMES ATIVOS DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO COM EXTRATOS PHE E PE.....   | 153 |
| FIGURA 19 – ESPECTROS DE ATR-FTIR DOS FILMES ATIVOS DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO COM EXTRATOS PHE E PE.....   | 154 |
| FIGURA 20 – TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (A), ATIVIDADE DE SEQUESTRO DO RADICAL DPPH* (B) E FRAP (C) OBTIDOS PARA OS FILMES ATIVOS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO COM ADIÇÃO DE EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO (PHE) E PRÓPOLIS (PE) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES..... | 156 |
| FIGURA 21 – TESTE DE MIGRAÇÃO EM ÁGUA (A) E ÁLCOOL (B) OBTIDOS PARA OS FILMES ATIVOS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO COM ADIÇÃO DE EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO (PHE) E PRÓPOLIS (PE) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....   | 157 |
| FIGURA 22 – APARÊNCIA VISUAL DOS FILMES ATIVOS DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO RECUPERADOS EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.....  | 159 |

|  |     |
|--|-----|
| FIGURA 23 – EFEITO DE DIVERSOS TRATAMENTOS NA APARÊNCIA DE HAMBÚRGUERES BOVINOS DURANTE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO POR ATÉ 12 DIAS.....   | 161 |
| FIGURA 24 – EFEITO DOS FILMES À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO COM EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO (PHE) E DE PRÓPOLIS (PE) NA ESTABILIDADE DA COR DE HAMBÚRGUER BOVINO DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO (12 DIAS A $4 \pm 1$ °C).....                        | 162 |
| FIGURA 25 – RESULTADOS DOS ÍNDICES DE PERÓXIDOS (IP), TBARS E COMPOSTOS CARBONÍLICOS TOTAIS (CCT) DE HAMBÚRGUER BOVINO DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO (12 DIAS A $4 \pm 1$ °C).....   | 165 |
| FIGURA 26 – FLUXOGRAMA DA ELABORAÇÃO DOS FILMES ATIVOS À BASE DE GELATINA.....   | 174 |
| FIGURA 27 – FLUXOGRAMA DA APLICAÇÃO DOS FILMES ATIVOS À BASE DE GELATINA EM HAMBÚRGUERES BOVINOS.....  | 179 |
| FIGURA 28 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) (1000X) DA SUPERFÍCIE DOS FILMES ATIVOS À BASE DE GELATINA.....   | 188 |
| FIGURA 29 – ESPECTROS DE ATR-FTIR DOS FILMES ATIVOS À BASE DE GELATINA COM ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATOS DE PHE E PE.....   | 189 |
| FIGURA 30 – TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT) (A), ATIVIDADE DE SEQUESTRO DO RADICAL DPPH' (B) E FRAP (C) OBTIDOS PARA OS FILMES ATIVOS À BASE DE GELATINA COM ADIÇÃO DE EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO (PHE) E PRÓPOLIS (PE) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES..... | 191 |
| FIGURA 31 – TESTE DE MIGRAÇÃO EM ÁGUA (A) E ÁLCOOL (B) OBTIDOS PARA OS FILMES ATIVOS À BASE DE GELATINA COM ADIÇÃO DE EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO (PHE) E PRÓPOLIS (PE) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....   | 193 |
| FIGURA 32 – APARÊNCIA VISUAL DOS FILMES ATIVOS À BASE DE GELATINA RECUPERADOS EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.....   | 195 |
| FIGURA 33 – IMPACTO DE DIFERENTES TRATAMENTOS NA APARÊNCIA DE HAMBÚRGUERES BOVINOS AO LONGO DE 12 DIAS DE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO.....   | 197 |
| FIGURA 26 – EFEITO DO FILME À BASE DE GELATINA COM EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO (PHE) E PRÓPOLIS (PE) EM DIFERENTES   |     |

|  |     |
|--|-----|
| CONCENTRAÇÕES NA ESTABILIDADE DA COR DE HAMBÚRGUER BOVINO DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO (12 DIAS A $4 \pm 1$ °C).....  | 198 |
| FIGURA 35 – RESULTADOS DOS ÍNDICES DE PERÓXIDOS (IP), TBARS E COMPOSTOS CARBONÍLICOS TOTAIS (CCT) DE HAMBÚRGUERES BOVINOS EMBALADOS REFRIGERADOS DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO (12 DIAS A $4 \pm 1$ °C)..... | 201 |

## LISTA DE QUADROS

|   |    |
|---|----|
| QUADRO 1 – FILMES COM ADIÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS. ....                                    | 37 |
| QUADRO 2 – EXEMPLOS DE FILMES COM ADIÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS EM<br>PRODUTOS CÁRNEOS. .... | 41 |

## LISTA DE TABELAS

|   |     |
|---|-----|
| TABELA 1 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA SEMENTE <i>IN NATURA</i> DA <i>Araucaria angustifolia</i> .....   | 32  |
| TABELA 2 – MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PROPOSTA PARA A EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS DA CASCA DE PINHÃO.....   | 54  |
| TABELA 3 – NÍVEIS E RESULTADOS DAS VARIÁVEIS RESPOSTAS DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO DA CASCA DE PINHÃO.....  | 60  |
| TABELA 4 – COEFICIENTES DE REGRESSÃO E ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA VARIÁVEIS DE RESPOSTAS.....  | 61  |
| TABELA 5 – COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN ( $r_s$ ) ENTRE AS VARIÁVEIS .....   | 63  |
| TABELA 6 – RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DO EXTRATO OTIMIZADO DA CASCA DE PINHÃO.....  | 73  |
| TABELA 7 – CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT), FLAVONOIDES TOTAIS (FT) E TANINOS CONDENSADOS (TC) EM EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE (PV) E MANDAÇAIA (PM) OBTIDOS SOB DIFERENTES EXTRAÇÕES.....                                   | 83  |
| TABELA 8 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE OS RADICAIS DPPH <sup>*</sup> , ABTS <sup>**</sup> E O PODER ANTIOXIDANTE REDUTOR DO FERRO (FRAP) EM EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE VERDE (PV) E MANDAÇAIA (PM) OBTIDOS SOB DIFERENTES EXTRAÇÕES..... | 86  |
| TABELA 9 – COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE SUPERMAN ( $r_s$ ) ENTRE AS VARIÁVEIS CFT, FT, TC, DPPH <sup>*</sup> , ABTS <sup>**</sup> E FRAP .....  | 88  |
| TABELA 10 – PERFIL FENÓLICO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE VERDE (PV) E MANDAÇAIA (PM) OBTIDOS SOB DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO...   | 90  |
| TABELA 11 – COMPOSIÇÃO DOS FILMES À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO E À BASE DE GELATINA COM ADIÇÃO DE DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO .....  | 98  |
| TABELA 12 – COMPOSIÇÃO PARCIAL DA FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO, CASCA E VALORES RELATADOS POR OUTROS AUTORES.....   | 106 |

|   |     |
|---|-----|
| TABELA 13 – APARÊNCIA VISUAL DE FILMES COMESTÍVEIS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO E À BASE DE GELATINA COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO.....  | 109 |
| TABELA 14 – RESULTADOS DE PROPRIEDADES MECÂNICAS (ELONGAÇÃO (ELO) E RESISTÊNCIA À TRAÇÃO (RT)) E PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA (PVA) DOS FILMES COMESTÍVEIS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO E À BASE DE GELATINA COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO.....   | 112 |
| TABELA 15 – COEFICIENTES DE REGRESSÃO E ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ELONGAÇÃO (ELO), RESISTÊNCIA À TRAÇÃO (RT)) E PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA (PVA) DOS FILMES COMESTÍVEIS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO E À BASE DE GELATINA COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO .....                           | 113 |
| TABELA 16 – RESULTADOS DE ESPESSURA, SOLUBILIDADE E ÂNGULO DE CONTATO DOS FILMES COMESTÍVEIS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO E À BASE DE GELATINA COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO.....  | 122 |
| TABELA 17 – RESULTADOS DAS PROPRIEDADES ÓPTICAS DOS FILMES COMESTÍVEIS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO E À BASE DE GELATINA COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO.....  | 125 |
| TABELA 18 – VALORES DE ESPESSURA, PROPRIEDADES MECÂNICAS (ELONGAÇÃO (ELO) E RESISTÊNCIA À TRAÇÃO (RT)), PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA (PVA) E SOLUBILIDADE DOS FILMES ATIVOS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO COM ADIÇÃO DE EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO (PHE) E PRÓPOLIS (PE) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ..... | 149 |
| TABELA 19 – PARÂMETROS DE COR E OPACIDADE DOS FILMES ATIVOS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO COM ADIÇÃO DE EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO (PHE) E PRÓPOLIS (PE) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES .....  | 151 |
| TABELA 20 – RESULTADOS DE ESPESSURA, PROPRIEDADES MECÂNICAS (ELONGAÇÃO (ELO) E RESISTÊNCIA À TRAÇÃO (RT)), PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA (PVA) E SOLUBILIDADE DOS FILMES ATIVOS À BASE DE GELATINA COM ADIÇÃO DE EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO (PHE) E PRÓPOLIS (PE) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES .....                  | 184 |

|  |     |
|--|-----|
| TABELA 21 – RESULTADOS DOS PARÂMETROS DE COR E OPACIDADE DOS FILMES ATIVOS À BASE DE GELATINA COM ADIÇÃO DE EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO (PHE) E PRÓPOLIS (PE) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES..... | 186 |
|--|-----|

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| <b>%M.S</b>                         | - Percentagem de matéria seca                                    |
| <b>μmol ET</b>                      | - Micromol de equivalente Trolox                                 |
| <b>E<sub>1cm</sub><sup>1%</sup></b> | - Absorbância de 1 cm da solução cuja concentração é de 1%       |
| <b>°C</b>                           | - Graus Celsius  |
| <b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>    | - Oxigênio singlete  |
| <b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>    | - Oxigênio singlete  |
| <b>a*</b>                           | - Coordenada vermelho/verde                                      |
| <b>Abs</b>                          | - Absorbância  |
| <b>ABTS<sup>++</sup></b>            | - 2,2'-azino-bis(3etil-benzolina-6-sulfonado)                    |
| <b>AlCl<sub>3</sub></b>             | - Cloreto de alumínio  |
| <b>ANOVA</b>                        | - Análise de variância   |
| <b>AOAC</b>                         | - <i>Association of Official Analytical Chemists</i>             |
| <b>ASTM</b>                         | - <i>American Society for Testing and Materials</i>              |
| <b>b*</b>                           | - Coordenada amarelo/azul  |
| <b>BHT</b>                          | - Hidroxitolueno butilado  |
| <b>BSA</b>                          | - Albumina sérica bovina   |
| <b>CCT</b>                          | - Compostos carbonílicos totais                                  |
| <b>CFT</b>                          | - Compostos fenólicos totais                                     |
| <b>CIE</b>                          | - <i>Commission Internationale de L'eclairage</i>                |
| <b>CO<sub>2</sub></b>               | - Dióxido de carbono   |
| <b>DCCR</b>                         | - Delineamento composto central rotacional                       |
| <b>DNPB</b>                         | - 2,4-dinitrofenilhidrazina                                      |
| <b>DPPH</b>                         | - 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo                                  |
| <b>DTG</b>                          | - Termogravimetria derivada                                      |
| <b>DTG</b>                          | - Derivada termogravimétrica                                     |
| <b>ELO</b>                          | - Elongação  |
| <b>EUA</b>                          | - Estados Unidos da América                                      |
| <b>FAO</b>                          | - <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> |
| <b>FAP</b>                          | - Farinha da amêndoa de pinhão                                   |
| <b>FRAP</b>                         | - <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>                       |
| <b>FT</b>                           | - Flavonoides totais   |

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <b>FTIR</b>                       | - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de <i>Fourier</i> |
| <b>GB</b>                         | - Gelatina bovina  |
| <b>GF</b>                         | - Filmes de gelatina   |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>             | - Água   |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | - Peróxido de hidrogênio   |
| <b>HCl</b>                        | - Ácido clorídrico   |
| <b>HPLC</b>                       | - Cromatografia Líquida de alta eficiência                           |
| <b>IBGE</b>                       | - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística                    |
| <b>IP</b>                         | - Índice de peróxido   |
| <b>IUPAC</b>                      | - <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>           |
| <b>L*</b>                         | - Luminosidade   |
| <b>LOX</b>                        | - Oxidação lipídica  |
| <b>M.O</b>                        | - Matéria orgânica   |
| <b>MDA</b>                        | - Malonaldeído   |
| <b>meqO<sub>2</sub></b>           | - Miliequivalentes de oxigênio ativo                                 |
| <b>MEV</b>                        | - Microscopia eletrônica de varredura                                |
| <b>mg EAG</b>                     | - Miligramas de equivalente em ácido gálico                          |
| <b>mg EC</b>                      | - Miligramas de equivalente em catequina                             |
| <b>min</b>                        | - Minutos  |
| <b>MPa</b>                        | - Mega Pascal  |
| <b>MSR</b>                        | - Metodologia de superfície de resposta                              |
| <b>NaNO<sub>2</sub></b>           | - Nitrito de sódio   |
| <b>NaOH</b>                       | - Hidróxido de sódio   |
| <b>O<sub>2</sub><sup>·-</sup></b> | - Ânion superóxido   |
| <b>OEs</b>                        | - Óleos essenciais   |
| <b>OH<sup>·</sup></b>             | - Radical hidroxila  |
| <b>P.A</b>                        | - Padrão analítico   |
| <b>PBAT</b>                       | - Poli(butileno adipato co-tereftalato)                              |
| <b>PE</b>                         | - Extrato de própolis  |
| <b>PEBD</b>                       | - Polietileno de baixa densidade                                     |
| <b>PF</b>                         | - Filmes de farinha da amêndoa de pinhão                             |
| <b>pH</b>                         | - Potencial hidrogeniônico   |
| <b>PHE</b>                        | - Extrato da casca de pinhão   |
| <b>PM</b>                         | - Própolis mandaçaia   |

**ppm** - Partes por milhão

**PROTOX** - Oxidação proteica

**PV** - Própolis verde

**PVA** - Álcool polivinílico

**PVA** - Permeabilidade ao vapor de água

**PVC** - Policloreto de polivinila

**R\$** - Real

**R<sub>1</sub>OO<sup>•</sup>** - Radicais peróxidos livres

**R<sup>2</sup>** - Coeficiente de determinação

**ROS** - Espécies reativas de oxigênio

**r<sub>s</sub>** - Coeficiente de correlação de Spearman

**RT** - Resistência à tração

**SEAB/DERAL** - Secretaria da Agricultura e do Abastecimento/Departamento de Economia Rural

**Mbar** - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TC** - Taninos condensados

**TGA** - Análise Termogravimétrica

**TGA** - Análise termogravimétrica

**Ton.** - Toneladas

**TPTZ** - 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-tiazinha

**TROLOX** - 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico

**UV-Vis** - Ultravioleta visível

**ΔE** - Variação colorimétrica total

## LISTA DE SÍMBOLOS

© - Copyright

® - Marca registrada

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 26        |
| <b>OBJETIVOS</b> .....   | 28        |
| Objetivo geral .....   | 28        |
| Objetivos específicos .....  | 28        |
| <b>1 CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | <b>31</b> |
| 1.1 ARAUCARIA E O PINHÃO .....   | 31        |
| 1.2 APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS .....   | 33        |
| 1.3 PRÓPOLIS .....   | 35        |
| 1.4 FILMES ATIVOS E BIODEGRADÁVEIS .....   | 36        |
| 1.4.1 Filmes Ativos .....  | 36        |
| 1.4.2 Filmes Biodegradáveis .....  | 39        |
| 1.4.3 Ação dos Filmes Ativos em Produtos Cárneos .....   | 39        |
| 1.5 OXIDAÇÃO LIPÍDICA E PROTEICA EM PRODUTOS CÁRNEOS .....   | 46        |
| 1.6 CONSIDERAÇÕES DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 48        |
| <b>2 CAPÍTULO 2 - EXTRATO RICO EM COMPOSTOS FENÓLICOS E ANTIOXIDANTES DA CASCA DE PINHÃO: UMA ABORDAGEM DE PROJETO EXPERIMENTAL SOBRE A OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO</b> ..... | <b>49</b> |
| 2.1 INTRODUÇÃO .....   | 50        |
| 2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....   | 52        |
| 2.2.1 Solventes e reagentes .....  | 52        |
| 2.2.2 Delineamento experimental .....  | 53        |
| 2.2.3 Caracterização dos extratos .....  | 55        |
| 2.2.3.1 Compostos Fenólicos Totais (CFT) .....   | 55        |
| 2.2.3.2 Flavonoides Totais (FT) .....  | 55        |
| 2.2.3.3 Taninos Condensados (TC) .....   | 55        |
| 2.2.3.4 Atividade Antioxidante <i>in vitro</i> .....   | 56        |
| 2.2.3.4.1 Captura do radical livre DPPH <sup>•</sup> .....   | 56        |
| 2.2.3.4.2 Captura do radical livre ABTS <sup>•+</sup> .....  | 57        |
| 2.2.3.4.3 Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP) .....  | 57        |
| 2.2.4 Análise Estatística .....  | 57        |
| 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 58        |
| 2.3.1 Otimização da extração de compostos antioxidantes .....  | 58        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.3.2 Ajuste do modelo.....   | 70        |
| 2.3.3 Desejabilidade e validação do modelo matemático.....  | 71        |
| 2.4 CONCLUSÕES .....  | 73        |
| <b>3 CAPÍTULO 3 - UMA COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE DUAS DIFERENTES PRÓPOLIS BRASILEIRAS .....</b>   | <b>74</b> |
| 3.1 INTRODUÇÃO .....  | 76        |
| 3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....  | 77        |
| 3.2.1 Solventes e reagentes.....  | 77        |
| 3.2.2 Obtenção dos extratos da própolis de Mandaçaia (PM) e de <i>Apis</i> do tipo verde (PV).....  | 78        |
| 3.2.3 Caracterização dos extratos de própolis .....   | 79        |
| 3.2.3.1 Compostos Fenólicos Totais (CFT).....   | 79        |
| 3.2.3.2 Flavonoides Totais (FT).....  | 80        |
| 3.2.3.3 Taninos Condensados (TC) .....  | 80        |
| 3.2.3.4 Atividade Antioxidante <i>in vitro</i> .....  | 81        |
| 3.2.3.4.1 Captura do radical livre DPPH* .....  | 81        |
| 3.2.3.4.2 Captura do radical livre ABTS** .....   | 81        |
| 3.2.3.4.3 Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP) .....   | 81        |
| 3.2.3.5 Perfil fenólico .....   | 82        |
| 3.2.4 Análise estatística .....   | 82        |
| 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 83        |
| 3.3.1 Compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT) e taninos condensados (CT).....   | 83        |
| 3.3.2 Atividade antioxidante .....  | 85        |
| 3.3.3 Correlação entre conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, taninos condensados e atividades antioxidantes .....   | 87        |
| 3.3.4 Perfil fenólico.....  | 89        |
| 3.4. CONCLUSÕES .....   | 91        |
| <b>4. CAPITULO 4 - POTENCIAL DA CASCA DE PINHÃO (ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA) COMO AGENTE DE REFORÇO DE ESTRUTURA NAS PROPRIEDADES DE FILMES COMESTÍVEIS DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO E GELATINA.....</b> | <b>93</b> |
| 4.1 INTRODUÇÃO .....  | 95        |
| 4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....  | 97        |

|  |     |
|--|-----|
| 4.2.1 Materiais.....   | 97  |
| 4.2.2 Análise de composição da farinha da amêndoa e da casca de pinhão.....  | 97  |
| 4.2.3 Delineamento experimental.....   | 98  |
| 4.2.4 Elaboração dos filmes à base de farinha da amêndoa de pinhão e gelatina com adição de casca de pinhão em pó.....               | 99  |
| 4.2.4 Caracterização dos filmes .....  | 100 |
| 4.2.4.1 Aspectos visuais e táteis .....  | 100 |
| 4.2.4.2 Propriedades mecânicas .....   | 100 |
| 4.2.4.3 Permeabilidade ao vapor de água.....   | 101 |
| 4.2.5 Caracterização complementar.....   | 102 |
| 4.2.5.1 Espessura .....  | 102 |
| 4.2.5.2 Solubilidade em água.....  | 102 |
| 4.2.5.3 Ângulo de contato .....  | 102 |
| 4.2.5.4 Propriedades ópticas.....  | 103 |
| 4.2.5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....  | 103 |
| 4.2.5.6 Espectroscopia no infravermelho por transformada de <i>Fourier</i> (FTIR) .....  | 104 |
| 4.2.5.7 Análises térmicas .....  | 104 |
| 4.2.6 Análise estatística .....  | 104 |
| 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 105 |
| 4.3.1 Análises de composição da farinha da amêndoa e da casca de pinhão .....  | 105 |
| 4.3.2 Aspectos visuais e táteis dos filmes .....   | 107 |
| 4.3.3 Propriedades mecânicas .....   | 112 |
| 4.3.4 Permeabilidade ao vapor de água.....   | 118 |
| 4.3.5 Caracterização complementar.....   | 121 |
| 4.3.5.1 Espessura .....  | 121 |
| 4.3.5.2 Solubilidade e ângulo de contato .....   | 122 |
| 4.3.5.3 Propriedades ópticas.....  | 124 |
| 4.3.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....  | 126 |
| 4.3.5.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de <i>Fourier</i> (FTIR) .....  | 129 |
| 4.3.5.6 Análise termogravimétrica .....  | 131 |
| 4.4 CONCLUSÕES .....   | 134 |
| <b>5 CAPÍTULO 5 – FILMES COMESTÍVEIS À BASE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO COM EXTRATOS DE PINHÃO E DE PROPOLIS RICOS EM COMPOSTOS</b> |     |

|  |            |
|--|------------|
| <b>FENÓLICOS PARA INIBIR A OXIDAÇÃO LIPÍDICA E PROTEICA EM HAMBÚRGUER BOVINO</b> .....       | <b>136</b> |
| 5.1 INTRODUÇÃO .....   | 138        |
| 5.2 MATERIAL E MÉTODOS .....   | 139        |
| 5.2.1 Materiais.....   | 139        |
| 5.2.2 Obtenção dos extratos de casca de pinhão (PHE) e própolis (PE) .....                   | 139        |
| 5.2.3 Elaboração dos filmes ativos comestíveis .....   | 140        |
| 5.2.4 Caracterização dos filmes ativos .....   | 141        |
| 5.2.4.1 Espessura e propriedades mecânicas.....  | 141        |
| 5.2.4.2 Solubilidade em água .....   | 142        |
| 5.2.4.3 Permeabilidade ao vapor de água.....   | 142        |
| 5.2.4.4 Propriedades ópticas.....  | 143        |
| 5.2.4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....                                      | 143        |
| 5.2.4.6 Espectroscopia no infravermelho por transformada de <i>Fourier</i> (FTIR) .....      | 143        |
| 5.2.4.7 Teor de polifenóis e atividade antioxidante dos filmes .....                         | 143        |
| 5.2.4.8 Testes de migração dos compostos ativos.....   | 144        |
| 5.2.4.9 Degradabilidade em solo.....   | 144        |
| 5.2.5 Elaboração dos hambúrgueres e aplicação dos filmes .....                               | 145        |
| 5.2.6 Avaliação da estabilidade oxidativa dos hambúrgueres .....                             | 145        |
| 5.2.6.1 Cor objetiva .....   | 145        |
| 5.2.6.2 Índice de peróxido .....   | 146        |
| 5.2.6.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....                           | 146        |
| 5.2.6.4 Compostos carbonílicos totais.....   | 147        |
| 5.2.7 Análise estatística .....  | 148        |
| 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 148        |
| 5.3.1 Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos PHE e PE..... | 148        |
| 5.3.2 Caracterização dos filmes .....  | 149        |
| 5.3.2.1 Espessura e propriedades mecânicas.....  | 149        |
| 5.3.2.2 Solubilidade em água e Permeabilidade ao vapor de água .....                         | 150        |
| 5.3.2.3 Propriedades ópticas.....  | 151        |
| 5.3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....                                      | 152        |
| 5.3.2.5 Espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR) .....                             | 153        |
| 5.3.2.6 Teor fenólico total e atividade antioxidante dos filmes ativos .....                 | 155        |

|   |            |
|---|------------|
| 5.3.2.7 Testes de migração .....  | 157        |
| 5.3.2.8 Degradabilidade em solo .....   | 158        |
| 5.3.3 Aplicação dos filmes ativos em hambúrguer bovino .....  | 160        |
| 5.3.3.1 Estabilidade nos parâmetros de cor de hambúrgueres bovinos sob armazenamento refrigerado .....  | 160        |
| 5.3.3.2 Estabilidade oxidativa de hambúrguer bovino durante o armazenamento refrigerado (-4 °C) .....   | 164        |
| 5.4 CONCLUSÕES .....  | 168        |
| <b>6 CAPÍTULO 6 – EMBALAGENS ATIVAS À BASE DE GELATINA CONTENDO EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO E PRÓPOLIS PARA INIBIR A OXIDAÇÃO LIPÍDICA E PROTEICA EM HAMBÚRGUERES BOVINOS ARMAZENADOS A FRIO.....</b> | <b>170</b> |
| 6.1 INTRODUÇÃO .....  | 172        |
| 6.2 MATERIAL E MÉTODOS .....  | 173        |
| 6.2.1 Materiais .....   | 173        |
| 6.2.2 Obtenção dos extratos de casca de pinhão (PHE) e própolis (PE) .....  | 173        |
| 6.2.3 Elaboração dos filmes ativos comestíveis .....  | 174        |
| 6.2.4 Caracterização dos filmes ativos .....  | 175        |
| 6.2.4.1 Espessura e propriedades mecânicas .....  | 175        |
| 6.2.4.2 Solubilidade em água .....  | 176        |
| 6.2.4.3 Permeabilidade ao vapor de água .....   | 176        |
| 6.2.4.4 Propriedades ópticas .....  | 177        |
| 6.2.4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....   | 177        |
| 6.2.4.6 Espectroscopia no infravermelho por transformada de <i>Fourier</i> (FTIR) .....   | 177        |
| 6.2.4.7 Degradação dos filmes em solo .....   | 177        |
| 6.2.4.8 Teor de polifenóis e atividade antioxidante dos filmes .....  | 178        |
| 6.2.4.9 Testes de migração dos compostos ativos .....   | 178        |
| 6.2.5 Elaboração dos hambúrgueres e aplicação dos filmes .....  | 179        |
| 6.2.6 Avaliação da estabilidade oxidativa dos hambúrgueres .....  | 180        |
| 6.2.6.1 Cor objetiva .....  | 180        |
| 6.2.6.2 Índice de peróxido .....  | 180        |
| 6.2.6.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....  | 180        |
| 6.2.6.4 Compostos carbonílicos totais .....   | 181        |
| 6.2.7 Análise estatística .....   | 182        |

|  |            |
|--|------------|
| 6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 182        |
| 6.3.1. Compostos fenólico total e atividade antioxidante dos extratos PHE e PE ...         | 182        |
| 6.3.2 Caracterização dos filmes .....  | 183        |
| 6.3.2.1 Espessura e propriedades mecânicas.....  | 183        |
| 6.3.2.2 Solubilidade e permeabilidade ao vapor de água (PVA) .....                         | 185        |
| 6.3.2.3 Propriedades ópticas.....  | 186        |
| 6.3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....                                    | 187        |
| 6.3.2.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de <i>Fourier</i> (FTIR) .....    | 189        |
| 6.3.2.6 Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos filmes ativos..... | 190        |
| 6.3.2.7 Testes de migração .....   | 192        |
| 6.3.2.8 Degradabilidade em solo.....   | 194        |
| 6.3.3 Aplicação dos filmes ativos para manutenção da qualidade de hambúrguer bovino.....   | 196        |
| 6.3.3.1 Estabilidade da cor objetiva.....  | 196        |
| 6.3.3.2 Estabilidade da oxidação lipídica e proteica.....                                  | 200        |
| 6.4 CONCLUSÕES .....   | 205        |
| <b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>  | <b>206</b> |
| 7.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....   | 207        |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>208</b> |

## INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos é responsável pela geração de um volume considerável de resíduos e subprodutos de biomassa, bem como a utilização de plásticos derivados do petróleo. Os resíduos derivados de petróleo são altamente poluentes para o meio ambiente, devido à alta massa molecular e as propriedades hidrofóbicas do polietileno. Além disso, o seu consumo, via embalagens de alimentos, gera acúmulo de resíduos não biodegradáveis, que não possuem destinação específica, causando muitos problemas ambientais associados ao seu descarte (Bilck; Grossmann; Yamashita, 2010; Hazrol *et al.*, 2022; Rodríguez *et al.*, 2012; Santana-Méridas; González-Coloma; Sánchez-Vioque, 2012; Spada; Luchese; Tessaro, 2018).

Os subprodutos orgânicos gerados pela indústria de alimentos apresentam compostos de interesse para indústria e grande potencial para serem incluídos na dieta humana, principalmente aqueles ricos em vitaminas, minerais, fibras, óleos e compostos bioativos com propriedades funcionais (Baiano, 2014; Nascimento Filho; Franco, 2015; Reguengo *et al.*, 2022). Estes compostos presentes nos subprodutos podem ser utilizados para obtenção de produtos com valor agregado, tais como de extratos antioxidantes (Casagrande *et al.*, 2019; da Nóbrega Santos *et al.*, 2023; Freitas *et al.*, 2018; Paludo *et al.*, 2019; Santana Neto *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2018) e óleos essenciais (Badalamenti *et al.*, 2022; Benelli *et al.*, 2018; Rossi *et al.*, 2020; Tavallali *et al.*, 2021).

Em virtude da preocupação com uma produção e utilização de materiais de fontes sustentáveis, e o respeito ao meio ambiente, tem-se direcionado esforços dos setores produtivos para o aproveitamento dos subprodutos gerados após o processamento. Uma alternativa para minimizar o impacto ambiental dos plásticos convencionais, que vem sendo amplamente empregada, é o desenvolvimento e aplicação de filmes e/ou embalagens de biopolímeros de fontes renováveis (Santos *et al.*, 2022; Silva-Rodrigues *et al.*, 2020; Silveira *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2015). Estes apresentam baixo custo e não geram grandes impactos ambientais, sendo uma alternativa frente aos polímeros petroquímicos (Souza *et al.*, 2012; Suderman; Isa; Sarbon, 2018).

Nos últimos anos, vem-se considerando o potencial da elaboração de polímeros biodegradáveis, como os filmes e/ou embalagens comestíveis e/ou biodegradáveis para aplicação em alimentos como uma alternativa (López-De-

Dicastillo *et al.*, 2012; Mir *et al.*, 2018; Prithiviraj *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2022). Na literatura pode-se observar vários estudos relacionados às melhorias de propriedades destes filmes, com o uso de subprodutos da indústria de alimentos, enfatizando a utilização de extratos com propriedades antioxidantes (Akcan; Estévez; Serdaroğlu, 2017; Bilck; Grossmann; Yamashita, 2010; de Souza *et al.*, 2020; Freitas *et al.*, 2018; Piñeros-Hernandez *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2022; Szabo *et al.*, 2020) e óleos essenciais (Ansarian *et al.*, 2022; Hasheminya *et al.*, 2019; Radha Krishnan *et al.*, 2015; Silveira *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2015).

O pinhão é uma semente nativa do Brasil amplamente conhecida e apreciada nas regiões Sul e Sudeste. Embora seja abundantemente consumida nessas regiões, ocorre a geração do resíduo da casca durante o seu processamento para o consumo, sendo esta fonte de compostos com elevado potencial antioxidante de aplicação na indústria de alimentos. Alguns estudos mostram o potencial antioxidante desse subproduto, que, muitas vezes, não possuem destinação específica (de Souza *et al.*, 2020; Freitas *et al.*, 2018; Koehnlein *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2014). Adicionalmente, a própolis é uma resina apícola amplamente usada pela população na forma de extratos, normalmente contra inflamações. São observados estudos que mostram o potencial antimicrobiano e antioxidante atribuídos ao uso de extrato de própolis em produtos alimentícios (Eskandarinia *et al.*, 2018; Reis *et al.*, 2017; Santos, *et al.*, 2019; Skowron *et al.*, 2019).

Dessa forma, a elaboração de uma embalagem ativa, devido a adição de extratos da casca de pinhão e própolis, poderá ser utilizada pela indústria de alimentos como substituto das embalagens plásticas primárias, bem como a substituição do uso de antioxidantes sintéticos. Embora existam pesquisas com o desenvolvimento de embalagens biodegradáveis incorporadas com extratos de pinhão e de própolis, não foram encontrados dados na literatura que reportem o poder antioxidante dessas matrizes em embalagens biodegradáveis quando aplicado em produtos cárneos, justifica-se a necessidade de realizar estudos da aplicação, bem como avaliar o seu efeito sobre a qualidade de hambúrgueres bovinos sob refrigeração..

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Desenvolver e avaliar o efeito de embalagens ativas comestíveis, reforçadas com a casca do fruto da *Araucaria angustifolia*, extrato da casca e própolis verde de abelha *Apis*, na estabilidade oxidativa de hambúrguer bovino.

### Objetivos específicos

#### CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

- Conceituar sobre a *Araucaria angustifolia* e o pinhão; o aproveitamento de resíduos agroindustriais; a própolis; filmes ativos e biodegradáveis;
- Buscar as tendências de estudos que envolvem a ação de filmes ativos em produtos cárneos;
- Explorar os efeitos da oxidação de lipídios e proteínas em carne;

#### CAPÍTULO 2 - EXTRATO RICO EM COMPOSTOS FENÓLICOS E ANTIOXIDANTES DA CASCA DE PINHÃO: UMA ABORDAGEM DE PROJETO EXPERIMENTAL SOBRE A OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO

- Obter um extrato com alto teor de compostos antioxidantes da casca de pinhão;
- Otimizar o processo de extração dos compostos bioativos da casca de pinhão;
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos obtidos por diferentes métodos.

#### CAPÍTULO 3 - UMA COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE DUAS DIFERENTES PRÓPOLIS BRASILEIRAS

- Investigar o conteúdo de compostos fenólicos, flavonoides, taninos condensados e o potencial antioxidante presentes em própolis verde PV (*Apis mellifera*) e a própolis mandaçaia PM (*Melipona quadrifasciata anthidioides*), por meio da extração assistida por ultrassom.

#### CAPÍTULO 4 - POTENCIAL DA CASCA DE PINHÃO COMO AGENTE DE REFORÇO DE ESTRUTURA NAS PROPRIEDADES DE FILMES COMESTÍVEIS DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO

- Caracterizar a composição centesimal da farinha da amêndoa e da casca de pinhão;
- Estabelecer protocolo para desenvolvimento de filmes ativos biodegradáveis e comestíveis pelo método *casting* utilizando farinha da amêndoa de pinhão/gelatina reforçados com casca de pinhão em pó;
- Avaliar o potencial da casca de pinhão como agente reforçador de estrutura nas propriedades de filmes comestíveis de farinha da amêndoa de pinhão/gelatina;
- Determinar as melhores concentrações de farinha da amêndoa de pinhão/gelatina, glicerol e casca de pinhão em pó para obtenção de filmes com melhores propriedades mecânicas e de permeação;
- Avaliar a qualidade dos filmes produzidos através de suas propriedades físicas, estruturais, morfológicas, térmicas, solubilidade e resistência à permeação.

#### CAPÍTULO 5 – FILMES COMESTÍVEIS À BASE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO COM EXTRATOS DE PINHÃO E DE PROPOLIS RICOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS PARA INIBIR A OXIDAÇÃO LIPÍDICA E PROTEICA EM HAMBÚRGUER BOVINO

- Desenvolver filmes ativos pelo método *casting* de farinha da amêndoa de pinhão utilizando casca do pinhão em pó como reforçador de estrutura e extratos ricos em compostos antioxidantes da casca de pinhão e de própolis;
- Caracterizar os filmes ativos através de suas propriedades físicas, estruturais, morfológicas, térmicas, solubilidade e resistência à permeação;
- Quantificar os compostos fenólicos totais, o potencial antioxidante (DPPH<sup>\*</sup> e FRAP) e a migração dos compostos ativos nos filmes ativos;
- Avaliar a biodegradabilidade dos filmes ativos à base de farinha da amêndoa de pinhão;

- Avaliar o desempenho dos filmes ativos com adição de extrato antioxidante de casca de pinhão e própolis na conservação de hambúrgueres bovinos, avaliando-se os parâmetros de estabilidade oxidativa (manutenção da cor, oxidação lipídica e proteica).

## CAPÍTULO 6 – EMBALAGENS ATIVAS À BASE DE GELATINA CONTENDO EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO E PRÓPOLIS PARA INIBIR A OXIDAÇÃO LIPÍDICA E PROTEICA EM HAMBÚRGUERES BOVINOS ARMAZENADOS A FRIO

- Desenvolver filmes ativos pelo método *casting* à base de gelatina, utilizando casca do pinhão como reforçador, e extratos ricos em compostos antioxidantes da casca de pinhão e de própolis;
- Caracterizar os filmes ativos através de suas propriedades físicas, estruturais, morfológicas, térmicas, solubilidade e resistência à permeação;
- Quantificar os compostos fenólicos totais e o potencial antioxidante (DPPH<sup>•</sup> e FRAP), e a migração dos compostos ativos nos filmes ativos;
- Avaliar a biodegradabilidade dos filmes ativos à base de gelatina;
- Avaliar o desempenho dos filmes ativos à base de gelatina na conservação de hambúrgueres bovinos, avaliando-se os parâmetros de estabilidade oxidativa (manutenção da cor, oxidação lipídica e proteica).

## 1 CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

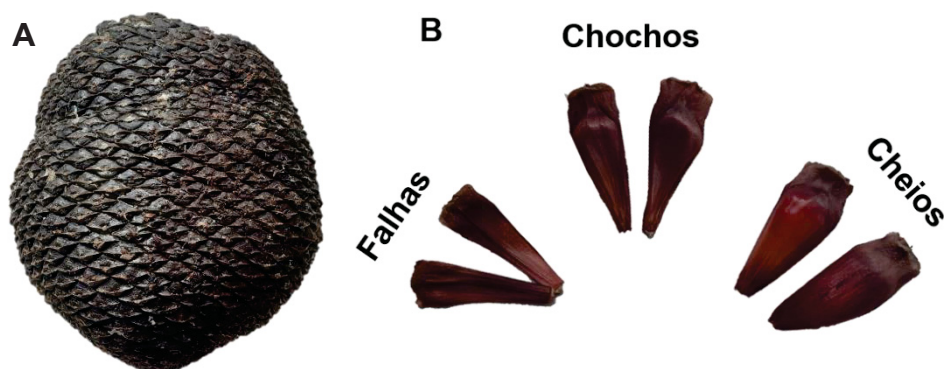
Neste tópico apresenta-se a fundamentação teórica desta tese. Os seguintes assuntos foram abordados: Araucaria e o pinhão; aproveitamento de resíduos agroindustriais; própolis; filmes ativos e biodegradáveis; ação dos filmes ativos em produtos cárneos; e oxidação lipídica e proteica em produtos cárneos.

### 1.1 ARAUCARIA E O PINHÃO

A *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze é uma conífera pertencente à família Araucariaceae, conhecida como “pinheiro do Paraná” ou “pinheiro brasileiro.” Essa espécie pode ser encontrada em países da América Latina como Brasil, Paraguai, Chile e Argentina. No Brasil, pode ser encontrada em estados da região Sudeste, mas sua maior ocorrência é nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (da Costa *et al.*, 2013; Peralta *et al.*, 2016; Santi-Gadelha *et al.*, 2006).

É uma espécie dióica, pois apresenta distinção entre árvores masculinas e femininas, fazendo-se necessário o processo de polinização para produção das sementes. Os estróbilos femininos desenvolvem-se formando as pinhas (FIGURA 1), as quais são compostas por pinhões (sementes), escamas não fertilizadas (pinhões chochos), escamas estéreis e um eixo central (Mantovani; Morellato; Reis, 2004; Michelin *et al.*, 2012). Segundo Mantovani; Morellato; Reis (2004), o ciclo reprodutivo da araucária leva cerca de 20 a 24 meses, sendo o início do ciclo caracterizado pelo aparecimento dos estróbilos e o final, pela produção de sementes.

FIGURA 1 - PINHA (A); ESTRUTURAS DE UMA PINHA (PINHÕES CHEIOS, CHOCHOS E FALHAS) (B)



FONTE: Autor (2024)

O pinhão, semente da *Araucaria angustifolia*, por apresentar uma boa qualidade sensorial, é muito apreciado na região Sul do Brasil. Esse é consumido na forma assada ou cozida, podendo ser empregado na culinária regional na preparação de pratos como farofas, entreveros e paçocas (Jorge *et al.*, 2018). Diversos estudos (TABELA 1) mostram o pinhão como uma boa fonte de carboidratos (36,28 - 82,29%) e fibra alimentar (4,89 - 15,34%), além de apresentarem quantidades consideráveis de proteínas. No entanto, aproximadamente 22% do peso da semente corresponde a casca (camadas internas e externas) (Cordenunsi *et al.*, 2004).

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA SEMENTE *IN NATURA* DA *Araucaria angustifolia*

|                        | Cordenunsi <i>et al.</i> ,<br>(2004) | Capella; Penteado; Balbi,<br>(2009) | Barreto <i>et al.</i> ,<br>(2016) | Guidolin<br>(2016) |
|------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| Umidade (%)            | 49,50                                | 51,16                               | 45,87                             | 43,47              |
| Cinzas (%)             | 1,60                                 | 2,85                                | 1,43                              | 2,41               |
| Lipídios (%)           | 1,26                                 | 7,38                                | 0,75                              | 1,23               |
| Proteína (%)           | 3,57                                 | 6,59                                | 2,79                              | 4,89               |
| Fibra alimentar<br>(%) | 4,89                                 | 15,34                               | 5,40                              | 9,18               |
| Carboidrato (%)        | 36,28                                | 67,84                               | 43,79                             | 82,29              |

FONTE: Autor (2024).

NOTA: valores em base seca (b.s.)

No ano de 2022, o estado do Paraná foi o segundo maior produtor de pinhão do Brasil, correspondendo a 30,57% da produção nacional, ficando atrás de Santa Catarina, com 34,88% (IBGE, 2023). De acordo com Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do estado do Paraná, no ano de 2022 a produção de pinhão no estado foi de 4.152,10 ton., movimentando R\$ 20.843.521,92 na economia dos produtores do estado (SEAB/DERAL, 2023). Considerando o percentual em massa que a casca do pinhão corresponde, como relatado por Cordenunsi *et al.* (2004), pode-se estimar que no ano de 2022 foi gerado em torno de 913,46 ton. de subprodutos no estado do Paraná, que é geralmente descartada no ambiente, e leva muito tempo para se decompor (Peralta *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, tem-se realizado estudos que busquem o reaproveitamento da casca de pinhão. Calvete *et al.* (2009, 2010) realizaram estudos com a utilização da casca de pinhão para produção de adsorventes, e relataram que estes são bons adsorventes alternativos para remoção de corantes. Estudos sobre a extração e encapsulação de compostos com potencial antioxidante de brácteas de pinhão vem sendo realizados e mostram que as brácteas apresentam quantidades consideráveis de compostos fenólicos, em particular taninos condensados, os quais podem ser

encapsulados com fibras e proteínas alimentares como materiais de parede que pode ser aplicado em diversas formulações alimentícias (Dorneles; Noreña, 2020a, 2020b).

O desenvolvimento e utilização de nanosuspensões de casca de pinhão, como forma de valorizar esse subproduto, também, vem sendo relatado na literatura. De Lima *et al.* (2020) mostram que a casca de pinhão pode ser utilizada para obtenção de nanosuspensão, e que a mesma pode ser empregada como fonte de alimento, exibindo efeitos benéficos, podendo reduzir níveis de colesterol e triglicerídeos ao mesmo tempo que reduz o ganho de peso corporal. Enquanto Timm *et al.* (2020) afirmam que nanosuspensão de casca de pinhão pode ser um potencial ingrediente no desenvolvimento de barras de cereais funcionais devido ao alto teor de fibras, proteínas e compostos fenólicos.

Estudos relacionados à extração e à aplicação de compostos antioxidantes oriundos da casca de pinhão também são encontrados na literatura, sendo relatados que esses extratos apresentam elevados conteúdos de taninos condensados, além de outros compostos fenólicos, principalmente catequina, epicatequina, quercetina, apigenina e rutina (de Souza *et al.*, 2020; Dorneles; Noreña, 2020a, 2020b; Freitas *et al.*, 2018; Koehnlein *et al.*, 2012; Michelon *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2014).

A utilização de extrato da casca de pinhão, atuando como substituto dos antioxidantes sintéticos, no desenvolvimento de embalagem ativa, foram relatados por Freitas *et al.* (2018) e Silva *et al.* (2019), onde ambos os autores sugerem que essas embalagens podem ser aplicadas como um material de embalagem ativo. Enquanto que De Souza *et al.* (2020) relatam que a utilização de filme a base de proteína isolada de soja incorporados com extrato de pinhão contribuem para a estabilidade oxidativa do óleo de linhaça, mostrando que esse tipo de filme pode ser uma alternativa interessante de embalagem biodegradável ativa para óleos comestíveis.

## 1.2 APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Estima-se que cerca de um terço dos alimentos produzidos no mundo para consumo humano, aproximadamente 1,3-1,6 bilhões de ton., são desperdiçados por ano, gerando grande impacto ambiental (Demichelis *et al.*, 2018; Martin-Rios *et al.*, 2018). Além disso, 72% do desperdício de alimentos é oriundo dos setores doméstico

(47 milhões de ton.) e processamento (17 milhões de ton.) (Socas-Rodríguez *et al.*, 2021).

Além dessa elevada dissipação, há também a alta geração de subprodutos de diversas indústrias agroalimentares após o processamento (vegetais, frutas, bebidas, açúcar, carne, aquicultura e produtos marinhos, marisco, etc.), que é um problema para o setor, uma vez que grande parte das agroindústrias não apresentam tratamentos adequados para tais subprodutos (Adilah; Jamilah; Nur Hanani, 2018; Nascimento Filho; Franco, 2015; Socas-Rodríguez *et al.*, 2021). Usualmente, esses subprodutos acabam sendo utilizados como matéria-prima para produção de rações animais (Socas-Rodríguez *et al.*, 2021).

Visando reduzir custos econômicos e os danos ambientais, devido ao subaproveitamento de matéria-prima, as indústrias vêm buscando realizar o máximo aproveitamento integral desses resíduos gerados. Em vista disso, vem sendo adotada, como prática sustentável e ecologicamente correta pelas indústrias, uma maior utilização dos recursos naturais, referindo-se a todas as atividades relacionadas em toda a cadeia de produção e consumo (Nascimento Filho; Franco, 2015; Papargyropoulou *et al.*, 2016).

Esses subprodutos são subutilizados pela indústria de processamento de vegetal, e podem ser aplicados para produção de energia renovável, como a produção de biogás (Demichelis *et al.*, 2018; Monteiro *et al.*, 2023) principalmente os de natureza lignocelulósica (Ravindran; Jaiswal, 2016). Estes ainda são potenciais fontes de compostos de interesse para a indústria, como carboidratos, proteínas, lipídios e compostos fenólicos, diminuindo o dano ambiental (Adilah; Jamilah; Nur Hanani, 2018). No entanto, os subprodutos de origem vegetal representam uma fonte interessante e barata de compostos potencialmente funcionais ou bioativos (Socas-Rodríguez *et al.*, 2021), os quais podem ser aproveitados através de processos químicos e biotecnológicos.

O reaproveitamento desses subprodutos oriundo, principalmente, de origem vegetal pode ser realizado de diversas formas. Algumas das maneiras de reaproveitamento mais comuns, observadas na literatura, são na obtenção de farinhas (Aranha *et al.*, 2017; Gomes *et al.*, 2022; Melo *et al.*, 2022; Souza *et al.*, 2018; Storck *et al.*, 2015), obtenção de nanosuspensões (De Lima *et al.*, 2020; Timm *et al.*, 2020), e na extração de amido (Barbi *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2022; de Melo *et al.*, 2022; Hernández-carmona; Morales-matos; Lambis-miranda, 2017; Nakthonga;

Wongsagonsup; Amornsakchai, 2017). No entanto, a extração de antioxidantes fenólicos desses resíduos é uma das formas de reaproveitamento mais realizada, pois mostra-se viável e pode resultar em substâncias utilizadas na indústria como suplementos alimentares (Bellatto; Braguini, 2020), sendo relatados diversos estudos na obtenção de extratos antimicrobianos/antioxidantes (Amariz; Lima; Alves, 2018; Bellatto; Braguini, 2020; da Nóbrega Santos *et al.*, 2023; Esparza-Martínez *et al.*, 2016; Esparza-Martínez; Miranda-López; Guzman-Maldonado, 2016; Packer *et al.*, 2015; Santana Neto *et al.*, 2022). Além disso, outros compostos possuem alto potencial de aplicação e são de interesse para a indústria de alimentos, inclusive para a indústria de filmes/embalagens e de produtos cárneos.

### 1.3 PRÓPOLIS

A própolis é uma mistura resinosa complexa de origem vegetal, sintetizada pelas abelhas a partir da coleta de diversas substâncias e usada como material de construção. Apresentando composição química complexa, com cor e consistência variada, produzida pelas abelhas a partir de diversas substâncias de origens vegetais (Dalponte Dallabona *et al.*, 2020; de Carvalho *et al.*, 2020).

A própolis é um remédio popular em todo o mundo, estando disponível à população sob diversas formas, seja em sua forma pura ou combinada com outros produtos naturais, em preparações de venda livre, cosméticos, extratos e como constituinte de alimentos saudáveis (Bankova; Trusheva; Popova, 2021). Sua composição química e cor tornam-se complexas, pois depende de características como vegetação, estação e ambiente, sendo usada como agente antisséptico e cicatrizante a milênios (Bankova; Trusheva; Popova, 2021; Silva-Carvalho; Baltazar; Almeida-Aguiar, 2015).

A própolis apresenta composição química variada, podendo conter entre 50 - 60% de resinas e bálsamos, 30 - 40% de ceras, 5 - 10% de óleos essenciais, 5% de grão de pólen e 5% de outras substâncias, como minerais e moléculas orgânicas (Lustosa *et al.*, 2008; Shamsudin *et al.*, 2019; Silva-Carvalho; Baltazar; Almeida-Aguiar, 2015). Foram identificados mais de 300 compostos na própolis, dentre eles os ácidos fenólicos, ésteres, flavonoides, terpenos, aldeídos e álcoois aromáticos, ácidos graxos, estilbenos e  $\beta$ -esteroide (Asem *et al.*, 2020; Lustosa *et al.*, 2008; Santos, *et al.*, 2019; Silva-Carvalho; Baltazar; Almeida-Aguiar, 2015).

Devido a presença de tais compostos orgânicos a própolis possui uma vasta aplicação, especialmente na área farmacêutica. Essa aplicação se dá através de diversas propriedades, como atividade antisséptica, antimicrobiana, antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória, antifúngicas, antialérgica, antiúlcera, anticancerígeno e imunomoduladora (Kamiya *et al.*, 2012; Lopez *et al.*, 2015; Pasupuleti *et al.*, 2017).

A própolis também é utilizada em alimentos e produtos, podendo atuar como potencial antioxidante natural. Segundo Nori *et al.* (2011), a aplicação da própolis em alimentos com potencial antimicrobiano e antioxidante torna-se limitada devido a extração desses compostos ser realizada em meio alcoólico, apresentando sabor e aroma acentuados. Porém, nos últimos anos, vem-se estudando a aplicação da própolis em diversos produtos com finalidades alimentícias, desde embalagens ativas (Ardjoun *et al.*, 2023; Cunha *et al.*, 2021; Eskandarinia *et al.*, 2018; Safaei; Roosta Azad, 2020; Skowron *et al.*, 2019), microencapsulação (Dalponte Dallabona *et al.*, 2020; Jansen-Alves *et al.*, 2018; 2019a; 2019b; Zhang *et al.*, 2023) e em produtos cárneos e lácteos (Reis *et al.*, 2017; Santos, M. S. *et al.*, 2019; Vargas-Sánchez *et al.*, 2019).

## 1.4 FILMES ATIVOS E BIODEGRADÁVEIS

### 1.4.1 Filmes Ativos

Os filmes e/ou revestimentos ativos e biodegradáveis, muitas vezes, também, podem ser comestíveis. Esses biopolímeros podem ser amplamente utilizados para preservação e embalagem de alimentos (Umaraw *et al.*, 2020). Esse tipo de embalagem, com adição de compostos ativos, como antioxidantes e antimicrobianos naturais, vem ganhando destaque, pois é uma das alternativas mais promissoras ao uso de recipientes tradicionais.

Por utilizarem tecnologias dinâmicas para preservar a qualidade dos alimentos, através da liberação de agentes ativos, o uso de embalagens ativas em alimentos é uma tendência (Barbosa-Pereira *et al.*, 2014). Devido a capacidade dos compostos ativos presentes migrarem para o produto alimentício, esses podem limitar ou prevenir a deterioração da qualidade, reduzir a oxidação dos alimentos, que é uma das principais causas de deterioração dos alimentos, proporcionando maior vida de prateleira (Adilah; Hanani, 2016; Barbosa-Pereira *et al.*, 2014; Barbosa *et al.*, 2022;

López-De-Dicastillo *et al.*, 2012; Piñeros-Hernandez *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2022; Sogut; Seydim, 2018).

Na literatura, observa-se que os filmes são elaborados normalmente utilizando carboidratos e proteínas como matriz e estes apresentam boas barreiras ao oxigênio, devido a capacidade desses componentes formarem as estruturas de rede ligada ao hidrogênio ordenadamente compactada. No entanto, devido à natureza hidrofílica, esses filmes, geralmente, apresentam capacidade de barreira limitada à permeabilidade ao vapor de água (Bermúdez-Oria *et al.*, 2019). Alguns estudos sobre o desenvolvimento de filmes ativos podem ser observados no QUADRO 1:

QUADRO 1 – FILMES COM ADIÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS

(continua)

| <b>Matriz do filme</b>   | <b>Composto bioativo</b>   | <b>Referência</b>                        |
|--|--|--|
| Ácido polilático   | Extrato etanólico de própolis  | (Safaei; Roosta Azad, 2020)              |
| Álcool polivinílico (PVA) e gelatina   | Extrato de folhas de amaranto  | (Kanatt, 2020)                           |
| Amido de <i>Coix lachryma-jobi</i> L.  | Óleo essencial de cravo  | (Kang; Song, 2019)                       |
| Amido de gengibre  | Fumaça líquida da casca de coco  | (Rahmasari; Yemiş, 2022)                 |
| Amido de milho   | Extrato etanólico de própolis  | (Eskandarinia <i>et al.</i> , 2018)      |
| Amido de milho   | Óleo essencial de <i>Zataria multiflora</i> e cinamaldeído               | (Amiri <i>et al.</i> , 2019)             |
| Amido de <i>Spondias purpúrea</i> L.   | Extrato de <i>Spondias purpúrea</i> L.                                   | (Rodrigues <i>et al.</i> , 2021)         |
| Amido de milho   | Óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> e extrato etanólico de própolis | (Ardjoum <i>et al.</i> , 2023)           |
| Amido termoplástico, farinha da amêndoa de pinhão e poli(butileno adipato co-tereftalato) (PBAT) | Extrato aquoso de alecrim e chá verde                                    | (Müller <i>et al.</i> , 2020)            |
| Carboximetilcelulose   | Extrato e óleo essencial de alecrim                                      | (Choulitoudi <i>et al.</i> , 2017)       |
| Carragenina semi-refinada  | Extrato de ervas malaias   | (Yahaya <i>et al.</i> , 2019)            |
| Farinha da amêndoa de pinhão e gelatina  | Casca de pinhão em pó  | (De Santana Neto <i>et al.</i> , 2024)   |
| Fécula de mandioca   | Extrato aquoso de alecrim  | (Piñeros-Hernandez <i>et al.</i> , 2017) |
| Fécula de mandioca   | Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>                          | (Silveira <i>et al.</i> , 2019)          |
| Fécula de mandioca   | Extrato de pimenta rosa  | (Laureanti <i>et al.</i> , 2021)         |
| Fécula de mandioca e poli(butileno adipato co-tereftalato) (PBAT)                                | Extrato de pinhão  | (Silva <i>et al.</i> , 2019)             |
| Gelatina bovina  | Extrato de acerola   | (Santos <i>et al.</i> , 2022)            |
| Gelatina de peixe  | Nanolipossomas de óleo essencial de canela                               | (Wu <i>et al.</i> , 2015)                |
| Gelatina de peixe  | Óleo de <i>Morinda citrifolia</i>  | (Adilah; Hanani, 2016)                   |
| Gelatina de peixe  | Extrato do caroço de manga   | (Adilah; Jamilah; Nur Hanani, 2018)      |
| Gelatina de pele de coelho   | Ácido de alecrim   | (Zhang <i>et al.</i> , 2019)             |

|   |  |                                       |
|---|--|---------------------------------------|
| Gelatina                                | Nanopartículas de óxido de zinco   | (Ahmadi; Ahmadi; Ehsani, 2020)        |
| Gelatina e amido                        | Extratos de <i>Syzygium cumini</i> e <i>Origanum vulgare</i>                           | (Barbosa <i>et al.</i> , 2022)        |
| Gelatina e zeína                        | Extrato de sálvia  | (Salević-Jelić <i>et al.</i> , 2023)  |
| Gelatina-alginato de sódio              | Extrato de casca de beterraba  | (Chaari <i>et al.</i> , 2022)         |
| Kappa-carragenina-poli(álcool vinílico) | Antocianinas de <i>Prunus domestica</i> e galato de epigalocatequina                   | (Goudarzi; Moshtaghi; Shahbazi, 2023) |
| Proteína isolada de soja                | Extrato de pinhão  | (de Souza <i>et al.</i> , 2020)       |
| Quitosana                               | Carvacrol e extrato de semente de uva  | (Rubilar <i>et al.</i> , 2013)        |
| Quitosana                               | Extrato de própolis e óleo de <i>Zataria multiflora</i> Boiss                          | (Mehdizadeh; Langroodi, 2019)         |
| Quitosana                               | Extrato etanólico de própolis e pólen  | (Skowron <i>et al.</i> , 2019)        |
| Quitosana                               | Óleo essencial de cravo e nisina   | (Venkatachalam; Lekjing, 2020)        |
| Quitosana                               | Extrato em pó da casca de noz de pinho, casca de amendoim e folha de jujuba de inverno | (Zhang <i>et al.</i> , 2020)          |
| Quitosana e gelatina                    | Extrato de casca de romã   | (Bertolo <i>et al.</i> , 2022)        |
| Quitosana, gelatina e alginato de sódio | Extrato de <i>Kadsura coccinea</i> rico em antocianinas                                | (Yan <i>et al.</i> , 2022)            |
| Whey-protein                            | Extrato de casca de noz Pecan  | (Arciello <i>et al.</i> , 2021)       |
| Zeína                                   | Extrato de pinhão  | (Freitas <i>et al.</i> , 2018)        |

FONTE: Autor (2024).

Uma alternativa para proporcionar a melhoria nessas propriedades consiste no uso de extratos e/ou óleos essenciais. Zhang *et al.* (2020) relatam que o uso de extratos das plantas pode ser benéfico para melhoria da permeabilidade ao vapor de água em filme de quitosana, sendo útil para o desenvolvimento de embalagens de atmosfera modificada ativa, como para frutas e vegetais. Adilah; Hanani (2016) e Silveira *et al.* (2019) também relataram melhorias na permeabilidade ao vapor de água em filmes à base de gelatina de peixe e de amido de mandioca com nanofibras de celulose, ao utilizarem óleo de morinda e óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.

Estudo realizado por Luchese *et al.* (2019) mostraram que filmes de amido de mandioca com incorporação de resíduos agroindustriais apresentaram propriedades mecânicas comparáveis aos filmes à base de policloreto de polivinila (PVC), que apresenta tensão de ruptura de 17,1 MPa e alongação 45%. No entanto, os filmes produzidos apresentaram valores de permeabilidade ao vapor de água superiores do filme PVC (PVA de 0,03 g.mm.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>.kPa<sup>-1</sup>).

Estudos sobre a aplicação de filmes ativos em alimentos vêm sendo amplamente relatados na literatura, em especial na preservação de produtos cárneos, mostrando-se como uma estratégia viável em proporcionar a manutenção da qualidade de produtos cárneos. Essa abordagem será melhor explicada no item 1.2.5.

#### 1.4.2 Filmes Biodegradáveis

O uso de materiais biodegradáveis de diversas fontes renováveis naturais (polissacarídeos, proteínas, lipídios e compostos) possui ampla aplicação no desenvolvimento de filmes e embalagens, mostrando-se como uma potencial alternativa de conter os efeitos negativos dos materiais tóxicos minimizando a agressão ao ambiente, atuando como potencial substituto das embalagens sintéticas (Hassan *et al.*, 2018; Parveen *et al.*, 2019; Weng; Zheng; Su, 2014).

Os filmes/embalagens ativas, em sua maioria, também, podem ser considerados como biodegradáveis. No entanto, esses devem atender os padrões técnicos normatizados pela ASTM D6400 (ASTM, 2012), que considera como biodegradável o material o qual se degrada em até 180 dias e não promove impactos às plantas e solos, devido a mineralização e a desintegração dos compostos presentes nos filmes.

Pelo fato de serem constituídos por compostos de fontes naturais, a degradação dessas embalagens no ambiente se dá devido a ação enzimática de organismos vivos (como bactérias, leveduras e fungos). Os produtos resultantes da degradação desses filmes são principalmente CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e biomassa, sob condições aeróbicas. Sob condições anaeróbicas a degradação desses filmes promove a geração de hidrocarbonetos, metano e biomassa (Jaramillo *et al.*, 2016).

#### 1.4.3 Ação dos Filmes Ativos em Produtos Cárneos

De acordo com Lorenzo; Batlle; Gómez (2014), a degradação da carne e de seus derivados provoca grandes perdas econômicas, chegando a atingir até 40% da produção na indústria de carne. Esse elevado percentual é resultado das características das carnes e seus derivados, que apresentam elevados teores de água, proteínas (aminoácidos) e lipídios (ácidos graxos). Essas características tornam a carne suscetível à contaminação microbiana, bem como à degradação química, como às reações oxidativas (lipídicas e proteicas) (Estévez; Luna, 2017; Ferreira *et al.*, 2016; Soladoye *et al.*, 2015).

Com o objetivo de prolongar a vida útil, controlar e/ou reduzir a contaminação, e proporcionar ao consumidor um produto de qualidade, estudos sobre o uso de embalagens/filmes comestíveis com propriedades antioxidantes vêm sendo

realizados em alimentos perecíveis, como os produtos cárneos (Akcan; Estévez; Serdaroğlu, 2017; Barbosa *et al.*, 2022; Gogoi *et al.*, 2019; López-De-Dicastillo *et al.*, 2012; Navikaite-Snipaitiene *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2022). Essas análises mostram que o uso dessas embalagens/filmes com princípios antioxidantes é uma das técnicas disponíveis na indústria de alimentos. O emprego desses revestimentos, filmes ou embalagens elaboradas a partir de diversas fontes renováveis naturais (polissacarídeos, proteínas, lipídios e compostos), com adição de compostos bioativos, como extratos ou óleos essenciais, para controlar/manter a qualidade de diversos produtos cárneos, tem sido amplamente estudado ao longo dos últimos anos, conforme pode ser observado no QUADRO 2

QUADRO 2 – EXEMPLOS DE FILMES COM ADIÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS EM PRODUTOS CÁRNEOS

(continua)

| Matriz do filme  | Composto bioativo                             | Quantidade  | Tipo de aplicação | Carne/Produto cárneo               | Efeitos principais no produto (comparado com o controle)   | Referência                                   |
|--|---|---|-------------------|------------------------------------|--|--|
| Alcool polivinílico (PVA) e gelatina                   | Extrato de folhas de amaranto                 | 5%  | Contato direto    | Filetes de tubarão e frango picado | Inibiu eficazmente o crescimento bacteriano e minimizou o ranço oxidativo.   | (Kanatt, 2020)                               |
| Amido de Coix <i>lachryma-jobi</i> L.                  | Óleo essencial de cravo                       | 0,5%  | Contato direto    | Barriga de porco                   | Inibiu efetivamente a oxidação lipídica na barriga de porco durante o armazenamento.   | (Kang; Song, 2019)                           |
| Amido de gengibre                                      | Fumaça líquida da casca de coco               | 5, 10, e 15%  | Contato direto    | Carne moída                        | Efeito inibitório contra <i>E. coli</i> O157:H7. Inibiu efetivamente a oxidação lipídica, e não afetou os atributos sensoriais.                                | (Rahmasari; Yemiş, 2022)                     |
| Amido de milho ceroso modificado e acetato de celulose | Óleo essencial de cravo ou eugenol            | Revestimentos AC/S/CL e AC/S/EU – 2,5;5,0;10;20 %<br>Revestimentos CA/CL e CA/EU – 7;13;23                              | Contato direto    | Carne bovina fresca                | Reduziu a oxidação lipídica e protegeu sua cor.  | (Navikaite-Snipaitiene <i>et al.</i> , 2018) |
| Carboximetilcelulose                                   | Extrato e óleo essencial de alecrim           | Concentração de extrato: 200, 500 e 600 ppm.<br>Óleo essencial: 2000 ppm<br>Combinação extrato + OE - 200 ppm + 2000ppm | Contato direto    | Enguia defumada                    | A combinação do extrato (200 ppm) com OE (2000 ppm) retardou a formação de produtos de oxidação primária e secundária, indicando possíveis efeitos sinérgicos. | (Choultoudi <i>et al.</i> , 2017)            |
| Carragenina semi-refinada                              | Extrato de <i>Persicaria minor</i>            | 0,4; 1,0 e 2,0%   | Contato direto    | Hambúrguer bovino                  | O uso de 2,0% do extrato protege contra a degradação lipídica mantem a cor.  | (Yahaya <i>et al.</i> , 2019)                |
| Copolímero de etileno e álcool vinílico                | Ácido ascórbico, ácido ferúlico, quercetina e | 5% de cada composto   | Contato direto    | Sardinha salgada                   | Reduziu a oxidação lipídica durante o tempo de armazenamento.  | (López-De-Dicastillo <i>et al.</i> , 2012)   |

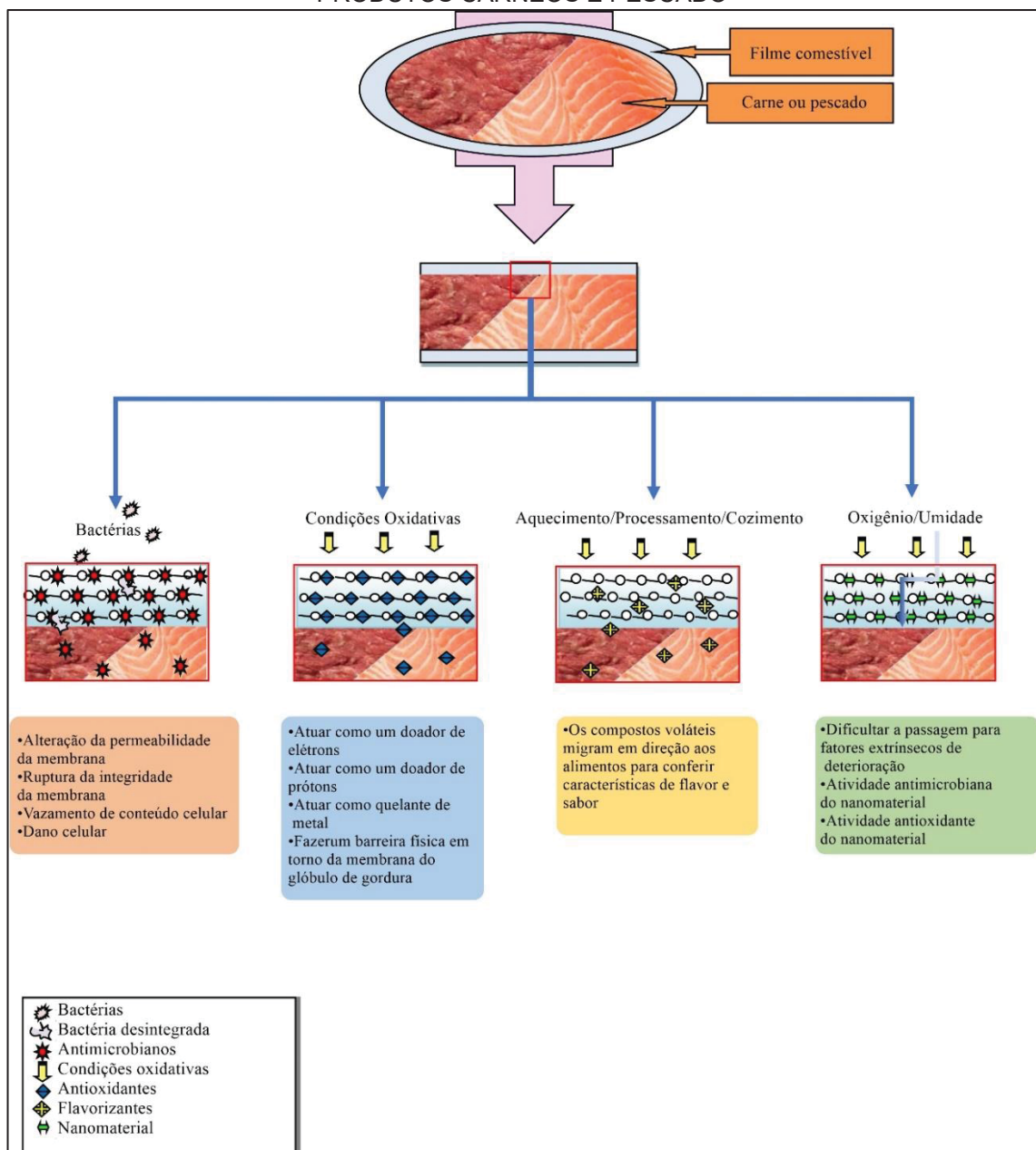
|   |  |   |                |                          |  |   |  |  |  |
|---|--|---|----------------|--------------------------|--|---|--|--|--|
|   | extrato de chá verde   |   |                |                          |  |   |  |  |  |
| Gelatina  | Nanopartículas de óxido de zinco   | 1%, 3%, 5% e 7%   | Contato direto | Filés de frango          | Redução carga bacteriana dos filés de frango.  | (Ahmadi; Ahmadi; Ehsani, 2020)              |  |  |  |
| Gelatina bovina   | Extrato de acerola   | 2, 4 e 6%   | Contato direto | Hambúrguer bovino fresco | Redução da oxidação lipídica e proteica, e promoveu estabilidade da coloração vermelha durante o armazenamento.    | (Santos <i>et al.</i> , 2022)               |  |  |  |
| Gelatina e amido  | Extratos de <i>Syzygium cumini</i> e <i>Origanum vulgare</i>                     | 5% do extrato de <i>Syzygium cumini</i> , 5% do extrato de <i>Origanum vulgare</i> , e 2,5% de extrato <i>Syzygium cumini</i> + 2,5% do extrato <i>Origanum vulgare</i> . | Contato direto | Hambúrguer de cordeiro   | Eficazes em retardar os processos oxidativos durante o armazenamento.  | (Barbosa <i>et al.</i> , 2022)              |  |  |  |
| Gelatina tipo A   | Extratos de <i>Caesalpinia decapetala</i> (CD) e <i>Caesalpinia spinosa</i> (CS) | CD: 1,0%<br>CS: 0,2%  | Contato direto | Hambúrguer bovino fresco | O filme com CS foi mais eficaz inibindo a formação de TBARS de forma mais eficaz que o antioxidante sintético BHA. | (Gallego <i>et al.</i> , 2016)              |  |  |  |
| Gelatina-alginato de sódio                                  | Extrato de casca de beterraba  | 0,25, 0,5 e 1%  | Contato direto | Carne moída crua         | Retardou a oxidação de proteínas e lipídios, estabilizou a cor da carne e desacelerar o crescimento microbiano.    | (Chaari <i>et al.</i> , 2022)               |  |  |  |
| Pectina cítrica, Gelatina da pele de peixe e cera de abelha | Hidroxitiroso e 3,4-di-hidroxifenilglicol  | 0,1–0,5%  | Contato direto | Carne de bovino          | Reduziram a oxidação lipídica.   | (Bermúdez-Oria <i>et al.</i> , 2019)        |  |  |  |
| Poli (ácido láctico)  | Extratos de palha de arroz   | 6% do extrato em pó   | Contato direto | Carne Suína              | Eficazes em inibir a oxidação, descoloração e perda de peso da carne.  | (Freitas; González-Martínez; Chiralt, 2023) |  |  |  |
| Proteína isolada de soja                                    | Óleos essenciais de tomilho (OET) e orégano (OEO)                                | 5% de OET, 5% de OEO, e 5% da mistura de óleo OET e OEO (1:1).  | Contato direto | Hambúrguer bovino fresco | Reduções na contagem de <i>Pseudomonas spp.</i> e bactérias coliformes   | (Emiroğlu <i>et al.</i> , 2010)             |  |  |  |

|                          |   |   |   |                            |   |                                     |
|--------------------------|---|---|---|----------------------------|---|-------------------------------------|
| Proteína isolada de soja | Óleos essenciais de tomilho e orégano                         | 5% de óleo essencial de tomilho e orégano                               | Contato direto                                    | Hambúrguer bovino fresco   | durante o armazenamento.  | (Kodal Coşkun <i>et al.</i> , 2014) |
| Quitosana                | Óleo essencial de cravo (OEC) e nisina                        | 6400 mg.mL <sup>-1</sup> de OEC e 204.800 IU.mL <sup>-1</sup> de nisina | Contato direto                                    | Hambúrguer suíno           | Reduziu a oxidação lipídica e protegeu a cor.   | (Venkatachalam; Lekjing, 2020)      |
| Quitosana                | Extrato da semente de uva                                     | 5, 10 e 15%   | Contato direto                                    | Filé de peito de frango    | A adição de 15% de extrato inibiu a oxidação dos filés de peito de frango e inibiram <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . | (Sogut; Seydim, 2018)               |
| Quitosana                | Óleo essencial de tomilho e manjerição                        | 0,5 e 1,0%  | Headspace para banha e contato direto com a carne | Banha e carne suína picada | Reduziu a oxidação lipídica na banha de porco. Foi eficaz no controle de crescimento microbiano na carne de porco picada.   | (Bonilla <i>et al.</i> , 2014)      |
| Quitosana                | Extrato de própolis e óleo de <i>Zataria multiflora</i> Boiss | 0,5 e 1,0%  | Contato direto por imersão                        | Carne de peito de frango   | Apresentou alto impacto antibacteriano e antioxidante bacterianas e melhorou característica química e organolépticas.   | (Mehdizadeh; Langroodi, 2019)       |
| Quitosana                | Extrato de própolis   | 0,3 e 0,6%  | Contato direto por imersão                        | Carne de lagostim          | Foi eficaz no controle do crescimento de bactérias e índices químicos.  | (Çoban, 2021)                       |
| Quitosana/Alginato       | Óleo essencial de cominho preto                               | 1%  | Contato direto                                    | Carne de frango            | Proporcionaram menor crescimento microbiano, menor variação de pH, menor alteração de cor   | (Konuk Takma; Korel, 2019)          |
| Whey protein             | Extrato de louro e extrato de sálvia                          | 2 e 4%  | Contato direto                                    | Almôndegas cozidas         | Reduziu a oxidação lipídica e hidrólise lipídica.   | (Akcan; Estévez; Serdaroglu, 2017)  |

FONTE: Autor (2024).

Filmes e revestimentos que contêm substâncias ativas conseguem promover uma maior vida útil para produtos alimentícios, entre eles as carnes e produtos cárneos (Sogut; Seydim, 2018; Umaraw *et al.*, 2020). Esses filmes possuem diversas formas de ação sobre produtos cárneos, desde barreira a oxigênio/água, com a adição de componentes que proporcione melhoras a essas propriedades, até a aplicação deste como fonte de transferência dos compostos aromáticos dos componentes ativos (FIGURA 2).

FIGURA 2 – AÇÕES DOS COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NOS FILMES ATIVOS SOBRE PRODUTOS CÁRNEOS E PESCADO



FONTE: Umaraw *et al.* (2020).

Os filmes ativos podem ser aplicados com a finalidade de ação antimicrobiana, visando melhorar a vida útil desses alimentos. Os compostos ativos presentes promovem distúrbios na integridade da membrana microbiana e dano celular, reduzindo assim o conteúdo de microrganismos e prolongando a vida útil do produto final (Emiroğlu *et al.*, 2010; Kanatt, 2020; Umaraw *et al.*, 2020). Além disso, esses compostos também possuem efeito antioxidante, que retardam/inibem os processos de oxidação dos produtos cárneos. Esse efeito antioxidante resulta na prolongação na qualidade nutricional dos produtos, uma vez que os principais nutrientes envolvidos nesse processo são as proteínas (fontes de aminoácidos) e os lipídios (fontes de ácidos graxos).

Dentre os principais compostos estudados com essas ações, estão os extratos e óleos essenciais (OEs) de plantas e/ou seus subprodutos. De acordo com Umaraw *et al.* (2020), os filmes com adição de compostos ativos, como os extratos de ervas e subprodutos vegetais, são ricos em compostos fenólicos e terpenoides, os quais tendem a retardar positivamente a proliferação microbiana e o efeito antioxidante em produtos cárneos. Esse efeito promove a migração desses compostos para os produtos, como foi observado em diversos estudos citados no QUADRO 2.

Outra forma de ação de filmes ativos é através da liberação de compostos aromáticos, pois os compostos ativos naturais, como de ervas, especiarias, plantas, resinas, etc.; conferem sabor característico, e essa presença pode ser desejável nesses produtos (Giorgio; Salgado; Mauri, 2019; Umaraw *et al.*, 2020). São empregados nesses tipos de filmes e/ou embalagens ativas, compostos aromáticos naturais, principalmente, hidrocarbonetos de cadeia curta, os quais são muito sensíveis à temperatura e ao processamento, possibilitando a migração desses compostos para o produto cárneo (Umaraw *et al.*, 2020). Alguns estudos recentes mostram o uso de filmes/embalagens com essa finalidade.

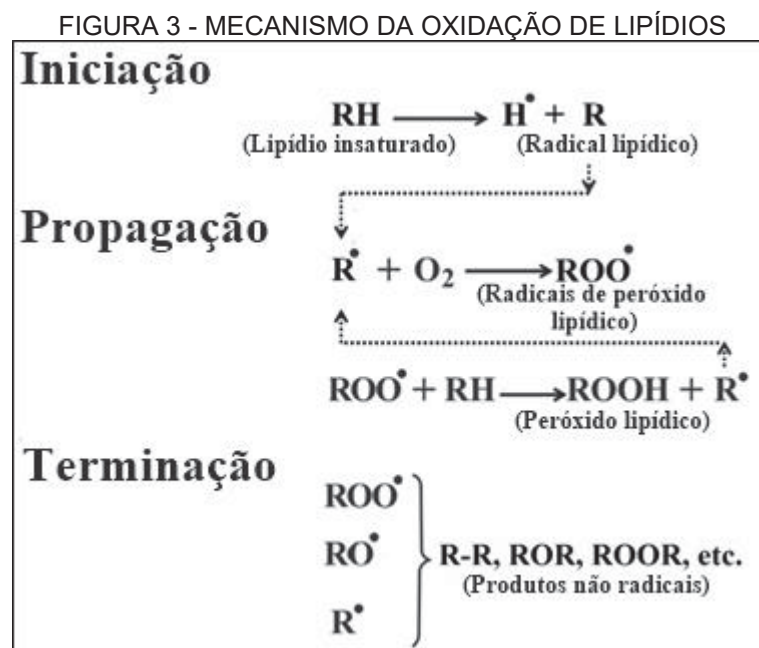
Li *et al.* (2013) realizaram o uso de revestimentos de quitosana com a adição de extrato de semente de uva ou polifenóis de chá na preservação de files de Redfish e relataram que, durante o armazenamento as amostras, em que se utilizaram revestimentos ativos, apresentaram menores taxas de deterioração da qualidade sensorial. Abdallah *et al.* (2017) em estudo utilizando revestimentos de quitosana em pastirma, mostraram que o revestindo com quitosana proporcionaram melhorias nas características sensoriais do pastirma, armazenado durante 4 semanas. Em análise

mais recente, Giorgio *et al.* (2019) desenvolveram um novo saco de forno comestível de proteína isolada de soja e gelatina bovina com a adição de *curry* em pó, e mencionaram que a embalagem produzida proporcionou sabor para a carne de frango sem afetar sua textura ou o teor de água.

### 1.5 OXIDAÇÃO LIPÍDICA E PROTEICA EM PRODUTOS CÁRNEOS

Por serem fontes ricas de nutrientes essenciais para a alimentação humana, as carnes e os derivados de origem animal apresentam elevadas taxas de oxidação. Dentre essas, podemos citar deterioração oxidativa dos lipídios e proteínas. Essas reações alteram a qualidade dos produtos cárneos durante o processamento e armazenamento, devido ao alto teor em ácidos graxos insaturados e aminoácidos (Ergezer; Serdaroğlu, 2018; Kumar *et al.*, 2015; Yahaya *et al.*, 2019).

A oxidação lipídica (LOX) é descrita como um processo complexo, consistindo em uma série de reações em cadeia de radicais, que inclui múltiplos mecanismos que interagem entre si, sendo caracterizada por três fases concomitantemente: iniciação, propagação e terminação (Kumar *et al.*, 2015). Na FIGURA 3 é representado o mecanismo da oxidação de lipídios.



FONTE: Gavahian *et al.* (2018)

Na fase de iniciação ocorre a formação do radical livre (R) por ação do oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) ou uma espécie reativa de oxigênio como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) e radical hidroxila ( $\text{OH}^{\cdot}$ ). Este radical livre gerado, pode reagir com oxigênio proporcionando estabilidade, formando radicais peróxidos livres ( $\text{R}_1\text{OO}^{\cdot}$ ), além de ocorrerem rearranjos de ligação dupla para formar dienos ou trienos conjugados, que são produtos primários da oxidação. Na etapa de terminação, esses compostos degradam-se ou reagem com outros radicais ou compostos não-radicaais, gerando produtos não-radicaais (Barriuso; Astiasarán; Ansorena, 2013; Erickson, 2002; Estévez, 2015; Estévez; Morcuende; Ventanas, 2008; Kumar *et al.*, 2015; Yahaya *et al.*, 2019).

Nos produtos cárneos, esse processo é afetado principalmente pela presença de oxigênio ou espécies reativas de oxigênio (ROS), que reagem com os ácidos graxos saturados e insaturados, através de um mecanismo de radicais livres (Estévez, 2015; Kumar *et al.*, 2015; Yahaya *et al.*, 2019). Como resultado dessa reação, são produzidos hidroperóxidos os quais são considerados os primeiros produtos de oxidação, que são facilmente decompostos em diferentes compostos orgânicos voláteis, como alcanos, alcenos, aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres e ácidos, os quais conferem sabor e odor de ranço, e alteração da cor (Cagdas; Kumcuoglu, 2015; García-Lomillo *et al.*, 2017; Yahaya *et al.*, 2019).

A oxidação das proteínas ainda é pouco estudada, comparada à oxidação lipídica. De acordo com Estévez (2011), o estudo sobre a oxidação proteica (PROTOX), em produtos cárneos, só veio a ser mais investigado a partir do início desse século, mesmo a oxidação proteica estando relacionada com a LOX, uma vez que, ambos os processos são iniciadas por ROS e vários produtos da LOX são ROS para a oxidação proteica (Estévez, 2011; Lund *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2019).

Ribeiro *et al.* (2019) relatam que a PROTOX pode ocorrer de três formas: através da modificação oxidativa do ácido acetilsalicílico, pela clivagem do peptídeo mediado por radicais livres; e pela formação da proteína de ligação transversal, resultante de reações com produtos da LOX. Além disso, segundo Lund *et al.* (2011) a PROTOX ocorre como uma reação em cadeia de radicais livres, semelhante à da LOX.

A PROTOX resulta em consequências negativas em carnes, pois há perda de nutrientes, como aminoácidos essenciais (degradação do triptofano, histidina, metionina e cisteína), resultando na diminuição da digestibilidade das proteínas, além

de promover alterações de cor e textura (Estévez, 2015; Ferreira *et al.*, 2018; Guyon; Meynier; de Lamballerie, 2016).

Como relatado, é fato de que as reações de LOX e PROTOX provocam perdas de nutrientes essenciais, afetando também o potencial tecnológico das carnes. Nos últimos anos, vem-se realizando inúmeros estudos que visam reduzir e/ou inibir os efeitos dessas reações sobre esses produtos, como na utilização de extratos e óleos essenciais na elaboração de mercadorias cárneas, sob sua aplicação diretamente sobre a superfície do item ou no uso de embalagens ativas.

## 1.6 CONSIDERAÇÕES DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Com a evolução das pesquisas, ao longo dos anos, os coprodutos e resíduos da indústria de alimentos podem ser utilizados como matérias-primas alternativas promissoras, pois possuem potencial de aplicações nas indústrias de alimentos ou farmacêutica. Esses são reaproveitados de diversas formas, promovendo a agregação de valor, e diversidade de produtos produzidos pela indústria, seja na obtenção de farinhas, extratos e óleos essenciais.

Nos últimos anos, tem intensificado os estudos desses extratos/óleos essenciais no desenvolvimento de filmes ativos, assim como estudos avaliando os efeitos de aplicação dos respectivos filmes em produtos alimentícios, especialmente produtos cárneos. Esses estudos mostraram que esse tipo de filme possibilita uma maior estabilidade desses produtos, quanto a contaminação microbiana e as reações de LOX e PROTOX.

Embora sejam observados estudos com a aplicação de filmes com extrato de própolis em produtos cárneos, na literatura não é relatado estudos de aplicação de filmes com extrato de pinhão em produtos cárneos. Logo, torna-se uma interessante sugestão avaliar a potencial aplicação de uma embalagem ativa com extrato de pinhão e extrato da própolis, e seus impactos sobre as reações LOX e PROTOX na qualidade de produtos cárneos, como no caso de hambúrgueres bovino.

## **2 CAPÍTULO 2 - EXTRATO RICO EM COMPOSTOS FENÓLICOS E ANTIOXIDANTES DA CASCA DE PINHÃO: UMA ABORDAGEM DE PROJETO EXPERIMENTAL SOBRE A OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO**

Este capítulo faz parte do artigo intitulado “Phenolic-Rich Extract from Pinhão husk: Valorization of by-products through an experimental design approach to extraction optimization.”

## EXTRATO RICO EM COMPOSTOS FENÓLICOS E ANTIOXIDANTES DA CASCA DE PINHÃO: UMA ABORDAGEM DE PROJETO EXPERIMENTAL SOBRE A OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO

**RESUMO:** A casca de pinhão é descartada no ambiente sem nenhum reuso e é considerada uma fonte de compostos com alto potencial antioxidante. Portanto, o estudo teve como objetivo otimizar o processo de extração por maceração de compostos fenólicos da casca de pinhão. Foi utilizado o método de superfície de resposta para investigar os efeitos das variáveis independentes do processo (tempo de extração ( $x_1$ ), temperatura de extração ( $x_2$ ) e concentração de etanol ( $x_3$ )) nas variáveis dependentes (compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT), taninos condensados (TC), atividade de eliminação de DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> e poder redutor antioxidante de ferro (FRAP) do extrato da casca de pinhão). O extrato otimizado ( $x_1 = 32$  min,  $x_2 = 70$  °C e  $x_3 = 42\%$ ) apresentou resultados satisfatórios em comparação com os valores previstos pelos modelos experimentais, com teores de 337,05 mg EAG.g<sup>-1</sup>, 157,37 mg EC.g<sup>-1</sup> e 12,81% para CFT, FT e TC, e 1533,31 e 1822,71 µmol ET.g<sup>-1</sup> para capacidade de eliminação de radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> e 30,32 µmol ET.g<sup>-1</sup> para FRAP. Esses resultados de pesquisa indicam que a metodologia utilizada para otimizar as condições do processo foi satisfatória e possibilitou a obtenção de um extrato com potencial para ser aplicado na indústria de alimentos como antioxidante natural.

Palavras-chave: *Araucaria angustifolia*, Subproduto, Flavonoides, Antioxidantes Naturais, Extração por Maceração, Metodologia de Superfície de Resposta.

### 2.1 INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze é uma conífera pertencente à família Araucariaceae, conhecida como “pinheiro do Paraná” ou “pinheiro brasileiro”, sendo encontrada em países da América Latina como Brasil, Paraguai, Chile e Argentina. No Brasil, sua maior ocorrência é nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e Minas Gerais (da Costa *et al.*, 2013; Dorneles; Noreña, 2020; Peralta *et al.*, 2016; Santi-Gadelha *et al.*, 2006). Sua semente é conhecida como pinhão, amplamente apreciada nas regiões Sul e Sudeste, sendo consumidos

normalmente na forma assada ou cozida, podendo ser empregado na culinária regional na preparação de pratos como farofas, entreveros e paçocas (Bellatto; Braguini, 2020; Jorge *et al.*, 2018).

No entanto, suas cascas, que correspondem em aproximadamente 22% do peso da semente, são descartadas no meio ambiente, sem qualquer reaproveitamento (Cordenunsi *et al.*, 2004; Dorneles; Noreña, 2020; Souza *et al.*, 2014). Vários estudos mostram esse material como fonte de lectina e compostos com elevado potencial antioxidante de aplicação na indústria de alimentos, sendo relatos que, também, apresentam a existência de elevados conteúdos de taninos condensados, além de outros compostos fenólicos, principalmente catequina, epicatequina, quercetina, apigenina e rutina (Cordenunsi *et al.*, 2004; Freitas *et al.*, 2018; Koehnlein *et al.*, 2012; Michelon *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2014).

Esses compostos apresentam atividade antimicrobiana significativa, principalmente contra bactérias Gram-positivas, e efeito anti-inflamatório. As proantocianidinas são as principais responsáveis pela atividade antiviral, e os biflavonóides apresentam atividade anti-herpes. Além disso, estudos indicam que o extrato aquoso da casca de pinhão possui atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *A. hydrophila*, importantes patógenos de origem alimentar. Também se observou um efeito protetor contra o dano oxidativo de lipídios, proteínas e DNA em células de fibroblastos pulmonares humanos (Cruz *et al.*, 2021; Freitas *et al.*, 2009; Santi-Gadelha *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2014; Trojaike *et al.*, 2019).

Geralmente, os compostos antioxidantes são obtidos por técnicas de extração sólido-líquido, sendo a maceração a mais comum. Este método tradicional, menos complexo, rápido, barato e com temperaturas de extração, geralmente, baixas, ainda é amplamente utilizado, especialmente por sua conveniência na extração de compostos termolábeis (Jovanović *et al.*, 2017; Uysal *et al.*, 2019). Além disso, a maceração possibilita o uso de um grande número de solventes, sendo que os solventes orgânicos como o metanol, etanol, hexano, acetona, clorofórmio, acetato de etila são comumente os mais utilizados (Casagrande *et al.*, 2019; Favareto *et al.*, 2019; Palsikowski *et al.*, 2020; Safdar *et al.*, 2017; Uysal *et al.*, 2019). Como o processo de extração para obtenção de um extrato com potencial aplicação em alimentos, o uso do etanol como solvente se torna mais adequado, por ser o solvente orgânico com menor potencial tóxico ao ser humano. Alguns dos parâmetros que influenciam na

eficiência da maceração são a escolha do solvente, temperatura de extração, razão solvente/amostra e tempo de extração (Sarraf; Beig-babaei; Naji-Tabasi, 2021; Uysal *et al.*, 2019).

Dessa forma, o uso de planejamento experimental pode permitir determinar as condições de tempo, temperatura e concentração de solvente ótimas para uma ou um conjunto de respostas selecionadas, possibilitando a redução do número de experimentos necessários (Santos *et al.*, 2018). A metodologia de superfície de resposta (MSR), com o delineamento composto central rotacional (DCCR) é uma ferramenta estatística amplamente utilizada para otimizar procedimentos de extração de compostos de interesse em plantas e frutos. O uso da MSR possibilita analisar a relação entre as variáveis independentes que podem ter impacto na eficiência da extração, como concentração e tipo de solvente, temperatura, tempo, entre outros, e as variáveis dependentes ou respostas (Alfaro *et al.*, 2014; Santana Neto *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2018).

A valorização da casca do pinhão através da recuperação de compostos com atividade antioxidante é de suma importância, dada a crescente demanda por tecnologias de extração ambientalmente conscientes. A alta concentração de compostos fenólicos na casca, aliada ao seu descarte após o processamento das sementes, ressalta a relevância de explorar este recurso de forma mais eficiente e sustentável.

Portanto, este estudo teve como objetivo otimizar as condições para a extração sólido-líquido dos compostos antioxidantes presentes na casca de pinhão utilizando a MSR, maximizando o rendimento de compostos fenólicos, flavonoides totais, taninos condensados e atividade antioxidante dos extratos.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Solventes e reagentes

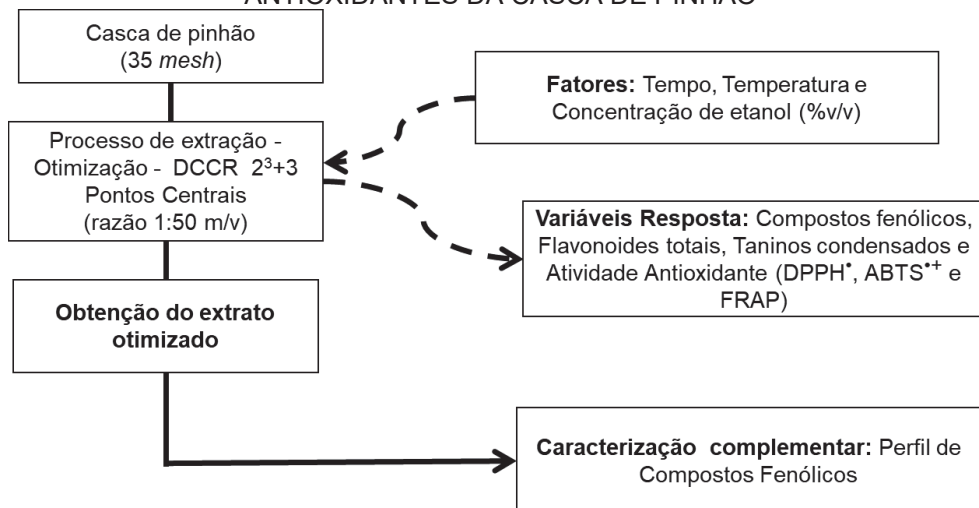
Os produtos químicos Folin-ciocalteau, 2,2'-difeníl-2-picrilhidrazil hidratado (DPPH), 2,2'-azino-bis(3etil-benzolína-6-sulfonado) (ABTS), ácido hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxil (Trolox) e 2,4,6-tris (2-píridil) - s-triazina (TPTZ), ácido gálico, catequina, cloreto de ferro (III) hexahidratado e acetonitrila foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). O ácido clorídrico, acetato de sódio trihidratado,

metanol, etanol, nitrito de sódio, carbonato de sódio anidro, hidróxido de sódio, fosfato de sódio e persulfato de potássio adquiridos da Neon (São Paulo, Brasil), o ácido acético glacial adquirido na Synth (São Paulo, Brasil), o n-butanol adquirido na Isofar (Rio de Janeiro, Brasil), o cloreto de alumínio, sulfato de ferro (III) e amônio adquiridos na Dinâmica (São Paulo, Brasil). Todos os produtos químicos usados nos experimentos são de grau analítico.

### 2.2.2 Delineamento experimental

Os pinhões foram doados pela Embrapa Florestas (Safrá 2020, coordenadas geográficas: 25°19'18.2"S, 49°09'33.7"W). A casca foi obtida após a secagem das sementes frescas em estufa a 45 °C por 48 h, separadas manualmente e então trituradas em moinho de facas e peneirado (35 *mesh*) e armazenadas em saco plástico *zip-lock* no escuro a temperatura ambiente. O extrato da casca de pinhão foi obtido a partir do processo de otimização de extração dos compostos com potencial antioxidante (FIGURA 4).

FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DA CASCA DE PINHÃO



FONTE: Autor (2024).

Visando um processo de extração simples, rápido e sem o uso de solventes tóxicos, foi utilizado o planejamento adaptado de Santana Neto *et al.* (2022), no qual são estudadas como variáveis do processo o tempo, temperatura e concentração do etanol em água, utilizando planejamento experimental fatorial  $2^3$ , com seis pontos axiais, e três repetições no ponto central, totalizando um total de 17 experimentos. O

planejamento experimental foi avaliado usando o *software* Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, EUA). As variáveis independentes da matriz experimental do processo de otimização estão dispostas na TABELA 2.

TABELA 2 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PROPOSTA PARA A EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS DA CASCA DE PINHÃO

| Valores codificados | Tempo de extração (min) <sup>a</sup> (x1) | Temperatura de extração (°C) <sup>a</sup> (x2) | Concentração do etanol (% v/v) <sup>a</sup> (x3) |
|---------------------|---|--|--|
| -α*                 | 10  | 20   | 13   |
| -1                  | 30  | 30   | 30   |
| 0                   | 60  | 45   | 55   |
| 1                   | 90  | 60   | 80   |
| +α*                 | 110                                       | 70   | 97   |

<sup>a</sup>Valores reais das variáveis independentes. \*α = 1,68

FONTE: Autor (2024).

Para a extração dos compostos antioxidantes da casca de pinhão foi utilizada uma razão massa/volume de 1:50 e homogeneizados por 5 min. A mistura foi então incubada em banho-maria (SL-154/10-4, Solab, Piracicaba, Brasil) seguindo o tempo de extração e temperatura descritos na matriz do desenho experimental (TABELA 2). Após as extrações, os extratos foram filtrados em papel de filtro qualitativo (80 g.m<sup>-2</sup>) sob vácuo, e os filtrados recolhidos e congelados (-20 °C) até a realização das análises.

A influência das três variáveis independentes ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ) nos conteúdos de compostos com potencial antioxidante dos extratos foi investigada usando um DCCR. Os dados experimentais obtidos foram ajustados ao seguinte modelo polinomial de segunda ordem (Equação 1):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{Eq. 1})$$

$Y$  = variável resposta,  $\beta_0$  = constante,  $\beta_i$  = coeficiente linear dos efeitos,  $\beta_{ii}$  = coeficiente quadrático dos efeitos,  $\beta_{ij}$  = coeficiente da interação entre os efeitos,  $X_i$  e  $X_j$  = aos níveis codificados das variáveis independentes ( $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$ ).

Para a determinação das condições ótimas do processo de extração, foram utilizadas como variáveis de resposta os conteúdos de compostos fenólicos, flavonoides totais, taninos condensados, a atividade antioxidante in vitro pelas técnicas de captura dos radicais livres DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> e pelo poder antioxidante de

redução do ferro (FRAP). Para validação da condição ótima, foi realizada uma nova extração, e o extrato foi igualmente caracterizado.

### 2.2.3 Caracterização dos extratos

#### 2.2.3.1 Compostos fenólicos totais (CFT)

Os compostos fenólicos foram determinados, conforme Waterhouse (2002), com modificações. Os extratos foram diluídos (1:10 v/v) nas soluções extratoras. Em seguida, tomou-se alíquotas de 50 µL dos extratos e adicionou-se em tubos de 10 mL, e acrescidas de 1.950 µL de água destilada e 150 µL de Folin-Ciocalteu (2 M), submetidos a agitação e repouso por 5 min protegidos de luz. Em seguida adicionados de 350 µL de solução aquosa de carbonato de sódio 20% e submetidos à agitação e incubados em banho-maria (Warmnest, HH-S14, Brasil) a 40 °C por 30 min. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro VIS a 765 nm (Q898DPT, Quimis, São Paulo, Brasil) e o resultado calculado com o auxílio de uma curva padrão de ácido gálico (5 - 25 µg.mL<sup>-1</sup>) em mg EAG.g<sup>-1</sup> da amostra seca.

#### 2.2.3.2 Flavonoides totais (FT)

O conteúdo de flavonoides totais foi determinado de acordo com o método proposto por Arriola *et al.* (2014). Os extratos foram diluídos (1:20 v/v) nas respectivas soluções extratoras. Em seguida, tomou-se alíquotas de 1.000 µL, os extratos foram homogeneizados com 300 µL de NaNO<sub>2</sub> 5% e encubados no escuro por 5 min. Em seguida foram adicionados 300 µL de AlCl<sub>3</sub> 10%, e incubados no escuro durante 6 min, acrescidas de 2.000 µL de NaOH 1 M e homogeneizadas em vortex. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro VIS a 425 nm (Q898DPT, Quimis, São Paulo, Brasil), e o resultado foi estimado empregando-se curva padrão catequina (10 - 250 µg.mL<sup>-1</sup>) em mg EC.g<sup>-1</sup> da amostra seca.

#### 2.2.3.3 Taninos condensados (TC)

O conteúdo de taninos condensados foi realizado através do método de hidrólise ácida em alta temperatura, utilizando-se a mistura butanol-HCl adaptado

Porter; Hrstich; Chan (1985). Os extratos foram diluídos (1:20 v/v) nas respectivas soluções extratoras. Foram utilizadas alíquotas de 500 µL dos extratos e adicionados de 3.000 µL da mistura butanol-HCl (95:5 v/v) e 100 µL de reagente férrico (NH<sub>4</sub>)Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O 2% em HCl 2 M), homogeneizados em vórtex e incubados a 95 °C em banho-maria (Warmnest, HH-S14, Brasil) por 40 min. As leituras foram realizadas a 550 nm em espectrofotômetro VIS (Q898DPT, Quimis, São Paulo, Brasil), e os resultados expressos em porcentagem de taninos condensados em equivalente leucocianidina (Equação 2).

$$\%TC = \frac{A_{550} \times 78,26 \times F}{\%M.S} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde,

%TC – Porcentagem de taninos condensados em equivalente leucocianidina

A<sub>550</sub> – Absorbância da amostra a 550 nm

F – Fator de diluição na medição espectrofotométrica

%M.S – Porcentagem de matéria seca da amostra

#### 2.2.3.4 Atividade antioxidante *in vitro*

##### 2.2.3.4.1 Captura do radical livre DPPH\*

A capacidade de captura do radical DPPH\* foi realizada conforme proposto por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995). Os extratos foram diluídos (1:40 v/v) nas respectivas soluções extratoras. Em seguida, alíquotas de 50 µL dos extratos foram adicionadas em tubos com 1.950 µL de solução etanólica de DPPH\* (0,06 mM), homogeneizadas em vórtex e incubada por 30 min ao abrigo de luz. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro VIS a 517 nm (Q898DPT, Quimis, São Paulo, Brasil), o resultado final calculado com base na curva de calibração preparada com diferentes concentrações de Trolox (50 - 1000 µmol.L<sup>-1</sup>) e expressos em µmol ET.g<sup>-1</sup> de amostra seca.

#### 2.2.3.4.2 Captura do radical livre ABTS<sup>•+</sup>

A capacidade de captura do radical ABTS<sup>•+</sup> foi realizada conforme proposto por Re *et al.* (1999). O radical ABTS<sup>•+</sup> foi elaborado pela reação de 10 mL da solução ABTS 7mM em tampão acetato de sódio (20 mM, pH 4,5) com 176 µL de persulfato de potássio 140 mM em tampão acetato de sódio (20 mM, pH 4,5) incubados à temperatura de 25 °C em ambiente escuro por 16 h. Uma vez formado, o radical foi diluído com tampão acetato de sódio 20 mM até a obtenção do valor de absorvância de  $0,700 \pm 0,050$  a 734 nm. Os extratos foram diluídos (1:20 v/v) nas respectivas soluções extratoras. Em seguida, alíquotas de 30 µL dos extratos foram adicionadas em tubos com 3,0 mL de solução ABTS<sup>•+</sup>, homogeneizadas em vórtex e incubadas por 2 h ao abrigo de luz. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro VIS a 734 nm (Q898DPT, Quimis, São Paulo, Brasil) e o resultado final calculado com base na curva de calibração preparada com diferentes concentrações de Trolox (100 - 2500 µmol.L<sup>-1</sup>), e expressos em µmol ET.g<sup>-1</sup> de amostra seca.

#### 2.2.3.4.3 Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)

O poder antioxidante redutor férrico (FRAP) dos extratos foi avaliado conforme descrito por Benzie; Strain (1996). Os extratos foram diluídos (1:50 v/v) nas respectivas soluções extratoras. Em seguida, alíquotas de 100 µL dos extratos foram adicionadas em tubos com 3400 µL de solução de FRAP (mistura de tampão acetato de sódio (300 mM, pH 3,6), 10 mM de 2, 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) em 40 mM HCl e solução de cloreto férrico 20 mM, em proporção 10:1:1 v/v) e forma incubados a 37 °C em banho-maria durante 30 min. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro VIS a 593 nm (Q898DPT, Quimis, São Paulo, Brasil), expressos em µmol de equivalente Trolox.g<sup>-1</sup> de amostra seca e calculado com base em uma curva de calibração preparada com diferentes concentrações de solução de Trolox (2,0 - 21,0 µmol.L<sup>-1</sup>).

#### 2.2.4 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média (n = 4) ± desvio padrão (DP). O modelo da equação foi

ajustado aos dados experimentais para obtenção dos modelos propostos. Gráficos de superfície de resposta e parâmetros de desejabilidade foram gerados para as funções de resposta. Para explorar a relação entre as respostas obtidas em cada condição experimental, o teste de Spearman foi usado para determinar as correlações entre os dados. A análise estatística dos resultados foi realizada pela análise de variância (ANOVA  $p \leq 0,05$ ) e as médias estatisticamente diferentes foram analisadas pelo teste de Tukey para análise *post hoc*.

Os modelos propostos foram validados com a realização de novos testes na condição ótima em triplicata, com as médias de cada tratamento, e os resultados comparados com as respostas estimadas pela análise de variância (ANOVA) pelo teste t de Student ( $p \leq 0,05$ ). Toda a análise estatística do modelo foi realizada usando o Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, EUA).

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Otimização da extração de compostos antioxidantes

Os efeitos do tempo ( $X_1$ ), temperatura ( $X_2$ ) e concentração de etanol ( $X_3$ ) na extração sólido-líquido dos teores de CFT ( $Y_1$ ), FT ( $Y_2$ ), TC ( $Y_3$ ) e na atividade antioxidante da casca de pinhão, conforme avaliados pelos ensaios DPPH<sup>•</sup> ( $Y_4$ ), ABTS<sup>•+</sup> ( $Y_5$ ) e FRAP ( $Y_6$ ), demonstraram diferenças significativas (TABELA 3). Um maior tempo (90 min) e temperatura (60°C), juntamente com uma menor concentração de etanol (30% v/v), foram eficazes para as variáveis CFT e DPPH<sup>•</sup>. Da mesma forma, uma maior temperatura (60°C) e menor concentração de etanol (30% v/v), mas em um menor tempo (30 min) foram mais eficazes para ABTS<sup>•+</sup> e FRAP. No entanto, uma menor temperatura e uma maior concentração de etanol favoreceram a extração de TC (30 min e 45°C, 55% e 80% de etanol) e FT (45°C e 55% de etanol). As concentrações de etanol de 97% e 13% foram menos eficazes para a extração dos compostos da casca do pinhão.

Os valores de  $Y_1$  variaram de 223,19 a 318,92 mg EAG.g<sup>-1</sup>,  $Y_2$  entre 92,01 e 149,90 mg EC.g<sup>-1</sup>, enquanto  $Y_3$  variou entre 7,23 e 12,20%. Foi observado variação quanto a capacidade antioxidante dos extratos em relação à atividade do  $Y_4$  entre 957,01 e 1524,04  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$ , e  $Y_5$  entre 1131,20 e 1689,62  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$ . O valor de  $Y_6$  obtidos variaram entre 24,70 e 39,67  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$ . De acordo com os resultados,

pode-se considerar o ponto de maior extração para as variáveis  $Y_1$ ,  $Y_4$ ,  $Y_5$  e  $Y_6$  correspondem ao ensaio 7 ( $X_1 = 90$  min.,  $X_2 = 60$  °C e  $X_3 = 30\%$  de etanol) com valores (318,92 mg EAG.g<sup>-1</sup>, 1524,04 µmol ET.g<sup>-1</sup>, 1621,07 µmol ET.g<sup>-1</sup> e 39,32 µmol ET.g<sup>-1</sup>, respectivamente), apresentando considerável extração para as variáveis  $Y_2$  e  $Y_3$  (141,19 mg EC.g<sup>-1</sup> e 10,78%) Do mesmo modo, o ensaio 14 teve os menores resultados para as variáveis  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_4$ ,  $Y_5$  e  $Y_6$  (223,19 mg EAG.g<sup>-1</sup>, 92,05 mg EC.g<sup>-1</sup>, 957,01 µmol ET.g<sup>-1</sup>, 1131,20 µmol ET.g<sup>-1</sup> e 24,70 µmol ET.g<sup>-1</sup>, respectivamente), enquanto o ensaio 13 apresentou menor valor para  $Y_3$  (7,23%).

TABELA 3 - NÍVEIS E RESULTADOS DAS VARIÁVEIS RESPOSTAS DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO DA CASCA DE PINHÃO

| Experimento | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | Y <sub>1</sub>                | Y <sub>2</sub>             | Y <sub>3</sub>              | Y <sub>4</sub>                  | Y <sub>5</sub>                 | Y <sub>6</sub>              |
|-------------|----------------|----------------|----------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 1           | -1 (30)        | -1 (30)        | -1 (30)        | 273,24 <sup>cd</sup> ±12,07   | 121,01 <sup>e</sup> ±1,15  | 9,09 <sup>f</sup> ±0,34     | 1223,61 <sup>defg</sup> ±59,66  | 1423,76 <sup>def</sup> ±71,13  | 35,35 <sup>abcd</sup> ±1,58 |
| 2           | -1 (30)        | -1 (30)        | +1 (80)        | 251,69 <sup>f</sup> ±6,72     | 110,93 <sup>gf</sup> ±0,68 | 11,66 <sup>abc</sup> ±0,61  | 1195,55 <sup>defg</sup> ±107,12 | 1355,64 <sup>def</sup> ±51,70  | 30,74 <sup>de</sup> ±1,26   |
| 3           | -1 (30)        | +1 (60)        | -1 (30)        | 310,71 <sup>a</sup> ±10,73    | 136,05 <sup>d</sup> ±0,54  | 10,30 <sup>de</sup> ±0,58   | 1388,78 <sup>abc</sup> ±72,51   | 1689,62 <sup>a</sup> ±10,56    | 39,67 <sup>a</sup> ±1,28    |
| 4           | -1 (30)        | +1 (60)        | +1 (80)        | 278,53 <sup>bcde</sup> ±11,49 | 121,55 <sup>e</sup> ±0,90  | 12,20 <sup>f</sup> ±0,63    | 1210,65 <sup>defg</sup> ±82,80  | 1392,52 <sup>def</sup> ±53,28  | 31,86 <sup>bcde</sup> ±1,40 |
| 5           | +1 (90)        | -1 (30)        | -1 (30)        | 278,89 <sup>bcde</sup> ±10,51 | 114,40 <sup>±1</sup> ,69   | 9,72 <sup>ef</sup> ±0,83    | 1294,97 <sup>bcdef</sup> ±31,20 | 1486,97 <sup>cd</sup> ±18,36   | 35,18 <sup>abcd</sup> ±2,32 |
| 6           | +1 (90)        | -1 (30)        | +1 (80)        | 272,28 <sup>cd</sup> ±9,14    | 113,35 <sup>±2</sup> ,58   | 12,13 <sup>ab</sup> ±0,30   | 1155,88 <sup>fg</sup> ±44,93    | 1331,72 <sup>ef</sup> ±62,13   | 30,93 <sup>cde</sup> ±1,25  |
| 7           | +1 (90)        | +1 (60)        | -1 (30)        | 318,92 <sup>a</sup> ±4,29     | 141,19 <sup>bc</sup> ±2,03 | 10,78 <sup>cde</sup> ±0,71  | 1524,04 <sup>a</sup> ±53,35     | 1621,07 <sup>abc</sup> ±127,41 | 39,32 <sup>a</sup> ±2,44    |
| 8           | +1 (90)        | +1 (60)        | +1 (80)        | 259,17 <sup>ef</sup> ±6,15    | 105,62 <sup>h</sup> ±2,73  | 10,82 <sup>cde</sup> ±0,57  | 1129,52 <sup>g</sup> ±13,34     | 1302,30 <sup>±52</sup> ,13     | 28,74 <sup>ef</sup> ±1,30   |
| 9           | -α (10)        | 0 (45)         | 0 (55)         | 302,42 <sup>ab</sup> ±6,56    | 119,63 <sup>e</sup> ±1,85  | 11,36 <sup>abcd</sup> ±0,18 | 1286,13 <sup>bcdef</sup> ±47,69 | 1642,40 <sup>ab</sup> ±59,60   | 34,95 <sup>abcd</sup> ±1,21 |
| 10          | +α (110)       | 0 (45)         | 0 (55)         | 283,05 <sup>bcde</sup> ±13,39 | 138,84 <sup>cd</sup> ±0,63 | 11,51 <sup>abcd</sup> ±0,41 | 1325,80 <sup>bcde</sup> ±60,35  | 1605,29 <sup>abc</sup> ±59,88  | 34,10 <sup>bcd</sup> ±1,80  |
| 11          | 0 (60)         | -α (20)        | 0 (55)         | 267,78 <sup>def</sup> ±3,37   | 123,91 <sup>e</sup> ±0,84  | 10,91 <sup>bcde</sup> ±0,13 | 1240,52 <sup>cdefg</sup> ±48,90 | 1429,62 <sup>def</sup> ±55,95  | 32,07 <sup>bcde</sup> ±0,19 |
| 12          | 0 (60)         | +α (70)        | 0 (55)         | 293,13 <sup>abcd</sup> ±6,00  | 143,83 <sup>b</sup> ±0,45  | 11,67 <sup>abc</sup> ±0,73  | 1341,17 <sup>bcd</sup> ±63,62   | 1489,04 <sup>cd</sup> ±61,00   | 35,84 <sup>abc</sup> ±0,26  |
| 13          | 0 (60)         | 0 (45)         | -α (13)        | 282,80 <sup>bcde</sup> ±4,94  | 106,51 <sup>gh</sup> ±1,00 | 7,23 <sup>g</sup> ±0,18     | 1178,05 <sup>efg</sup> ±33,85   | 1480,10 <sup>cde</sup> ±33,51  | 31,37 <sup>cde</sup> ±5,87  |
| 14          | 0 (60)         | 0 (45)         | +α (97)        | 223,19 <sup>±5</sup> ,49      | 92,15 <sup>±2</sup> ,02    | 11,01 <sup>abcd</sup> ±0,18 | 957,01 <sup>h</sup> ±78,33      | 1131,20 <sup>g</sup> ±45,12    | 24,70 <sup>±0</sup> ,81     |
| 15          | 0 (60)         | 0 (45)         | 0 (55)         | 293,02 <sup>abcd</sup> ±12,10 | 149,90 <sup>a</sup> ±3,80  | 11,19 <sup>abcd</sup> ±0,25 | 1259,97 <sup>cdefg</sup> ±45,77 | 1474,57 <sup>cde</sup> ±53,93  | 35,92 <sup>abc</sup> ±0,94  |
| 16          | 0 (60)         | 0 (45)         | 0 (55)         | 292,81 <sup>abcd</sup> ±19,78 | 149,75 <sup>a</sup> ±2,37  | 12,08 <sup>ab</sup> ±0,25   | 1434,13 <sup>ab</sup> ±50,77    | 1591,34 <sup>abc</sup> ±69,72  | 34,85 <sup>abcd</sup> ±0,88 |
| 17          | 0 (60)         | 0 (45)         | 0 (55)         | 297,72 <sup>abc</sup> ±17,05  | 141,19 <sup>bc</sup> ±1,46 | 11,82 <sup>abc</sup> ±0,47  | 1319,84 <sup>bcde</sup> ±13,11  | 1492,91 <sup>bcd</sup> ±38,85  | 36,55 <sup>ab</sup> ±1,07   |

X<sub>1</sub> – Tempo de extração; X<sub>2</sub> – Temperatura; X<sub>3</sub> – Concentração de etanol; Y<sub>1</sub> - CFT; Y<sub>2</sub> – FT; Y<sub>3</sub> – TC; Y<sub>4</sub> – Captura do radical livre DPPH; Y<sub>5</sub> – Captura do radical livre ABTS<sup>•+</sup>; Y<sub>6</sub> - FRAP.

Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam uma diferença significativa entre as amostras pelo teste de Tukey (p < 0,05).

FONTE: Autor (2024).

A temperatura e a concentração de etanol são os fatores que mais influenciaram no conteúdo das variáveis estudadas (TABELA 4). Ambos os aspectos possuem termos lineares significativos ( $p < 0,05$ ). A temperatura ( $\beta_2$ ) possui maior influência sobre as variáveis  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_5$ , enquanto a concentração de etanol ( $\beta_3$ ) influencia todas as variáveis.

TABELA 4 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO E ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA VARIÁVEIS DE RESPOSTAS

| <b>Coefficientes</b>           | <b>Y<sub>1</sub></b> | <b>Y<sub>2</sub></b> | <b>Y<sub>3</sub></b> | <b>Y<sub>4</sub></b> | <b>Y<sub>5</sub></b> | <b>Y<sub>6</sub></b> |
|--------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <b>Modelo</b>                  |                      |                      |                      |                      |                      |                      |
| <b><math>\beta_0</math></b>    | 294,118*             | 146,861*             | 11,675*              | 1334,693*            | 1520,193*            | 35,642*              |
| <b>Linear</b>                  |                      |                      |                      |                      |                      |                      |
| <b><math>\beta_1</math></b>    | -1,282               | 1,268                | 0,003                | 11,170               | -13,319              | -0,357               |
| <b><math>\beta_2</math></b>    | 9,801*               | 5,727*               | 0,203                | 40,437               | 37,150*              | 1,004                |
| <b><math>\beta_3</math></b>    | -16,133*             | -6,251*              | 0,973*               | -81,390*             | -104,419*            | -2,815*              |
| <b>Quadrático</b>              |                      |                      |                      |                      |                      |                      |
| <b><math>\beta_{11}</math></b> | 0,744                | -5,975               | -0,027               | 0,004                | 34,842*              | 0,007                |
| <b><math>\beta_{22}</math></b> | -3,597               | -4,337               | -0,080               | -5,344               | -23,322              | -0,194               |
| <b><math>\beta_{33}</math></b> | -13,305*             | -16,549*             | -0,846*              | -84,296*             | -77,655*             | -2,287*              |
| <b>Interações</b>              |                      |                      |                      |                      |                      |                      |
| <b><math>\beta_{12}</math></b> | -4,674               | -0,825               | -0,249               | 2,804                | -24,759              | -0,434               |
| <b><math>\beta_{13}</math></b> | -1,581               | -1,504               | -0,253               | -40,927              | -13,599              | -0,300               |
| <b><math>\beta_{23}</math></b> | -7,972*              | -4,867               | -0,380*              | -50,686              | -49,062*             | -1,192               |
| <b>ANOVA</b>                   |                      |                      |                      |                      |                      |                      |
| <b>R<sup>2</sup></b>           | 0,925                | 0,915                | 0,950                | 0,892                | 0,961                | 0,899                |
| <b>R<sup>2</sup>Adj</b>        | 0,830                | 0,807                | 0,887                | 0,754                | 0,911                | 0,770                |
| <b>F<sub>tab</sub></b>         | 3,68                 | 3,68                 | 3,68                 | 3,68                 | 3,68                 | 3,68                 |
| <b>F<sub>cal</sub></b>         | 9,69                 | 8,47                 | 15,00                | 6,45                 | 19,28                | 6,97                 |
| <b>p<sub>lack of fit</sub></b> | 0,059941             | 0,284238             | 0,628885             | 0,859643             | 0,919969             | 0,155865             |
| <b>p-valor</b>                 | 0,0033851*           | 0,0050715*           | 0,0008652*           | 0,0112184*           | 0,0003846*           | 0,0089801*           |

Y<sub>1</sub> - CFT; Y<sub>2</sub> - FT; Y<sub>3</sub> - TC; Y<sub>4</sub> - Captura do radical livre DPPH\*; Y<sub>5</sub> - Captura do radical livre ABTS\*\*; Y<sub>6</sub> - FRAP.

$\beta_0$  - Intercepto;  $\beta_1$  - coeficiente linear do tempo de extração;  $\beta_2$  - coeficiente linear da temperatura de extração;  $\beta_3$  - coeficiente linear da concentração de etanol;  $\beta_{11}$  = coeficiente quadrático do tempo de extração;  $\beta_{22}$  = coeficiente quadrático da temperatura de extração;  $\beta_{33}$  = coeficiente quadrático da concentração de etanol;  $\beta_{12}$  = coeficiente da interação entre o tempo e temperatura de extração;  $\beta_{13}$  = coeficiente da interação entre o tempo de extração e a concentração de etanol; e  $\beta_{23}$  = coeficiente da interação entre a temperatura de extração e a concentração de etanol.

F<sub>cal</sub> - Razão entre o quadrado médio da regressão e o quadrado médio dos resíduos; F<sub>tab</sub> - Tabelado para o teste de Fisher usando o nível de significância e graus de liberdade.

\* Significância estatística (p-valor) relatada como  $p < 0,05$ .

FONTE: Autor (2024).

Foi observado que o tempo de extração apresentou efeito quadrático significativo ( $p < 0,05$ ) para  $Y_2$  e  $Y_5$ . O termo quadrático da concentração de etanol se mostrou significativo para todas as variáveis estudadas ( $p < 0,05$ ). No entanto, com exceção do termo quadrático do tempo de extração ( $\beta_{11}$ ) para  $Y_5$ , todos os demais valores foram negativos, ou seja, maiores concentrações de etanol resultaram em menores valores de ABTS<sup>•+</sup>, como observado no ensaio 14. A interação entre a temperatura de extração  $\times$  concentração de etanol também foi significativa e negativa ( $p < 0,05$ ) ( $Y_1$ ,  $Y_3$  e  $Y_5$ ). Essa interação resulta em redução no processo de extração desses compostos presentes na casca de pinhão.

Dessa forma, as Equações 3-8 representam as equações polinomiais de segunda ordem para  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ ,  $Y_4$ ,  $Y_5$  e  $Y_6$  contendo apenas os termos estatisticamente significativos:

$$Y_1 = 294,118 + 9,801x_2 - 16,133x_3 - 13,305x_3^2 - 7,972x_2x_3 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$Y_2 = 146,681 + 5,727x_2 - 6,251x_3 - 5,975x_1^2 - 16,549x_3^2 \quad (\text{Eq. 4})$$

$$Y_3 = 11,675 + 0,973x_3 - 0,845x_3^2 - 0,380x_2x_3 \quad (\text{Eq. 5})$$

$$Y_4 = 1334,693 - 81,390x_3 - 84,296x_3^2 \quad (\text{Eq. 6})$$

$$Y_5 = 1520,193 + 37,150x_2 - 104,419x_3 + 34,842x_1^2 - 77,655x_3^2 - 49,062x_2x_3 \quad (\text{Eq. 7})$$

$$Y_6 = 35,642 - 2,815x_3 - 2,287x_3^2 \quad (\text{Eq. 8})$$

A partir da correlação de Spearman observou-se que dentre as respostas estudadas  $Y_3$  não apresentou correlação com nenhuma das variáveis avaliadas ( $p > 0,05$ ) (TABELA 5). Todas as correlações significativas observadas foram positivas. Foi observado correlação muito forte entre  $Y_1$  e  $Y_5$  ( $r_s = 0,907$ ). Foi observada forte correlação entre  $Y_1$  com  $Y_4$  e  $Y_6$  ( $r_s = 0,828$  e  $0,860$ );  $Y_2$  com  $Y_4$  e  $Y_6$  ( $r_s = 0,821$  e  $0,760$ ), entre  $Y_4$  com  $Y_5$  e  $Y_6$  ( $r_s = 0,885$  e  $0,821$ ) e entre  $Y_5$  e  $Y_6$  ( $r_s = 0,762$ ). Além disso, uma correlação positiva moderada entre  $Y_1$  e  $Y_2$  ( $r_s = 0,699$ ) e entre  $Y_2$  e  $Y_5$  ( $r_s = 0,615$ ) foi observada.

TABELA 5 - COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN ( $r_s$ ) ENTRE AS VARIÁVEIS

|                | Y <sub>2</sub> | Y <sub>3</sub>       | Y <sub>4</sub>      | Y <sub>5</sub>       | Y <sub>6</sub>       |
|----------------|----------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| Y <sub>1</sub> | 0,699***       | -0,020 <sup>ns</sup> | 0,828***            | 0,907***             | 0,860***             |
| Y <sub>2</sub> | 1,000          | 0,287 <sup>ns</sup>  | 0,821***            | 0,615***             | 0,760***             |
| Y <sub>3</sub> | -              | 1,000                | 0,047 <sup>ns</sup> | -0,100 <sup>ns</sup> | -0,167 <sup>ns</sup> |
| Y <sub>4</sub> | -              | -                    | 1,000               | 0,885***             | 0,821***             |
| Y <sub>5</sub> | -              | -                    | -                   | 1,000                | 0,762***             |

Y<sub>1</sub> - CFT; Y<sub>2</sub> - FT; Y<sub>3</sub> - TC; Y<sub>4</sub> - Captura do radical livre DPPH<sup>•</sup>; Y<sub>5</sub> - Captura do radical livre ABTS<sup>•+</sup>; Y<sub>6</sub> - FRAP.

Significância estatística (p-valor) relatada como: ns. Não significativo e \*\*\* para  $p < 0,001$ .

FONTE: Autor (2024).

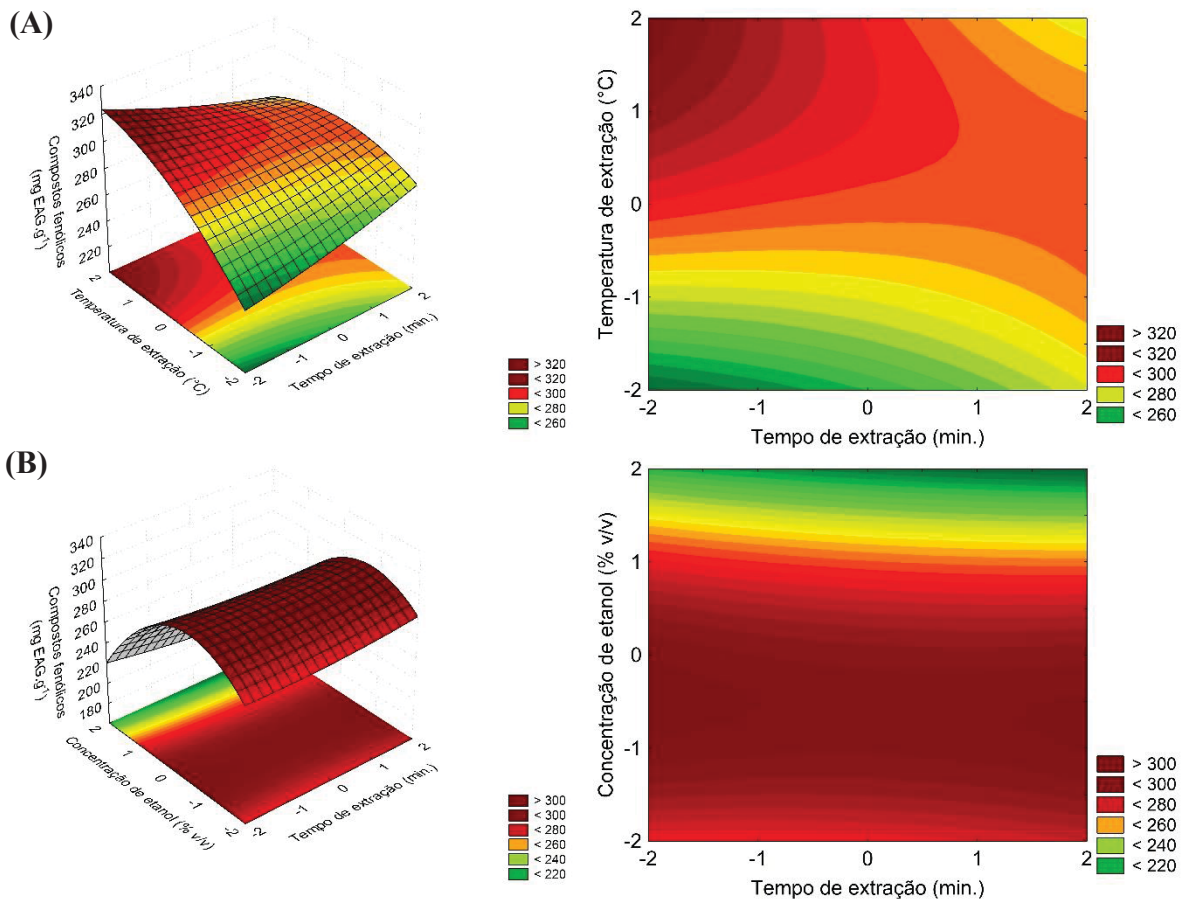
A forte correlação entre CFT, FT e a atividade antioxidante evidencia que os compostos fenólicos, bem como os flavonoides presentes na casca de pinhão possuem elevado potencial de eliminação de radicais. As menores correlações de Y<sub>6</sub> e Y<sub>1</sub> em comparação com Y<sub>4</sub> e Y<sub>5</sub>, e de Y<sub>6</sub> com Y<sub>2</sub> em comparação com Y<sub>4</sub>, sugerem que os extratos obtidos possuem uma melhor propriedade de transferência de átomos de hidrogênio nos compostos fenólicos e flavonoides em comparação com a propriedade de transferência de elétrons (Ou *et al.*, 2002; Rout; Kumar; Rao, 2021).

A partir das Equação 3-8, foram geradas as superfícies de resposta (FIGURAS 5 e 6). Para o de Y<sub>1</sub> (FIG. 5A-C) se observa uma zona de máxima extração com valores entre 300 e 320 mg EAG.g<sup>-1</sup>, quando x<sub>2</sub> tende aos maiores valores (60-70 °C), enquanto x<sub>3</sub> apresentou maior efeito sobre a extração dos compostos fenólicos, de modo que os maiores valores de compostos fenólicos se mostraram entre 30-50% de etanol. Os valores obtidos em todos os ensaios foram maiores que o observado na literatura. Dorneles; Noreña (2020) obtiveram valor máximo de CFT de 47,61 mgTAE.g<sup>-1</sup> em extratos de brácteas de pinhão por extração assistida por micro-ondas. Sant'Anna *et al.* (2016) obtiveram valores de CFT entre 25,03 e 51,37 mg.EAG.g<sup>-1</sup> em extratos aquosos de casca de pinhão crua e cozida, enquanto Souza *et al.* (2014) observaram valores de CFT de 15,86 mg EAG.g<sup>-1</sup> em extrato aquoso de brácteas de pinhão. Esses valores foram similares ou maiores do que os observados por Fonseca *et al.* (2020), que obtiveram valor de CFT de 225.32 mg.g<sup>-1</sup> em extrato aquoso da casca de pinhão. Cordenunsi *et al.* (2004) obtiveram maiores teores de compostos fenólicos em extrato metanólico da casca de pinhão (345 mg EC.g<sup>-1</sup>).

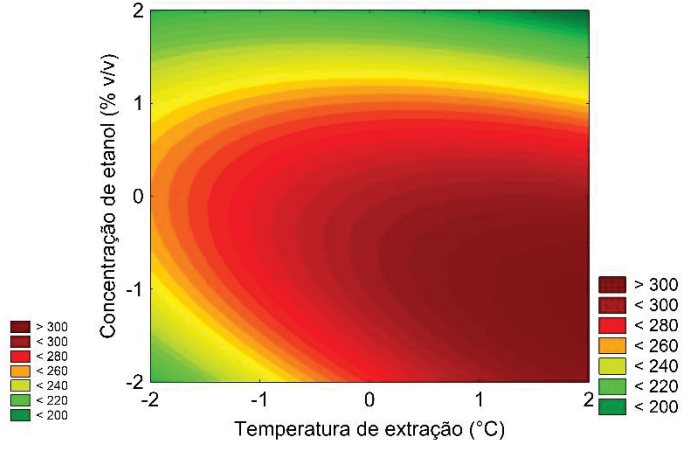
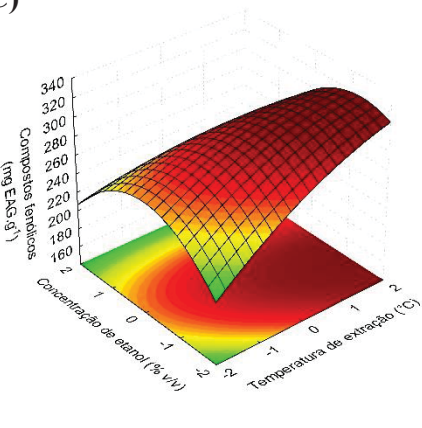
As variáveis que apresentaram maior impacto para os valores de Y<sub>2</sub> foram a concentração de etanol (%) e a temperatura de extração (°C) (FIG. 5D-F). A variável Y<sub>2</sub> apresentou região ótima (Y<sub>2</sub> próximo de 150 mg EC.g<sup>-1</sup>) quando x<sub>1</sub> está entre 40-60 min, x<sub>2</sub> entre 50-70 °C e x<sub>3</sub> entre 40-60% de etanol. Os maiores valores de Y<sub>3</sub> são

observados numa faixa de  $x_3$  entre 30-60% de etanol, que foi o fator que mais influenciou em seu conteúdo. Além disso, valores de  $x_2$  próximos de 60-70 °C proporcionam a maior extração de taninos condensados da casca de pinhão (FIG. 5G-I). Os taninos condensados ou proantocianidinas, são um grupo de bioflavonóides polifenólicos de ocorrência natural, especificamente sob a forma de oligômeros ou polímeros de poliidroxiflavan-3-ol, como (+)-catequina e (-)-epicatequina e flavan-3,4-dióis, como leucoantocianidinas ou uma mistura dos dois, e possuem atividades biológicas benéficas à saúde, atuando como antioxidantes e anti-inflamatórios (Alara; Abdurahman; Olalere, 2020; Kumari; Jain, 2012; Shadkami; Estevez; Helleur, 2009).

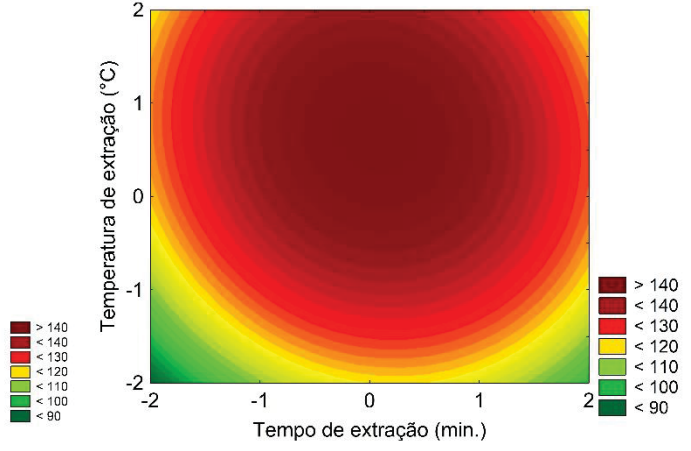
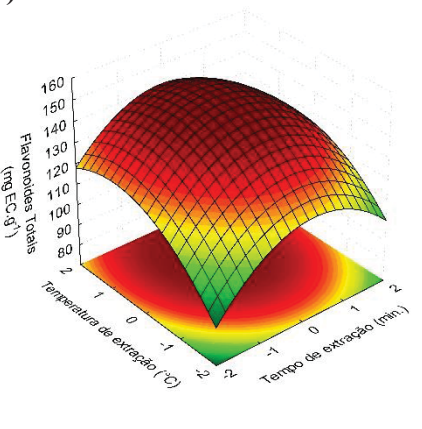
FIGURA 5 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA QUE ILUSTRAM OS EFEITOS INTERATIVOS DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO PARA AS VARIÁVEIS: COMPOSTOS FENÓLICOS ( $Y_1$ ) (A–C), FLAVONOIDES TOTAIS ( $Y_2$ ) (D–F) E TANINOS CONDENSADOS ( $Y_3$ ) (G–I)



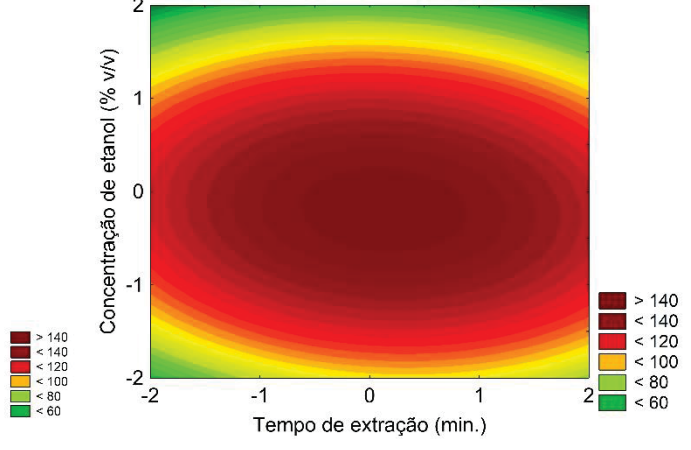
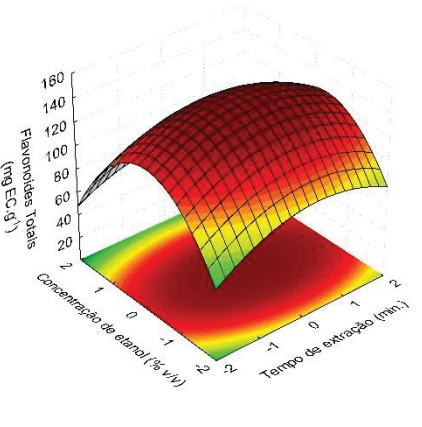
(C)



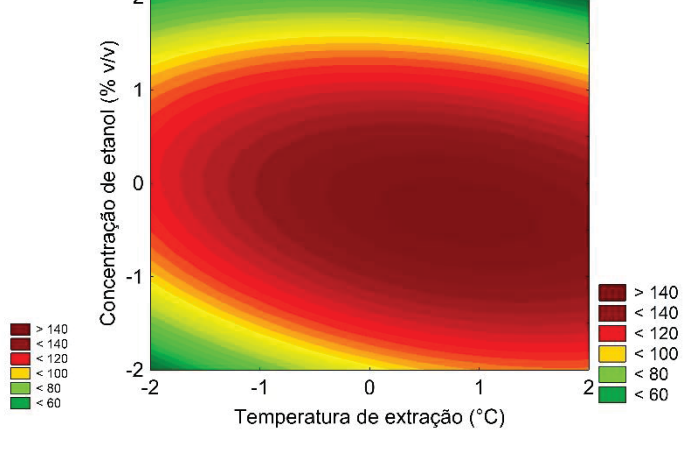
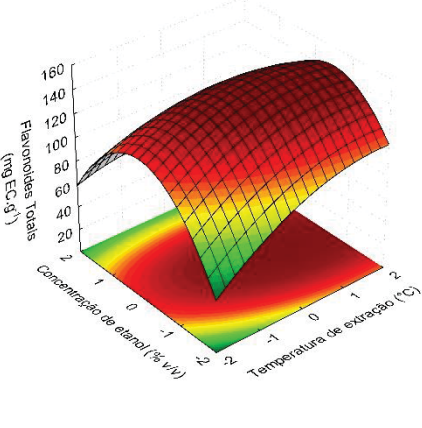
(D)

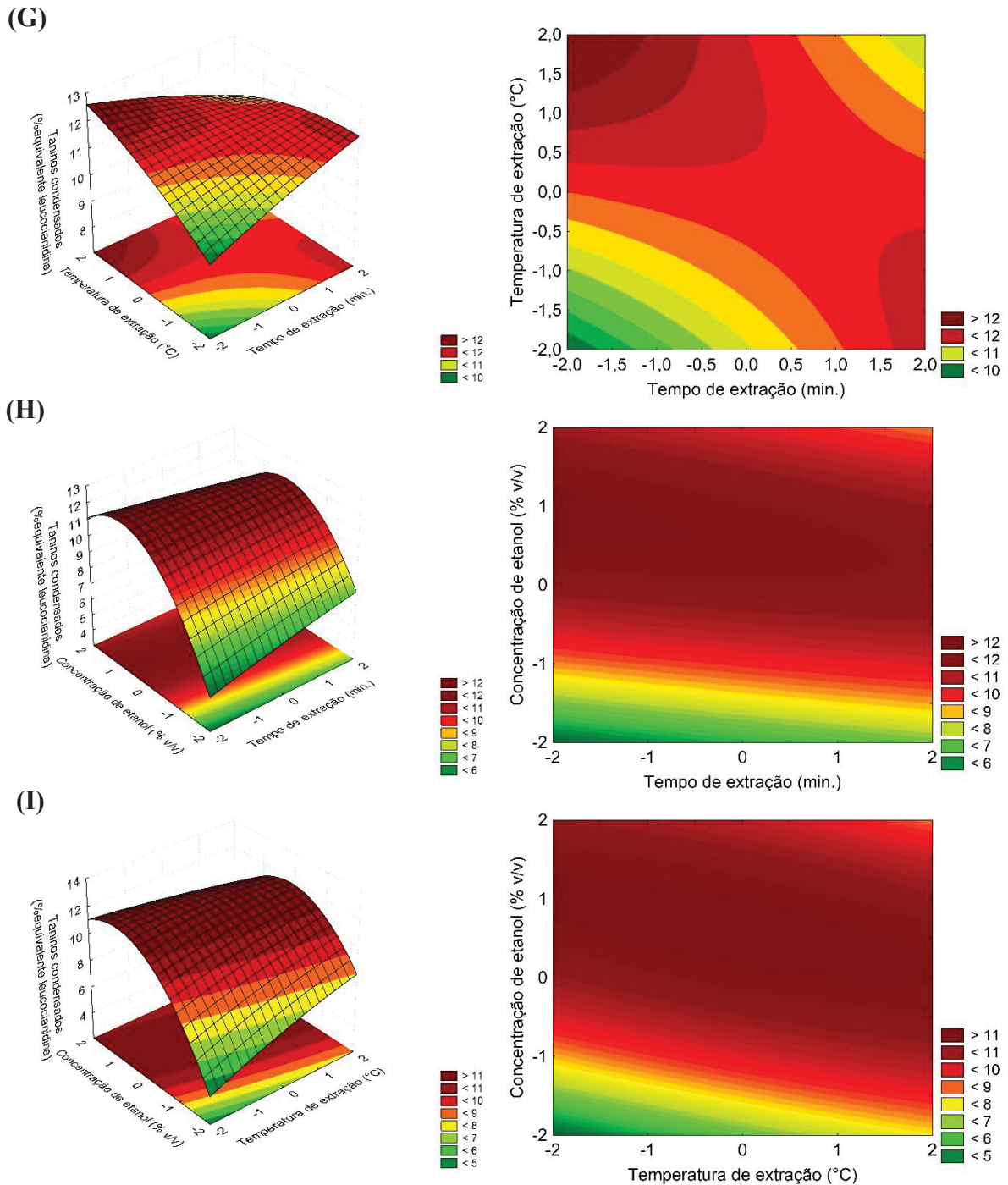


(E)



(F)





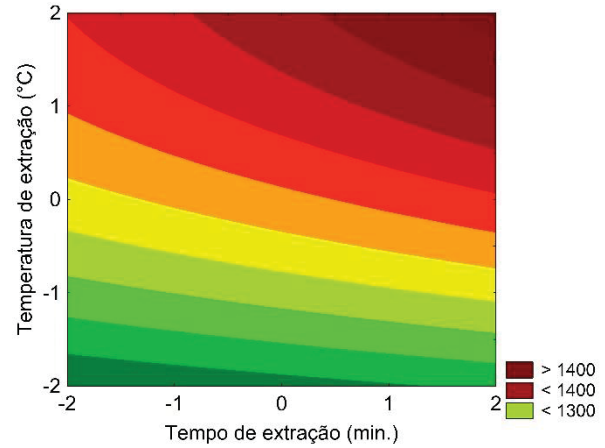
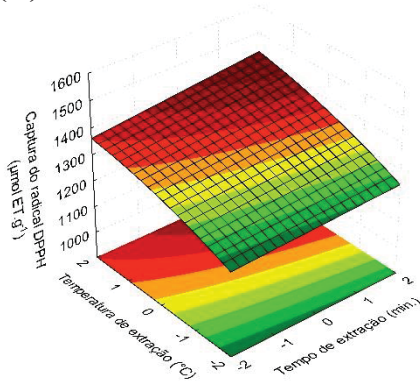
FONTE: Autor (2024).

De acordo com as superfícies de resposta, as variáveis respostas  $Y_4$  e  $Y_6$  apresentaram comportamento similar (FIG. 6A-C, FIG. 6G-I), onde o fator  $x_1$  não apresenta influência significativa para os resultados obtidos (TABELA 3). Para  $Y_4$ , maiores valores de  $X_2$  (60-70 °C), em conjunto com valores de  $X_3$ , entre 30-50% de etanol, intensificam as propriedades antioxidantes dos extratos obtidos. Nessas faixas de valores, os conteúdos de  $Y_4$  e  $Y_6$  são próximos de 1500  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$  e 38  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$ , respectivamente. O maior teor de  $Y_5$  foi observado nos extratos em que se

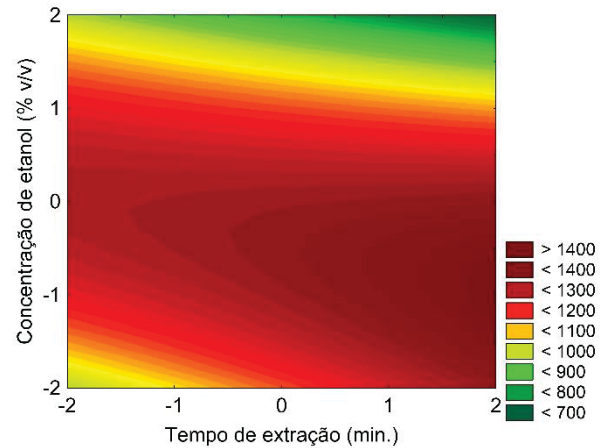
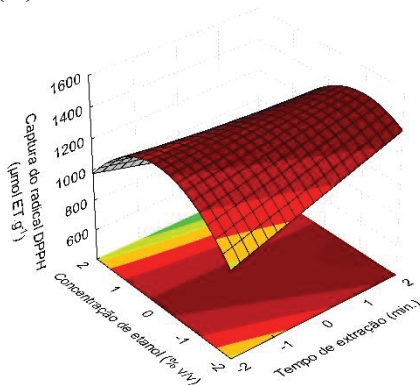
empregou os menores ou maiores tempos de extração ( $X_1$ ), temperaturas de extração ( $X_2$ ) em torno de 60-70 °C e concentração de 30-50% de etanol ( $X_3$ ), sendo observados valores próximos de 1700  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$  (FIGURAS 6D-F).

FIGURA 6 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA QUE ILUSTRAM OS EFEITOS INTERATIVOS DE DIFERENTES PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: DPPH $\cdot$  ( $Y_4$ ) (A–C), ABTS $^{+\cdot}$  (D–F) ( $Y_5$ ) E FRAP ( $Y_6$ ) (G–I)

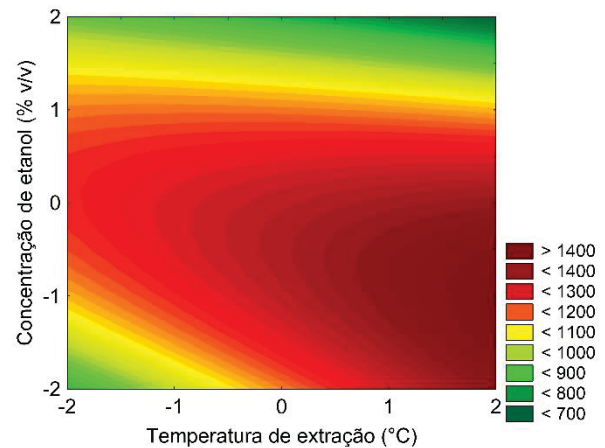
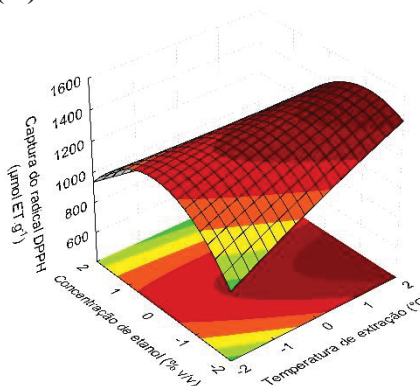
(A)



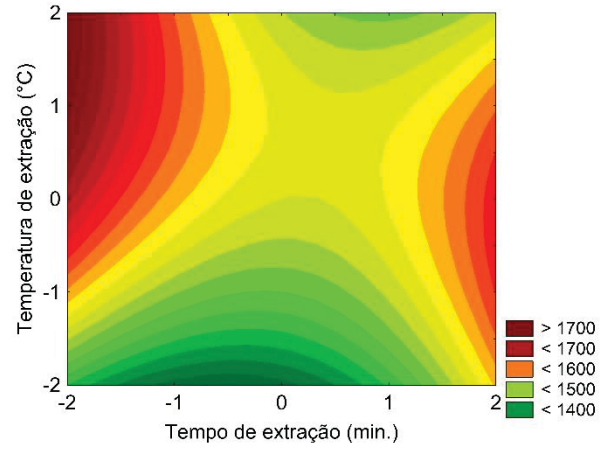
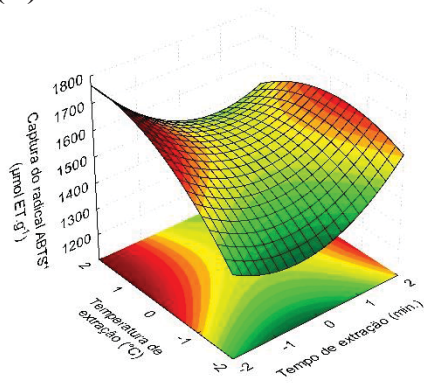
(B)



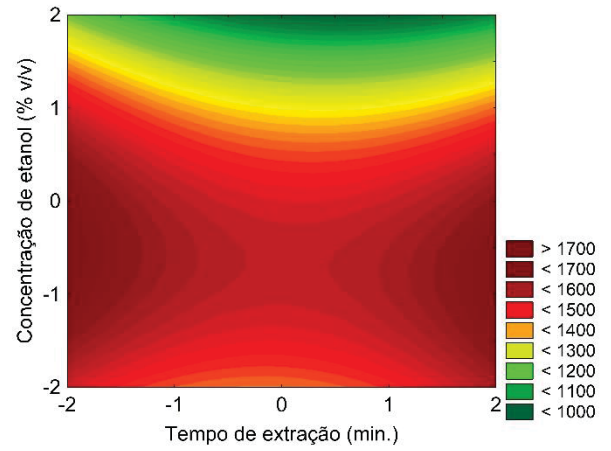
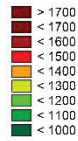
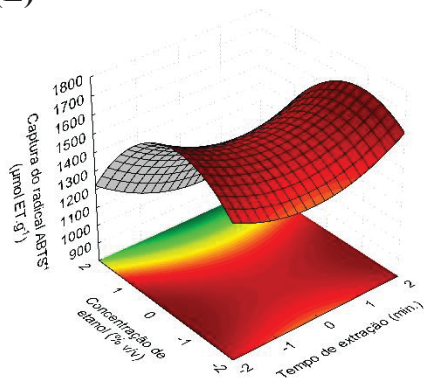
(C)



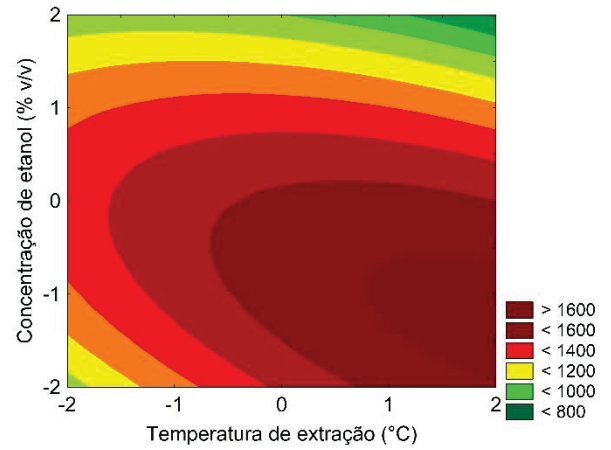
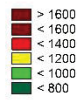
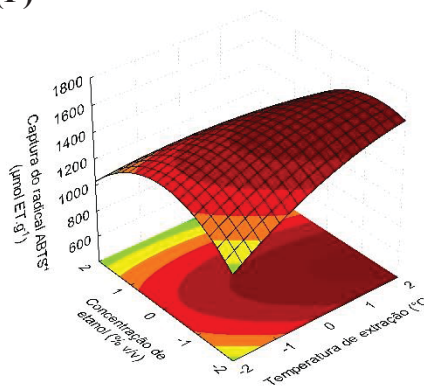
(D)



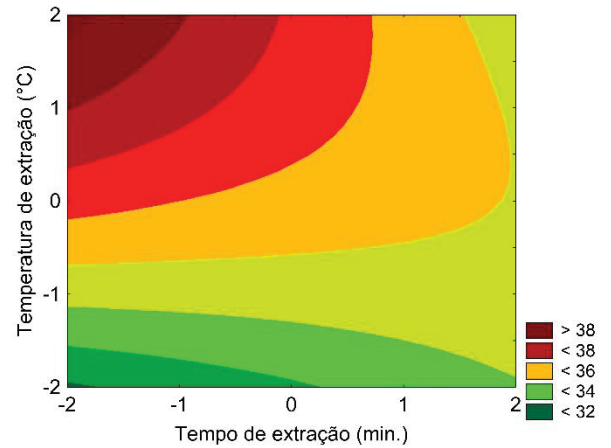
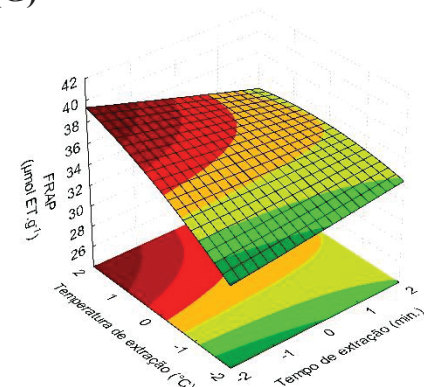
(E)



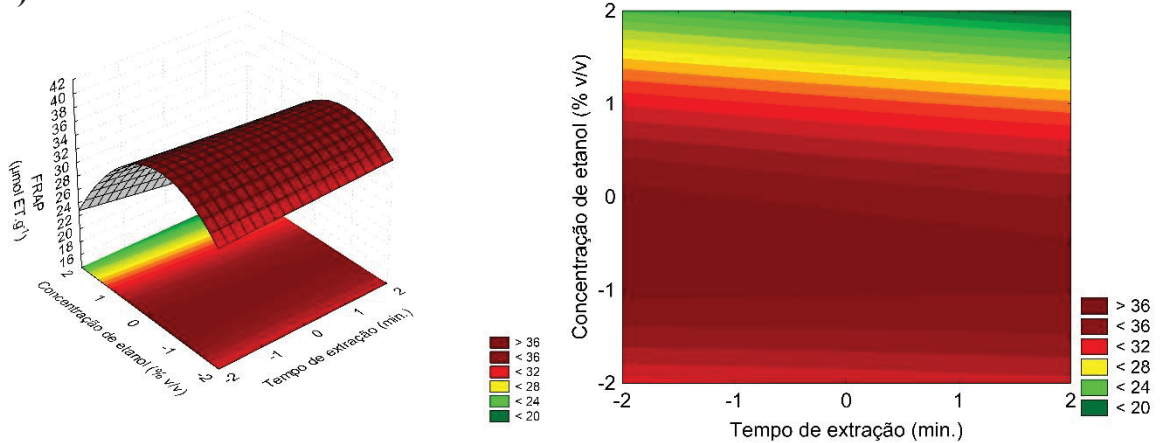
(F)



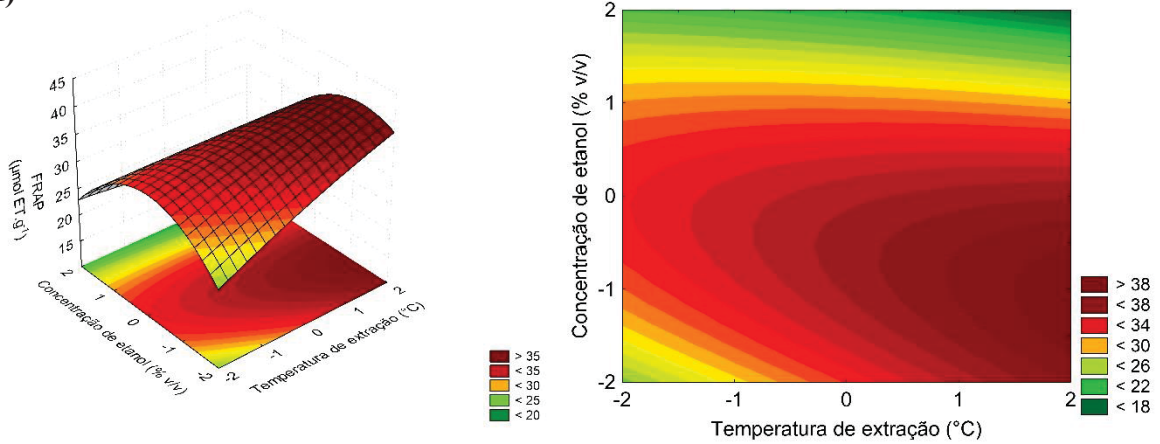
(G)



(H)



(I)



FONTE: Autor (2024).

Os valores obtidos para  $Y_4$  e  $Y_5$ , em todos os ensaios, foram maiores que o observado por Dorneles; Noreña (2020), que obteve valor máximo de 467,79 e 427,28  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$  para capacidade de eliminação de radical DPPH<sup>\*</sup> e ABTS<sup>\*\*</sup> em extratos de brácteas de pinhão por extração assistida por micro-ondas. Os resultados também se mostraram superiores os relatados por Freitas *et al.* (2018), que obtiveram valores entre 8,62 e 11,78  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$  para atividade antioxidante DPPH<sup>\*</sup>, de 26,4 a 54,64  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$  para atividade antioxidante ABTS<sup>\*\*</sup> e de 2,09 a 8,29  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$  para FRAP em extratos etanólico, hidroetanólico e na água de cocção do pinhão.

De modo geral, pode-se considerar através das superfícies de resposta que valores de  $X_1$  entre 40-60 min,  $X_2$  entre 50-70 °C e  $X_3$  entre 40-60% de etanol promovem a obtenção de um extrato com elevados valores de  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ ,  $Y_4$ ,  $Y_5$  e  $Y_6$ . Esses resultados mostram que o planejamento experimental utilizado para otimizar as condições de extração apresenta resultados satisfatório, comparado com a literatura.

Todas as variáveis independentes tiveram influência sobre as variáveis de resposta, sendo que o tempo de extração foi o fator que teve menor impacto. Esse

fato pode ser atribuído à possível saturação rápida da solução extratora, devido à combinação do uso do etanol como solvente e aumento de temperatura que podem reduzir o tempo de extração (Okiyama *et al.*, 2018; Santana Neto *et al.*, 2022).

Os compostos fenólicos são constituídos por várias classes de substâncias, como os flavonoides e taninos, que possuem elevado potencial antioxidante. Devido a variedade em sua composição, esses compostos possuem diferentes condições de extração. O emprego de temperaturas mais elevadas (50-70 °C) e concentrações intermediárias da solução extratora (40-60% de etanol) resultaram em maior extração desses compostos. Ao utilizar temperaturas mais elevadas, pode ocorrer a ruptura da parede celular da matriz, como resultado de interações enfraquecidas e redução da afinidade do sólido com o soluto, além do aumento da solubilidade e difusividade de compostos fenólicos (Palsikowski *et al.*, 2020; Santana Neto *et al.*, 2022; Zardo *et al.*, 2019). Além disso, intensifica a penetração do solvente na matriz sólida, o que facilita a taxa de transferência de massa de compostos fenólicos da matriz para o solvente (Gogoi *et al.*, 2019).

A adição de água ao etanol, a níveis de 40-60%, melhorou a taxa de extração. A presença de água na solução extratora pode promover o inchaço da matriz, aumentando sua área de superfície de contato entre o solvente e a matriz da planta (Chew *et al.*, 2011). O etanol, nessa faixa de concentração, é um meio moderadamente polar e possui um caráter mais hidrofílico tornando-o um solvente com seletividade bastante baixa. Dessa forma, à medida que a concentração de etanol aumenta, a constante dielétrica do solvente diminui, levando ao aumento da solubilidade e à difusão aprimorada de compostos polifenólicos, permitindo uma separação mais fácil das compostos presentes na casca de pinhão (Jovanović *et al.*, 2017; Mrkonjić *et al.*, 2021). Possivelmente, os compostos fenólicos presentes na casca de pinhão possuem maior afinidade por solventes de polaridade intermediária, mostrando que concentrações de etanol entre 40-60% podem ser indicadas para uma extração eficiente de compostos fenólicos da casca de pinhão.

### 2.3.2 Ajuste do modelo

Os dados referentes às variáveis dependentes foram ajustados a uma equação de segunda ordem (Equação 2) em função das variáveis independentes. A análise estatística desses dados foi realizada em níveis de confiança de 95% ( $p \leq$

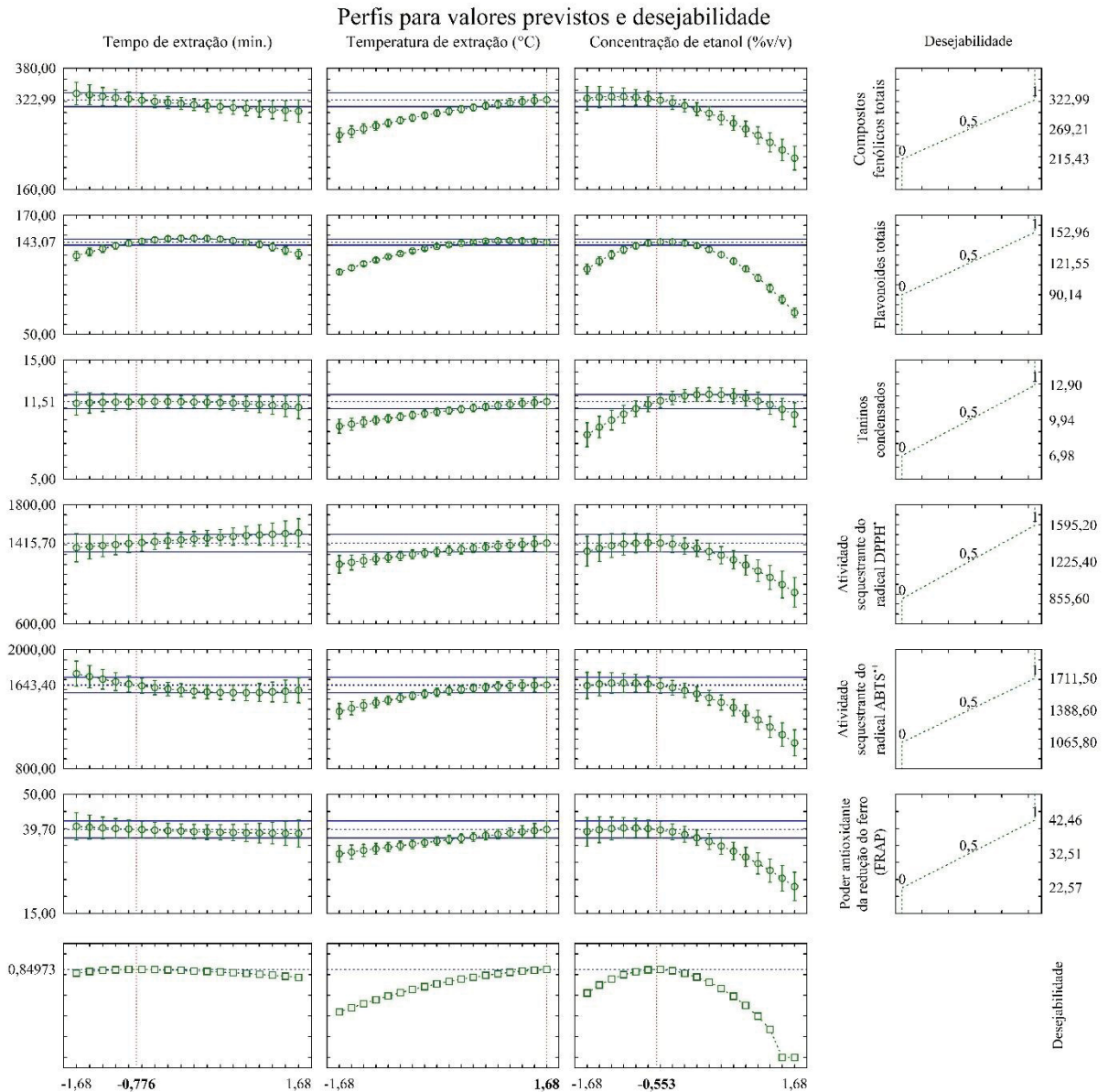
0,05), e os coeficientes de regressão dos modelos de segunda ordem foram obtidos (TABELA 4). Não foi observado efeito significativo para a falta de ajuste de todas as variáveis estudadas ( $p > 0,05$ ), ressaltando a eficácia dos dados aos modelos matemáticos propostos.

Para obtenção das equações dos modelos, foram ignorados os efeitos não significativos ( $p > 0,05$ ). Os protótipos de regressão foram estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ), e apresentaram alta aptidão e adequação aos dados experimentais, com coeficientes de determinação ( $R^2$ ), que variaram de 0,892 a 0,961. Foi observado ainda que os modelos apresentaram coeficientes de determinação ajustados ( $R^2_{adj}$ ) aceitáveis, variando de 0,770 a 0,911, indicando que todos os modelos desenvolvidos explicam mais de 77% das variações totais observadas. Consequentemente, as amostras de regressão definiram bem o verdadeiro comportamento do sistema representando de forma eficiente os dados experimentais.

### 2.3.3 Desejabilidade e validação do modelo matemático

Os modelos calculados para as variáveis respostas de  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ ,  $Y_4$ ,  $Y_5$  e  $Y_6$  foram utilizados para fornecerem a função de desejabilidade (FIGURA 7), que consiste em uma otimização numérica, a partir da observação de várias respostas sobre a qualidade de um processo, de modo a obter uma única resposta de modo que satisfaça todas as restrições que maximizem/minimizem o processo (Rezende; Nogueira; Narain, 2017). Um extrato com altos valores para todas as variáveis foi considerado desejável.

FIGURA 7 – PERFIS DOS VALORES PREVISTOS E DESEJABILIDADE PARA O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES TOTAIS, TANINOS CONDENSADOS, ATIVIDADE SEQUESTRANTE DOS RADICAIS DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> E PODER ANTIOXIDANTE DA REDUÇÃO DO FERRO (FRAP) DO EXTRATO DE CASCA DE PINHÃO



FONTA: Autor (2024).

De acordo com as condições ótimas obtidas pela desejabilidade ( $X_1 = 32$  min,  $X_2 = 70$  °C e  $X_3 = 42\%$  de etanol em água destilada), os valores preditos de  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ ,  $Y_4$ ,  $Y_5$  e  $Y_6$ , através das equações ajustadas, utilizando os valores codificados, foram de  $246,82$  mg EAG.g<sup>-1</sup>,  $111,80$  mg EC.g<sup>-1</sup>,  $14,53\%$ ,  $1082,15$  µmol.g<sup>-1</sup>,  $1286,24$  µmol.g<sup>-1</sup> e  $27,07$  µmol.g<sup>-1</sup>, respectivamente (TABELA 6), com um valor de desejabilidade satisfatório de  $0,91328$  (FIGURA 7). Para a validação das condições ótimas, um novo extrato foi obtido em triplicata, e o mesmo apresentou valores médios para  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ ,

Y<sub>4</sub>, Y<sub>5</sub> e Y<sub>6</sub> de 337,05 mg EAG.g<sup>-1</sup>ms, 157,37 mg EC.g<sup>-1</sup>ms, 12,81%, 1533,31 µmol ET.g<sup>-1</sup>ms, 1822,71 µmol ET.g<sup>-1</sup>ms e 30,32 µmol ET.g<sup>-1</sup>ms, respectivamente.

TABELA 6 - RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DO EXTRATO OTIMIZADO DA CASCA DE PINHÃO

| Parâmetro      | Valor predito        | Valor experimental          | *Desvio relativo (%) |
|----------------|----------------------|-----------------------------|----------------------|
| Y <sub>1</sub> | 322,29 <sup>b</sup>  | 337,05 <sup>a</sup> ±1,68   | 4,38                 |
| Y <sub>2</sub> | 138,42 <sup>b</sup>  | 157,37 <sup>a</sup> ±3,56   | 12,04                |
| Y <sub>3</sub> | 11,28 <sup>b</sup>   | 12,81 <sup>a</sup> ±0,60    | 11,96                |
| Y <sub>4</sub> | 1354,25 <sup>b</sup> | 1533,31 <sup>a</sup> ±47,23 | 11,68                |
| Y <sub>5</sub> | 1689,00 <sup>b</sup> | 1822,71 <sup>a</sup> ±27,45 | 7,34                 |
| Y <sub>6</sub> | 36,49 <sup>a</sup>   | 30,32 <sup>b</sup> ±0,21    | -20,33               |

Y<sub>1</sub> - CFT; Y<sub>2</sub> - FT; Y<sub>3</sub> - TC; Y<sub>4</sub> - Captura do radical livre DPPH<sup>•</sup>; Y<sub>5</sub> - Captura do radical livre ABTS<sup>•+</sup>; Y<sub>6</sub> - FRAP.

\*Desvio relativo = [(Valor experimental - Valor previsto)/Valor experimental] × 100.

Diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam uma diferença significativa entre as amostras pelo teste de t de Student (p < 0,05).

A partir dos valores de desvio relativo (%RD) obtidos para cada variável resposta, pode-se concluir que a metodologia utilizada para a otimização das condições do processo foi satisfatória. As respostas apresentaram valores experimentais superiores aos valores preditos pela condição ótima, com exceção do Y<sub>6</sub>. Em outras palavras, as respostas obtidas nas condições otimizadas apresentaram melhores resultados para as variáveis respostas que em qualquer outra condição estudadas no DCCR.

## 2.4 CONCLUSÕES

A casca do pinhão é considerada uma fonte sustentável de antioxidantes naturais e compostos fenólicos, onde o processo de extração afetou o teor de compostos bioativos e a atividade antioxidante. As condições ótimas para extração dos compostos fenólicos presentes foram de tempo de extração de 32 min, 70°C e solução de etanol a 42%.

Essas condições resultaram na obtenção de um extrato com valores dos compostos fenólicos e atividade antioxidante superiores aos valores previstos pelo modelo experimental, demonstrando que a metodologia utilizada para a otimização das condições do processo foi satisfatória. Além disso, devido à variedade de compostos com potencial antioxidante encontrados no extrato, ao baixo risco ambiental e à reduzida toxicidade do etanol, pode-se concluir que o extrato da casca de pinhão tem potencial para ser aplicado na indústria de alimentos.

### **3 CAPÍTULO 3 - UMA COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE DUAS DIFERENTES PRÓPOLIS BRASILEIRAS**

Este capítulo faz parte do artigo intitulado “A comparison of the antioxidant properties of two different Brazilian propolis” **ACEITO E PUBLICADO** no periódico Microchemical Journal – QUALIS (2017-2020) - A2 e JCR (2022) de 4.8.

## UMA COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE DUAS DIFERENTES PRÓPOLIS BRASILEIRAS

**RESUMO:** A própolis é uma substância resinosa de composição química complexa, com cores e consistências variadas, e com alto potencial antioxidante. Este estudo teve como objetivo investigar o conteúdo de compostos fenólicos, flavonoides, taninos condensados e o potencial antioxidante presentes em dois tipos de própolis: a própolis verde PV (*Apis mellifera*) e a própolis mandaçaia PM (*Melipona quadrifasciata anthidioides*), por meio da extração assistida por ultrassom em três métodos diferentes. Todos os métodos de extração utilizaram a mesma proporção de massa de própolis/volume de solvente. O método EA manteve a mistura sob agitação à temperatura ambiente (25 °C/48 h) e, em seguida, a mistura foi submetida ao ultrassom (1 h). O segundo método, EB, foi realizado por meio de ultrassom (1 h) antes da agitação à temperatura ambiente (25 °C/48 h) e, novamente, ultrassom (30 min). O terceiro método, EC, foi submetido ao ultrassom com uma sonda ultrassônica de rompimento celular (10 min), seguido de agitação à temperatura ambiente (25 °C/1 h). Em relação ao conteúdo fenólico e à atividade antioxidante, os extratos de PV, obtidos pelos métodos EA e EC, foram similares. Por outro lado, o método EA foi mais eficaz para os extratos de PM. Além disso, os resultados indicaram um perfil fenólico diversificado nos extratos obtidos, destacando-se os ácidos 3,4-dihidroxibenzoico, cafeico e *p*-cumárico, miricetina, quercetina e catequina para os extratos de PV. Em contraste, os extratos de PM destacaram-se pelos ácidos elágico, vanílico, cafeico, miricetina, quercetina e hesperetina. Em conclusão, o método de menor custo é o método EA, e o método EC foi recomendado quando se busca otimização de tempo. Os resultados obtidos permitirão a realização de estudos avançados para avaliar o efeito antioxidante dos extratos de própolis em indústrias farmacêuticas e de alimentos, como embalagens ativas, cápsulas e outras possíveis aplicações deste importante material bioativo.

**Palavras-chave:** Própolis brasileira, extração assistida por ultrassom, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A própolis consiste em uma substância resinosa de composição química complexa, com cor e consistência variada, produzida pelas abelhas a partir de diversas substâncias de origens vegetais de elevada aplicação, principalmente com intuitos farmacêuticos (Asem *et al.*, 2020; Bankova; Trusheva; Popova, 2021; Cavalaro *et al.*, 2019; Dalponte Dallabona *et al.*, 2020). Sua composição química e cor tornam-se complexas, pois depende de características como vegetação, estação e ambiente, podendo conter entre 50 - 60% de resinas e bálsamos, 30 - 40% de ceras, 5 - 10% de óleos essenciais, 5% de grão de pólen e 5% de outras substâncias, como minerais e moléculas orgânicas (SHAMSUDIN *et al.*, 2019; SILVA-CARVALHO *et al.*, 2015).

Devido a esta complexidade, mais de 800 compostos foram identificados na própolis (Kasote; Bankova; Viljoen, 2022; Zhang *et al.*, 2023). Essa composição inclui ácidos fenólicos, ésteres, flavonoides, alcaloides, vitaminas, cumarinas, taninos, terpenoides, aldeídos, álcoois aromáticos, ácidos graxos, estilbenos,  $\beta$ -esteroides, aminoácidos, vitaminas (B1, B2, B6, C e E) e minerais (como alumínio, antimônio, cálcio, céσιο, cobre, ferro, lantânio, manganês, mercúrio, níquel, prata, vanádio e zinco) (Asem *et al.*, 2020; Kasote; Bankova; Viljoen, 2022; Nayak *et al.*, 2023; Santos, M. S. *et al.*, 2019; Silva-Carvalho; Baltazar; Almeida-Aguiar, 2015; Zhang *et al.*, 2023).

Esse compostos possuem uma vasta aplicação, especialmente, na área farmacêutica, possibilitando sua aplicação através de diversas propriedades, como atividade antisséptica, antimicrobiana, antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória, antifúngicas, antialérgica, antiúlcera, anticancerígeno e imunomoduladora, sendo amplamente usada pela população na forma de extratos (Kamiya *et al.*, 2012; Lopez *et al.*, 2015; Nayak *et al.*, 2023; Pasupuleti *et al.*, 2017). A maioria dessas propriedades atribuídas à própolis se dá ao fato de que essas patologias têm uma natureza oxidativa caracterizada pela superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) como peróxido de hidrogênio, ânion superóxido, íons hidroxila e óxido nítrico (Sambou *et al.*, 2020).

Devido ao potencial efeito antimicrobiano e antioxidante da própolis, a sua aplicação em alimentos vem sendo relatada na literatura, no entanto essa aplicabilidade torna-se limitada, devido ao seu sabor e seu aroma característicos, que podem promover influência nos alimentos (Nori *et al.*, 2011; Surek *et al.*, 2022; Vargas-

Sánchez *et al.*, 2019). A aplicação do extrato de própolis, em diversos produtos com finalidades alimentícias, vem sendo relatada na literatura, desde embalagens ativas (Eskandarinia *et al.*, 2018; Mehdizadeh; Langroodi, 2019; Safaei; Roosta Azad, 2020; Skowron *et al.*, 2019), microencapsulação (Dalponte Dallabona *et al.*, 2020; Jansen-Alves *et al.*, 2018; 2019a; 2019b; Reis *et al.*, 2017) e em produtos cárneos e lácteos (Çoban, 2021; Reis *et al.*, 2017; Santos, M. S. *et al.*, 2019; Vargas-Sánchez *et al.*, 2019).

Dentre as formas de recuperação desses compostos presentes na própolis, a extração assistida por ultrassom é considerada uma alternativa verde e, economicamente, viável às técnicas convencionais. Em comparação com a maceração, demonstram bons resultados com relação à porcentagem de compostos fenólicos e flavonoides extraídos (Bankova; Trusheva; Popova, 2021). Com estas premissas, o objetivo do presente estudo foi avaliar diferentes condições do uso de ultrassom durante a extração, bem como caracterizar o teor de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT), atividade antioxidante frente a radicais livres (DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>), poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), e perfil fenólico dos extratos de dois tipos de própolis brasileira. Estas caracterizações auxiliam na definição de possíveis aplicações, tanto pelas matrizes de interesse quanto pela quantidade necessária do extrato.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

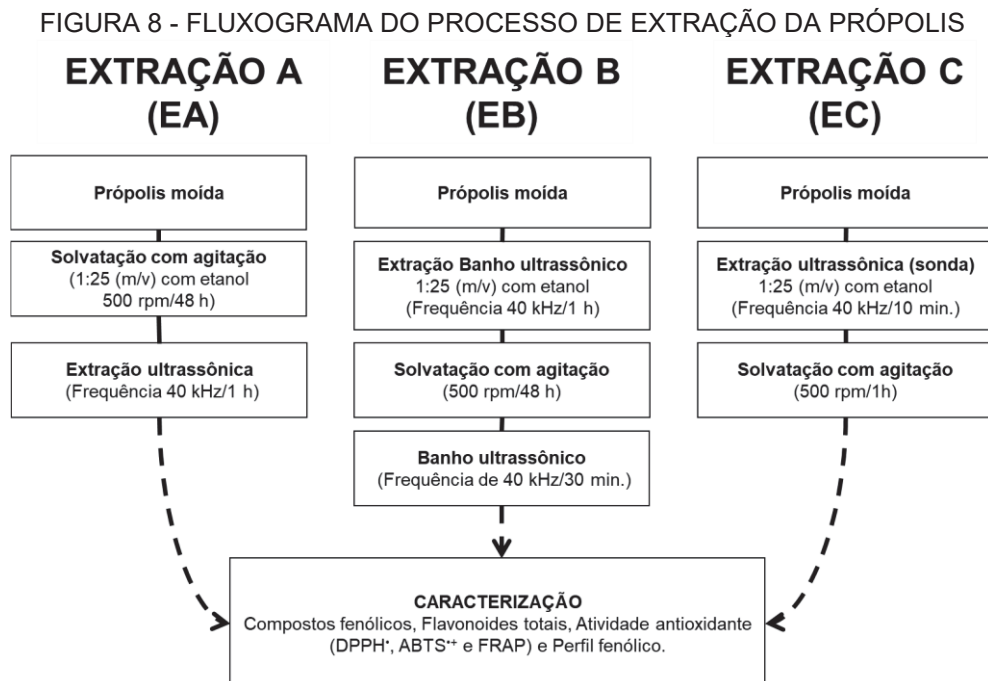
### 3.2.1 Solventes e reagentes

Todos os produtos químicos usados nos experimentos eram de grau analítico. Folin-ciocalteau, 2,2'-difeníl-2-picrilhidrazil hidratado (DPPH), 2,2'-azino-bis(3etil-benzolína-6-sulfonado) (ABTS), ácido hidroxí-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxil (Trolox) e 2,4,6-tris (2-píridil) - s-triazina (TPTZ), acetonitrila, cloreto de ferro (III) hexahidratado e ácido acético foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Os padrões, para compostos fenólicos, (ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido elágico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido salicílico, ácido siríngico, ácido *trans*-cinâmico, ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, miricetina, quercetina, naringenina, catequina, hesperetina e rutina) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O ácido clorídrico,

acetato de sódio trihidratado, metanol, etanol, nitrito de sódio, carbonato de sódio anidro, hidróxido de sódio, fosfato de sódio e persulfato de potássio adquiridos da Neon (São Paulo, Brasil), o cloreto de alumínio adquiridos na Dinâmica (São Paulo, Brasil).

### 3.2.2 Obtenção dos extratos da própolis de mandacaria (PM) e de *Apis* do tipo verde (PV)

A própolis bruta, produzida pela abelha sem ferrão mandacaria (PM), foi doada pelo meliponário de Jorge, localizado próximo à reserva Bosque II, com mata atlântica nativa (coordenadas GPS: -23.4318698 e -51.9440141) em Maringá (Paraná, Brasil), em março de 2019, enquanto a própolis de abelha *Apis* do tipo Verde (PV) foi proveniente de Muzambinho (coordenadas geográficas: 21° 22' 33" S, 46° 31' 33" W) (Minas Gerais, Brasil) no ano de 2021. A obtenção dos extratos, ricos em compostos antioxidantes das própolis, foi realizada de três formas. O processo de extração é apresentado na FIGURA 8.



FONTE: Adaptado de Dalponte Dallabona *et al.* (2020) com modificações.

Buscando avaliar o efeito da influência do uso da sonicação em diferentes etapas da extração dos compostos bioativos, foram realizadas três formas de extração, tomando como referência o método de extração proposto por Dalponte

Dallabona *et al.* (2020). As própolis moídas foram submetidas à extração utilizando uma razão massa/volume 1:25 (m/v) com etanol 70% (v/v), mantidas sob agitação (500 rpm) em chapa (Fisatom, model 752A, Brazil) e à temperatura ambiente em um espaço escuro por 48 h. Em seguida, o extrato bruto foi submetido ao banho ultrassônico (1440 DA Biodont, Brasil), com frequência de 40 kHz por 1 h (Extração A - EA). Outra extração foi realizada com a realização da sonicação com frequência de 40 kHz, por 1 h antes da solvatação, sonicada novamente ao final com frequência de 40 kHz por 30 min. (Extração B - EB). Alternativamente foi realizada a extração com o auxílio de um disruptor de célula (Ultronique Q 550W, Eco-Sonics, Indaiatuba, Brasil) equipado com micro ponta de titânio de 4 mm de diâmetro. O processo foi realizado com potência de 500 W, frequência de 40 kHz e a mistura própolis: etanol (1:25 m/v em etanol 70%) durante 10 min, com ciclos de pulso a cada 10 segundo. Em seguida a mistura foi submetida a solvatação com agitação de 500 rpm em chapa (Fisatom, model 752A, São Paulo, Brasil), sob temperatura ambiente em ambiente escuro durante 1 h (Extração C - EC).

Os extratos foram filtrados e congelados (-20 °C/24 h) para remover ceras e substâncias menos solúveis. Em seguida, as amostras foram filtradas, o volume foi ajustado, e armazenadas em frascos âmbar a -20°C. Os extratos foram caracterizados quanto ao conteúdo de compostos fenólicos, flavonoides totais, taninos condensados, atividade antioxidante (DPPH<sup>\*</sup>, ABTS<sup>\*\*</sup> e FRAP) e perfil de compostos fenólicos.

### 3.2.3 Caracterização dos extratos de própolis

#### 3.2.3.1 Compostos fenólicos totais (CFT)

Os compostos fenólicos totais foram quantificados pelo método do reagente Folin-Ciocalteu propostos por Waterhouse (2002), com modificações. Todos os extratos das própolis mandaçaia e verde foram diluídos (1:2 v/v e 1:30 v/v respectivamente) em etanol 70%. 50 µL dos extratos diluídos foram acrescidas de 1.950 µL de água destilada e 150 µL de Folin-Ciocalteu (2 M), submetidos a agitação e repouso protegidos de luz (5 min). Em seguida foram adicionados 350 µL de carbonato de sódio 20% e submetidos a agitação e incubados (40 °C/30 min) em banho-maria (Warmnest, HH-S14, Brasil). A leitura das absorbâncias foi realizada em

a 765 nm (Q898DPT, Quimis, São Paulo, Brasil), e os resultados expressos em mg EAG.g<sup>-1</sup> da amostra seca com curva padrão de ácido gálico (5 - 25 µg.mL<sup>-1</sup>).

### 3.2.3.2 Flavonoides totais (FT)

O conteúdo de flavonoides totais foi determinado de acordo com o método proposto por Arriola *et al.* (2014). Todos os extratos das própolis mandaçaia e verde foram diluídos (1:20 v/v e 1:40 v/v, respectivamente) com etanol 70%. 1.0 mL dos extratos diluídos foram homogeneizados com 300 µL de NaNO<sub>2</sub> 5% e encubados por 5 min na ausência de luz. Em seguida foram adicionados 300 µL de AlCl<sub>3</sub> 10% encubados no escuro durante 6 min, acrescidas de 2.000 µL de NaOH 1 M e homogeneizadas em vortex. As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro VIS a 425 nm (Q898DPT, Quimis, São Paulo, Brasil). O resultado foi expresso através de curva padrão catequina (10 - 250 µg.mL<sup>-1</sup>) em mg EC.g<sup>-1</sup> da amostra seca.

### 3.2.3.3 Taninos condensados (TC)

O teor de taninos condensados foi avaliado através do método de hidrólise ácida em alta temperatura, utilizando a mistura butanol-HCl (Porter; Hrstich; Chan, 1985). 500 µL dos extratos foram homogeneizados com 3.000 µL da mistura butanol-HCl (95:5 v/v), e 100 µL de reagente férrico (NH<sub>4</sub>)Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O 2% em 2 M HCl e incubados a 95°C em banho-maria (Warmnest, HH-S14, Brasil) por 40 min. A absorvância foi medida a 550 nm em um UV-VIS (UV – 6100 PC Double Beam Spectrophotometer), e os resultados foram expressos em porcentagem de equivalente de leucocianidina (Equação 9).

$$\%TC = \frac{A_{550} \times 78,26 \times F}{\%M.S} \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde,

%TC – Porcentagem de taninos condensados em equivalente leucocianidina

A<sub>550</sub> – Absorvância da amostra a 550 nm

F – Fator de diluição na medição espectrofotométrica

%M.S – Porcentagem de matéria seca da amostra

### 3.2.3.4 Atividade antioxidante *in vitro*

Para as análises de atividade antioxidante *in vitro*, todos os extratos das própolis mandaçaia e verde foram diluídos (1:15 v/v e 1:40 v/v, respectivamente) em etanol 70%, e, em seguida, submetidos às análises descritas a seguir.

#### 3.2.3.4.1 Captura do radical livre DPPH<sup>•</sup>

A capacidade de captura do radical DPPH<sup>•</sup> foi realizada conforme proposto por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995). 50 µL dos extratos diluídos foram adicionados em tubos com 1.950 µL de solução etanólico de DPPH<sup>•</sup> (0,06mM), homogeneizadas e incubada por 30 min no escuro. As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro VIS a 517 nm (Q898DPT, Quimis, São Paulo, Brasil), e os resultados expresso em µmol ET.g<sup>-1</sup> de amostra seca com base na curva de calibração de Trolox (50 – 1000 µmol ET.L<sup>-1</sup>).

#### 3.2.3.4.2 Captura do radical livre ABTS<sup>•+</sup>

A capacidade de captura do radical ABTS<sup>•+</sup> foi realizada conforme proposto por Re *et al.* (1999). O radical ABTS<sup>•+</sup> foi elaborado pela reação de 10 mL da solução ABTS 7mM em tampão acetato de sódio (20 mM, pH 4,5) com 176 µL de persulfato de potássio 140 mM em tampão acetato de sódio (20 mM, pH 4,5) incubados à temperatura de 25 °C em ambiente escuro por 16 h. O radical foi diluído com tampão acetato de sódio 20 mM até a obtenção de absorvância de 0,700 ± 0,050 a 734 nm. 30 µL dos extratos diluídos foram adicionadas em tubos com 3,0 mL de solução ABTS<sup>•+</sup>, homogeneizadas e incubada por 2 h ao abrigo de luz. As leituras das absorvâncias foram realizadas a 734 nm em espectrofotômetro VIS (Q898DPT, Quimis, São Paulo, Brasil), e os resultados expresso em µmol ET.g<sup>-1</sup> de amostra seca com base na curva de calibração de Trolox (100 – 2.500 µmol ET.L<sup>-1</sup>).

#### 3.2.3.4.3 Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)

O poder antioxidante redutor férrico (FRAP) dos extratos foi avaliado conforme descrito por Benzie; Strain (1996). Alíquotas de 100 µL dos extratos diluídos foram

adicionadas em tubos com 3.400  $\mu\text{L}$  de solução de FRAP (mistura de tampão acetato de sódio (300mM, pH 3,6), 10 mM de 2, 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) em 40 mM HCl e solução de cloreto férrico 20 mM, em proporção 10:1:1 v/v) e incubadas em banho-maria (37 °C/30 min.). As absorvâncias foram lidas a 593 nm em espectrofotômetro VIS (Q898DPT, Quimis, São Paulo, Brasil), e os resultados expresso em  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$  de amostra seca, com base na curva de Trolox (2,0 – 21,0  $\mu\text{mol ET.L}^{-1}$ ).

### 3.2.3.5 Perfil fenólico

Os perfis de compostos fenólicos dos extratos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) Shimadzu (Kyoto, Japão), equipada com um injetor automático Rheodyne 7125i e um detector UV/VIS. As colunas utilizadas foram uma Shimadzu LC-18 (25 cm  $\times$  4,6 mm, tamanho de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , da Supelco, Bellefonte, PA, EUA) e uma pré-coluna Shimadzu C-18 ODS. Foi utilizado um gradiente de eluição que consistiu nas seguintes fases móveis, (A) água/ácido acético a 2% (v/v) e (B) acetonitrila: metanol, 2:1 (v/v): 90% A em 0 min, 80% A em 10 min, 70% A em 15 min, 60 % A em 25 min, 50% A entre 30-40 min, 75% A em 42 min e 90% A em 44 min. Foi utilizada uma taxa de fluxo constante de 1  $\text{mL.min}^{-1}$ , e a temperatura da coluna mantida a 25 °C, com volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . A detecção dos compostos foi realizada a 280 nm. O software LabSolutions (Shimadzu) foi utilizado para controlar o sistema LC-UV e para o processamento dos dados (Alcântara *et al.*, 2019).

### 3.2.4 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata e expressas como média ( $n = 3$ )  $\pm$  desvio padrão (DP). A análise dos dados foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) com 95% de significância, seguida do teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para avaliar o efeito dos tipos de extração nas própolis, enquanto o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ) foi utilizado para comparar as variedades de própolis. Para explorar a relação entre as respostas obtidas em cada condição experimental, o teste de Spearman foi usado para determinar as correlações entre os dados. Toda análise estatística foi realizada utilizando o *software* Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, EUA).

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT) e taninos condensados (CT)

O conteúdo de CFT dos extratos variou entre as diferentes técnicas de extração para os dois tipos de própolis estudados (TABELA 7). Houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos teores de compostos fenólicos totais entre as própolis das duas espécies. Foi observado que PV apresentou entre 4,9-5,7 vezes mais CFT que a PM, mostrando que esta é uma melhor fonte quantitativa desses compostos por unidade de massa de própolis bruta. Isto pode se dar ao fato de que a própolis de mandaçaia é do tipo geoprópolis, tendo na sua amostra considerável quantidade de argila adicionado pelas abelhas durante a sua produção. Dessa forma, como essa fração inorgânica da própolis é bastante densa, torna baixo o valor correspondente à fração orgânica constituinte da própolis de mandaçaia. Observa-se ainda que a PV é um produto que contém uma quantidade considerável de compostos fenólicos, como flavonoides e ácidos fenólicos (Pazin *et al.*, 2017).

TABELA 7 - CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT), FLAVONOIDES TOTAIS (FT) E TANINOS CONDENSADOS (TC) EM EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE (PV) E MANDAÇAIA (PM) OBTIDOS SOB DIFERENTES EXTRAÇÕES

| Resposta                            | Amostra | MÉTODO DE EXTRAÇÃO          |                             |                             |
|-------------------------------------|---------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                                     |         | EA                          | EB                          | EC                          |
| CFT<br>(mg EAG.g <sup>-1</sup> M.O) | PV      | 324,82 <sup>aA</sup> ± 5,26 | 309,10 <sup>bA</sup> ± 0,47 | 320,44 <sup>aA</sup> ± 4,08 |
|                                     | PM      | 64,76 <sup>aB</sup> ± 2,94  | 53,76 <sup>bB</sup> ± 3,05  | 65,39 <sup>aB</sup> ± 3,63  |
| FT<br>(mg EC.g <sup>-1</sup> M.O)   | PV      | 97,04 <sup>bA</sup> ± 0,76  | 88,55 <sup>cA</sup> ± 0,74  | 114,51 <sup>aA</sup> ± 1,19 |
|                                     | PM      | 37,93 <sup>aB</sup> ± 1,17  | 20,83 <sup>cB</sup> ± 0,24  | 34,29 <sup>bB</sup> ± 0,29  |
| TC (%)                              | PV      | 1,98 <sup>aB</sup> ± 0,03   | 1,60 <sup>cB</sup> ± 0,05   | 1,80 <sup>bB</sup> ± 0,02   |
|                                     | PM      | 3,02 <sup>aA</sup> ± 0,12   | 2,86 <sup>aA</sup> ± 0,11   | 3,21 <sup>aA</sup> ± 0,19   |

Resultado expresso em média ± desvio padrão.

PV – Própolis verde, PM – Própolis mandaçaia, M.O – Matéria orgânica.

CFT – Compostos fenólicos totais; FT – Flavonoides totais; TC – Taninos condensados.

Diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam uma diferença significativa entre as amostras pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Diferentes letras maiúsculas na mesma coluna e dentro da resposta avaliada indicam uma diferença significativa entre as amostras pelo teste de Kruskal–Wallis ( $p < 0,05$ ).

FONTE: Autor (2024).

Os valores de CFT variaram de 53,76 a 65,39 mg EAG.g<sup>-1</sup> para PM, enquanto para as amostras de PV variaram entre 309,10 a 324,82 mg EAG.g<sup>-1</sup>. A comparação dos resultados do conteúdo fenólico total com os relatados na literatura torna-se complexa, mesmo após a utilização do mesmo método analítico (procedimento de

Folin–Ciocalteu), devido às diferentes formas que os resultados podem ser expressos, uma vez que podem ser utilizados diversos padrões de calibração (Escriche; Juan-Borrás, 2018).

Rajan *et al.* (2021) corroboram a presença de elevados conteúdos de CFT obtidos em extratos de própolis verde. Os resultados obtidos se mostraram superiores aos valores relatados por Saito *et al.* (2021), que obtiveram valores de compostos fenólicos totais entre 4,9 e 127 mg.g<sup>-1</sup> em extratos de própolis verde obtidos por diferentes técnicas, assim como próximos dos valores obtidos por Oroian *et al.* (2020) em seis amostras de própolis oriundas da Romênia. Além disso, os valores obtido de CFT para a PM apresentaram valores superiores ao reportado por Hochheim *et al.* (2019), que obtiveram conteúdo de CFT de 4,87 mg EAG.g<sup>-1</sup> em extrato etanólico, porém, inferior ao obtido em extrato metanólico de própolis de mandaçaia (57,53 mg EAG.g<sup>-1</sup>). Ambas variedades de própolis mostraram valores de compostos fenólicos superiores aos relatados por Pazin *et al.* (2017), que obtiveram valores entre 29,5 e 72,5 mg.g<sup>-1</sup> para própolis verde e entre 8,0 e 93,0 mg.g<sup>-1</sup> para mandaçaia, em extratos etanólicos e frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e água.

De modo similar, o conteúdo de flavonoides totais presentes nos extratos apresenta diferença significativa ( $p < 0,05$ ), sendo obtidos valores entre 2,6-3,3 vezes maiores de FT para a PV em relação a PM. Sendo obtidos valores de 20,83 a 37,93 mg EC.g<sup>-1</sup> para os extratos de PM, e de 88,55 a 114,51 mg EC.g<sup>-1</sup> para os extratos de PV. Observa-se que as maiores quantidades de compostos fenólicos e flavonoides foram obtidas nos métodos de extração EA (64,76 - 324,82 mg EAG.g<sup>-1</sup> para CFT; 37,93 – 97,04 mg EC.g<sup>-1</sup> para FT) e EC (65,39 – 320,44 mg EAG.g<sup>-1</sup> para CFT; 34,29 – 114,51 mg EC.g<sup>-1</sup> para FT), onde dentre as amostras de própolis investigadas, a amostra PV foi a que apresentou os maiores resultados de CFT e FT. Os valores de flavonoides obtidos foram superiores aos relatados por Pazin *et al.* (2017) em extratos etanólicos e frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e água, que obtiveram valores de flavonoides entre 6,7 e 81,4 mg.g<sup>-1</sup> para própolis verde e valores entre 2,6 e 10,0 mg.g<sup>-1</sup> para própolis de mandaçaia.

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários do metabolismo celular vegetal. Dessa forma, os teores de compostos fenólicos e flavonoides presentes na própolis são influenciados por diversos fatores, dependendo das espécies de abelha, da preferência por fontes florais, da disponibilidade de resinas vegetais, época de

colheita, clima, dentre outros (Asem *et al.*, 2020; Pazin *et al.*, 2017; Shamsudin *et al.*, 2019).

Além disso, foram observados que as variedades de própolis estudadas apresentam conteúdos de taninos condensados, conhecidos também como proantocianidinas (TABELA 7). Os valores obtidos com os extratos PM foram significativamente maiores que os extratos PV ( $p < 0,05$ ) em até 1,7 vezes, variando de 2,86 a 3,21% enquanto os extratos PV obtiveram teores entre 1,60 e 1,98%. Os valores de taninos obtidos para a própolis verde foram inferiores aos valores relatados por Mayworm *et al.* (2014), que encontraram valores de taninos entre 2,10 e 3,60%.

Os taninos condensados são metabólitos secundários das plantas, que fazem parte do sistema de defesa química contra estressores bióticos e abióticos (Soldado; Bessa; Jerónimo, 2021). Além disso, apresentam diversas atividades biológicas: antioxidante, anticancerígeno, antimutagênica, antidiabético, anti-inflamatório, anti-helmíntico, antimicrobiano, imunestimulante, cárdio, neuro e protetor ocular, que são propriedades benéficas para a saúde (Dorneles; Noreña, 2020; Soldado; Bessa; Jerónimo, 2021).

Pode-se observar a partir dos resultados de CFT, FT e TC, que o uso do disruptor de célula se mostra vantajoso para o processo de extração, como pode ser observado pelo procedimento EC, uma vez que os resultados obtidos para CFT e FT são muito semelhantes aos de EA, o que promove uma maior economia na quantidade de tempo de extração. Escriche; Juan-Borrás (2018) relatam comportamento semelhante, ressaltando a vantagem da extração de compostos de própolis utilizando dupla sonicação, quando comparado com extração por maceração e maceração-sonicação.

### 3.3.2 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos de própolis foi verificada com auxílio de três métodos diferentes, visando uma complementação do poder antioxidante dos extratos. Foi avaliada a capacidade de sequestrar os radicais DPPH<sup>\*</sup>, ABTS<sup>\*\*</sup> e o poder de redução do ferro (FRAP) (TABELA 8). A atividade antioxidante dos tipos de própolis estudados é significativamente diferente ( $p < 0,05$ ), sendo observado que a PV apresenta maior poder antioxidante, em uma quantidade de até 4,6 vezes maior para DPPH<sup>\*</sup>, 3,2 vezes para ABTS<sup>\*\*</sup> e 3,8 vezes para o FRAP em relação aos valores

obtidos pelos extratos de PM. Esses resultados ressaltam a importância da escolha do tipo de própolis, quando se busca a obtenção de extratos com elevado potencial antioxidante.

Os maiores valores de atividade antioxidante foram obtidos nos métodos de extração EA e EC para a PV e no método EA para a PM. A PV apresentou valores de sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> entre 633,65 e 741,14  $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g}^{-1}$ , enquanto a PM apresentou valores entre 135,87 e 195,05  $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g}^{-1}$ . Quanto a atividade antioxidante contra o radical ABTS<sup>•+</sup> os valores para a PV apresentaram variação entre 1703,58 e 1944,76  $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g}^{-1}$ , e entre 530,84 e 734,93  $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g}^{-1}$  para a PM. O poder antioxidante FRAP apresentou valores variando de 543,84 e 597,77  $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g}^{-1}$  para a PV, e entre 140,12 e 175,72  $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g}^{-1}$  para a PM. Esses valores sugerem que os extratos possuem um bom potencial antioxidante. Pazin *et al.* (2017) corroboram esses resultados, pois obtiveram extratos com maior capacidade antioxidante em própolis verde e de mandaçaia.

TABELA 8 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE OS RADICAIS DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> E O PODER ANTIOXIDANTE REDUTOR DO FERRO (FRAP) EM EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE VERDE (PV) E MANDAÇAIA (PM) OBTIDOS SOB DIFERENTES EXTRAÇÕES

| Resposta   | Amostra | MÉTODO DE EXTRAÇÃO           |                               |                                |
|--|---------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
|  |         | EA                           | EB                            | EC                             |
| DPPH <sup>•</sup><br>( $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g}^{-1}$ )  | PV      | 741,14 <sup>aA</sup> ±14,41  | 633,65 <sup>bA</sup> ±44,75   | 715,27 <sup>abA</sup> ±35,51   |
|  | PM      | 195,05 <sup>aB</sup> ±12,17  | 135,87 <sup>cB</sup> ±5,73    | 169,99 <sup>bB</sup> ±10,27    |
| ABTS <sup>•+</sup><br>( $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g}^{-1}$ ) | PV      | 1944,76 <sup>aA</sup> ±68,44 | 1703,58 <sup>bA</sup> ±108,37 | 1856,53 <sup>abA</sup> ±106,45 |
|  | PM      | 734,93 <sup>aB</sup> ±43,95  | 530,84 <sup>cB</sup> ±20,72   | 662,50 <sup>bB</sup> ±11,40    |
| FRAP<br>( $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g}^{-1}$ )               | PV      | 578,84 <sup>aA</sup> ±40,39  | 543,84 <sup>aA</sup> ±22,94   | 597,77 <sup>aA</sup> ±18,09    |
|  | PM      | 164,43 <sup>aB</sup> ±3,84   | 140,12 <sup>bB</sup> ±8,76    | 175,72 <sup>aB</sup> ±8,50     |

Resultado expresso em média  $\pm$  desvio padrão.

PV – Própolis verde, PM – Própolis mandaçaia, M.O – Matéria orgânica.

Diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam uma diferença significativa entre as amostras pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Diferentes letras maiúsculas na mesma coluna e dentro da resposta avaliada indicam uma diferença significativa entre as amostras pelo teste de Kruskal–Wallis ( $p < 0,05$ ).

FONTE: Autor (2024).

Assim como para compostos fenólicos, a comparação dos resultados de atividade antioxidante para os radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> com os relatados na literatura é complexa, pois grande parte dos estudos geralmente expressam os resultados em IC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>. Os valores de DPPH<sup>•</sup> foram inferiores aos relatados por Skaba *et al.* (2013), que encontraram elevados valores de DPPH<sup>•</sup> (1230,07  $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e valores de ABTS<sup>•+</sup> (1223,06  $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g}^{-1}$ ), inferiores aos obtidos para o PV em todas as extrações realizadas. Ambas as própolis obtiveram valores superiores ao relatado por Oldoni *et al.* (2015) com valor  $95,88 \pm 4.4 \mu\text{mol ET}\cdot\text{g}^{-1}$  de própolis de *Apis mellifera*.

Dalponete Dallabona *et al.* (2020) obtiveram valores de atividade antioxidante contra o DPPH<sup>\*</sup> de 25,7  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$  em própolis de tabuna; e Oldoni *et al.* (2015) obtiveram valores entre 31,6 e 87,5  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$  de própolis de *Apis mellifera*. Os valores de ABTS<sup>\*\*</sup> obtidos para PV se encontram próximos aos observados por Cavalaro *et al.* (2019), que obtiveram valores entre 1155,3 e 13412,1  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$  em extratos de própolis verde obtidos através de ultrassom. Andrade *et al.* (2017) relataram valores superiores de atividade antioxidante de DPPH<sup>\*</sup> para própolis marrom, verde e vermelha entre 4431,0 e 4663,8  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$ , de ABTS<sup>\*\*</sup> entre 1868,45 e 2913,55  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$ , e para FRAP de 471,51 a 633,18  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$ .

Para todas as variáveis estudadas (CFT, FT, DPPH<sup>\*</sup>, ABTS<sup>\*\*</sup> e FRAP), foi observado que o método de extração EB, no qual a sonicação é realizada antes do período de agitação, foi o que apresentou os menores valores, sendo significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). A extração assistida por ultrassom é usada na extração de compostos bioativos de muitos materiais diferentes, onde a extração é atribuída ao processo de cavitação, que causa a ruptura das estruturas celulares possibilitando maior penetração do solvente na estrutura interna das partículas, aumentando a difusão intrapartícula (Silva Júnior *et al.*, 2021; Yıldırım, 2022).

No caso da própolis, pela falta de estruturas celulares na matriz, a aceleração do processo de extração é acentuada, resultando em uma rápida extração dos compostos (Bankova; Trusheva; Popova, 2021). Dessa forma o uso do ultrassom facilita a extração dos compostos com potencial antioxidante presentes na própolis. No entanto, a redução do conteúdo nos extratos EB podem ser atribuídos à possível oxidação dos compostos devido a extração prolongada, reduzindo assim a quantidade de compostos fenólicos, flavonoides e demais compostos com potencial antioxidante (Chew *et al.*, 2011; Chirinos *et al.*, 2007).

### 3.3.3 Correlação entre conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, taninos condensados e atividades antioxidantes

A correlação de Spearman foi usado para relacionar os CFT, FT, CT e as capacidades antioxidantes (DPPH<sup>\*</sup>, ABTS<sup>\*\*</sup> e FRAP) dos extratos de própolis. Foi observado que apenas os taninos condensados não apresentaram correlação significativa com as demais variáveis estudadas ( $p > 0,05$ ), e que as demais correlações significativas foram positivas ( $p < 0,05$ ) (TABELA 9).

Os CFT apresentaram forte correlação positiva com os FT ( $r_s = 0,886$ ), e correlação positiva muito forte com os ensaios de DPPH\* ( $r_s = 0,943$ ), ABTS\*\* ( $r_s = 0,943$ ) e FRAP ( $r_s = 0,943$ ). Os FT apresentaram a mesma tendência de correlação com o ensaio de DPPH\* ( $r_s = 0,943$ ), com o ensaio de ABTS\*\* ( $r_s = 0,943$ ) e de reduzir o ferro (FRAP) ( $r_s = 0,943$ ). O ensaio DPPH\* também apresenta uma correlação muito forte com a capacidade do ABTS\*\*, com um valor de  $r_s = 1,000$ . Além disso, o ensaio ABTS\*\* mostra uma forte correlação com FRAP com um valor de  $r_s = 0,886$ .

TABELA 9 – COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN ( $r_s$ ) ENTRE AS VARIÁVEIS CFT, FT, TC, DPPH\*, ABTS\*\* E FRAP

|        | FT     | CT                    | DPPH*                 | ABTS**                | FRAP                  |
|--------|--------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| CFT    | 0,886* | -0,543 <sup>n.s</sup> | 0,943***              | 0,943***              | 0,943***              |
| FT     | 1,000  | -0,657 <sup>n.s</sup> | 0,943***              | 0,943***              | 0,943***              |
| CT     | -      | 1,000                 | -0,600 <sup>n.s</sup> | -0,600 <sup>n.s</sup> | -0,600 <sup>n.s</sup> |
| DPPH*  | -      | -                     | 1,000                 | 1,000***              | 0,886***              |
| ABTS** | -      | -                     | -                     | 1,000                 | 0,886***              |

CFT – Compostos fenólicos totais; FT – Flavonoides totais; TC – Taninos condensados. Significância estatística (p-valor) relatada como: n.s.: não significativo, \*\* para  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* para  $p < 0,001$ .

FONTE: Autor (2024).

Essa influência positiva mostrada pelo total de compostos fenólicos e flavonoides a partir da análise de correlação, sugere que os métodos ABTS\*\*, DPPH\* e FRAP têm capacidade preditiva de atividade antioxidante quase semelhante para a própolis (Asem *et al.*, 2020). Comportamento similar de correlação foi relatado por Asem *et al.* (2020), que observaram correlações positivas fortes do CFT, FT e as atividades antioxidantes em extratos de própolis de abelha sem ferrão da Malásia, e por Kasote *et al.* (2019) em amostras de própolis de abelhas sem ferrão indianas.

Esses resultados sugerem que o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais são as principais substâncias responsáveis pela capacidade antioxidante dos extratos dos estudos (Hochheim *et al.*, 2019). Essa maior atividade pode ser devido ao alto teor de compostos fenólicos e flavonoides presentes nas amostras de própolis, como aos ácidos 3,4-dihidroxibenzoico, cafeico, *p*-cumárico, ferúlico, sinápico, rutina, miricetina, kampfrol, catequina, hesperetina e crisina que foram encontrados nos extratos estudados (TABELA 10).

### 3.3.4 Perfil fenólico

Os resultados de perfil fenólico dos extratos de própolis estudadas identificadas por HPLC estão dispostos na TABELA 10. As amostras de PV apresentaram entre 25,95 e 30,93 mg.g<sup>-1</sup> de matéria orgânica, enquanto para a PM apresentaram conteúdo de compostos fenólicos entre 17,21 e 22,08 mg.g<sup>-1</sup> de matéria orgânica.

No total foram identificados 12 compostos fenólicos nos extratos PV, sendo 6 ácidos fenólicos e 6 flavonoides, e até 16 compostos fenólicos nos extratos de PM, sendo 11 ácidos fenólicos e 6 flavonoides. Vários estudos realizados corroboram a presença de uma vasta gama de compostos identificados em extratos de própolis, com destaque para ácidos fenólicos e flavonoides (Bakkaloglu; Arici; Karasu, 2021; Hochheim *et al.*, 2019; Kasote *et al.*, 2019; Oroian; Dranca; Ursachi, 2020; Pazin *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2015). Sun *et al.* (2015) relatam que o uso da mistura água/etanol como solvente é particularmente adequado para obtenção de extratos ricos em componentes com altos teores de compostos fenólicos, especialmente flavonoides.

Dentre os ácidos fenólicos, foi observada a presença das duas classes de ácidos fenólicos, os ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos. Os ácidos hidroxibenzóicos chegam a representar até 7% dos compostos presentes nos extratos PV, e até 16% dos presentes nos extratos PM. Dentre esses ácidos se destacam o ácido 3,4-dihidroxibenzóico para os extratos PV (entre 1,13 e 1,58 mg.g<sup>-1</sup>), e os ácidos elágico (entre 0,53 e 1,97 mg.g<sup>-1</sup>), salicílico (entre 0,43 e 0,54 mg.g<sup>-1</sup>), siríngico (entre 0,19 e 0,48 mg.g<sup>-1</sup>) e vanílico (entre 0,24 e 0,36 mg.g<sup>-1</sup>) nos extratos PM.

Os ácidos hidroxicinâmicos, que constituem outro importante grupo de compostos antioxidantes, sendo essa classe correspondente em até 59% e 24% dos compostos observados nos extratos PV e PM, respectivamente. Dentre os ácidos hidroxicinâmicos encontrados temos como destaque os ácidos *p*-cumárico (7,17 – 11,00 mg.g<sup>-1</sup>), cafeico (5,49 – 6,43 mg.g<sup>-1</sup>) e ferúlico (0,10 – 0,63 mg.g<sup>-1</sup>) para os extratos PV, e *p*-cumárico (0,38 – 0,63 mg.g<sup>-1</sup>), cafeico (1,91 – 3,97 mg.g<sup>-1</sup>), *trans*-cinâmico (0,13 – 0,26 mg.g<sup>-1</sup>) e o sinápico (0,07 – 0,60 mg.g<sup>-1</sup>) nos extratos PM. Os resultados apresentados nesse trabalho são consistentes com estudos relatados na literatura, sendo observados valores para os ácido cafeico superiores aos obtidos por Pazin *et al.* (2017) em diferentes frações de extratos de própolis verde e mandaçaia.

Além disso, os resultados são similares aos relatados por Sun *et al.* (2015), e superiores aos resultados obtidos por Bakkaloglu; Arici; Karasu (2021).

TABELA 10 – PERFIL FENÓLICO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE VERDE (PV) E MANDAÇAIA (PM) OBTIDOS SOB DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

| Compostos Fenólicos                                | PRÓPOLIS            |            |            |            |            |            |
|--|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|  | PV                  |            |            | PM         |            |            |
|  | MÉTODOS DE EXTRAÇÃO |            |            |            |            |            |
|  | EA                  | EB         | EC         | EA         | EB         | EC         |
| <b>Ácidos fenólicos</b>                            |                     |            |            |            |            |            |
| <b>Ácidos Hidroxibenzoicos (mg.g<sup>-1</sup>)</b> |                     |            |            |            |            |            |
| Ácido 3,4-Dihidroxibenzoico                        | 1,38±0,03           | 1,13±0,00  | 1,58±0,02  | -          | 0,06±0,00  | -          |
| Ácido 4 Hidroxibenzoico                            | -                   | -          | -          | 0,70±0,01  | 0,19±0,00  | 0,32±0,00  |
| Ácido Elágico                                      | -                   | -          | 0,21±0,00  | 1,97±0,05  | 0,53±0,00  | 0,55±0,04  |
| Ácido Gálico                                       | 0,02±0,00           | 0,04±0,00  | 0,03±0,00  | 0,14±0,00  | 0,08±0,00  | 0,14±0,00  |
| Ácido Salicílico                                   | -                   | -          | -          | -          | 0,43±0,03  | 0,54±0,01  |
| Ácido Siringico                                    | -                   | 0,28±0,01  | -          | 0,48±0,00  | 0,19±0,01  | 0,19±0,00  |
| Ácido Vanílico                                     | -                   | -          | -          | 0,36±0,00  | 0,24±0,00  | 0,28±0,00  |
| <b>Ácidos Hidroxicinâmicos (mg.g<sup>-1</sup>)</b> |                     |            |            |            |            |            |
| Ácido cafeico                                      | 6,43±0,35           | 5,49±0,02  | 5,57±0,48  | 3,97±0,00  | 1,91±0,24  | 2,24±0,22  |
| Ácido ferúlico                                     | 0,10±0,00           | 0,61±0,02  | 0,63±0,01  | -          | -          | -          |
| Ácido <i>p</i> -cumárico                           | 11,00±0,27          | 7,68±0,02  | 7,17±0,65  | 0,63±0,01  | 0,38±0,05  | 0,41±0,06  |
| Ácido sinápico                                     | 0,81±0,02           | -          | -          | 0,60±0,01  | 0,08±0,00  | 0,07±0,00  |
| Ácido <i>trans</i> -cinâmico                       | -                   | -          | -          | 0,26±0,01  | 0,13±0,21  | 0,17±0,01  |
| <b>Flavonoides (mg.g<sup>-1</sup>)</b>             |                     |            |            |            |            |            |
| Catequina  | 0,54±0,08           | 0,50±0,00  | 0,39±0,03  | 0,90±0,01  | 0,27±0,01  | 0,72±0,00  |
| Crisina  | 0,48±0,06           | 0,50±0,02  | 0,58±0,07  | -          | 2,47±0,08  | 1,17±0,16  |
| Hesperetina  | 0,38±0,03           | 0,36±0,01  | 0,37±0,01  | -          | 1,53±0,11  | 1,43±0,21  |
| Kaempferol   | 1,60±0,10           | 1,50±0,06  | 1,46±0,14  | 8,45±0,00  | 7,18±0,85  | 6,03±0,80  |
| Miricetina   | 8,10±1,08           | 7,17±0,19  | 6,70±0,20  | 3,62±0,04  | 1,54±0,10  | 1,90±0,27  |
| Rutina   | 0,08±0,00           | 1,83±0,04  | 1,26±0,01  | -          | -          | 1,15±0,14  |
| Conteúdo de compostos fenólicos                    | 30,93±2,00          | 27,09±0,06 | 25,95±1,01 | 22,08±0,10 | 17,21±0,90 | 17,51±1,80 |

O resultado é expresso como média ± desvio padrão.

PV - Própolis verde, PM - Própolis mandaçaia.

FONTE: Autor (2024).

Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam um potencial antioxidante maior em relação aos ácidos hidroxibenzoicos, pelo fato do grupo carboxilato dos ácidos hidroxicinâmicos apresentarem os elétrons da estrutura deslocalizados dos núcleos aromáticos, promovendo assim um maior poder redutor nas reações redox (Girard; Awika, 2020). Dentre essas substâncias o ácido cafeico é o que possui mais alto potencial antioxidante e o ácido *p*-cumárico o mais baixo (Andreasen *et al.*, 2001). Tem sido relatado que a atividade antioxidante dos extratos aquosos e alcoólicos de

própolis se deve principalmente à presença de derivados dos ácidos cafeico e cinâmico (Banskota *et al.*, 2000; Hochheim *et al.*, 2019).

O uso do HPLC revelou também a presença de quantidades consideráveis de flavonoides catequina, crisina, hesperetina, kaempferol, miricetina e rutina, correspondendo em até 43% dos compostos identificados nos extratos PV, e em até 72% dos compostos identificados nos extratos PM. Dentre os flavonoides encontrados para os extratos PV se destacam a miricetina (6,70 – 8,10 mg.g<sup>-1</sup>), kaempferol (1,46 – 1,60 mg.g<sup>-1</sup>) e catequina (0,39 – 0,54 mg.g<sup>-1</sup>); enquanto para os extratos PM se sobressaem o kaempferol (6,03 – 8,45 mg.g<sup>-1</sup>), crisina (1,17 – 2,74 mg.g<sup>-1</sup>), miricetina (1,54 - 3,62 mg.g<sup>-1</sup>) e hesperetina (1,43 – 1,53 mg.g<sup>-1</sup>).

Compostos como a quercetina e kaempferol tem mostrado ação antioxidante anti-inflamatória, enquanto a crisina é uma dihidroxiflavona que apresenta muitas atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena e antiviral (Bakkaloglu; Arici; Karasu, 2021; Maleki; Crespo; Cabanillas, 2019). Os valores obtidos para miricetina, quercetina e kaempferol em todos os extratos obtidos foram superiores aos obtidos por Bakkaloglu; Arici; Karasu (2021) em extratos de própolis de *Apis mellifera* proveniente da Turquia, além de valores superiores para kaempferol, e de crisina dentro dos observados por Sun *et al.* (2015). A partir dos resultados obtidos pelo perfil fenólico podemos assumir que a alta atividade antioxidante dos extratos de própolis pode ser atribuída à presença dos compostos presentes na TABELA 10, assim como da presença de possíveis constituintes polifenóis que não foram identificados através da análise de HPLC.

### 3.4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos para a extração de amostras de PV e PM, com diferentes condições do uso de ultrassom, demonstram bom rendimento para ambos os métodos. A extração, utilizando a sonicação no final do processo (EA), e com o uso do disruptor de célula (EC), apresentou rendimentos similares, sendo os mais eficientes para os dois tipos de própolis estudadas. Os maiores teores de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante foram observadas nos extratos de PV, que apresentaram um perfil fenólico diversificado, com destaque para os ácidos 3,4-diidroxibenzóico, cafeico e *p*-cumárico, além de quantidades consideráveis de flavonoides como miricetina, kaempferol e catequina, enquanto os extratos de PM

apresentaram teores expressivos dos ácidos elágico, vanílico, cafeico e *p*-cumárico, e com destaque os flavonoides como miricetina, kaempferol, hesperetina e crisina que são responsáveis por conferir potencial antioxidante aos extratos obtidos.

Esses resultados expressam o potencial antioxidante dos extratos dos dois tipos de própolis brasileiro, além de demonstrar que os métodos usados para extração têm alta eficácia para obtenção de extrato de própolis, sendo o método EA mais indicado, devido ao alto rendimento envolvido no processo de extração, enquanto o método EC (uso do disruptor de células) quando se busca uma otimização de tempo, porém mediante consumo energético superior. Adicionalmente, os resultados obtidos irão promover mais estudos para avaliar o efeito antioxidante dos extratos de PV e PM em alimentos e outros materiais, quer seja pela aplicação direta dos extratos em produtos, como carnes e lácteos, ou indireta através do seu uso na produção de embalagens ativas, na obtenção de cápsulas dentre outras possíveis aplicações para esta importante fonte de material bioativo.

#### 4. CAPÍTULO 4 - POTENCIAL DA CASCA DE PINHÃO (*ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA*) COMO AGENTE DE REFORÇO DE ESTRUTURA NAS PROPRIEDADES DE FILMES COMESTÍVEIS DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO E GELATINA

Este capítulo faz parte do artigo intitulado “Potential of Pinhão husk (*Araucaria angustifolia*) as a structural reinforcement agent in the properties of edible films of Pinhão flour and gelatin” **ACEITO E PUBLICADO** no periódico Journal of Applied Polymer Science – QUALIS (2017-2020) – A1 e JCR (2022) de 3.0.

## POTENCIAL DA CASCA DE PINHÃO (*ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA*) COMO AGENTE DE REFORÇO DE ESTRUTURA NAS PROPRIEDADES DE FILMES COMESTÍVEIS DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO E GELATINA

**Resumo:** Considerando o potencial da elaboração de polímeros biodegradáveis, como os filmes e/ou embalagens comestíveis e/ou biodegradáveis para aplicação em alimentos, este estudo teve como objetivo utilizar a casca de pinhão como fonte de material de reforço no desenvolvimento de filmes comestíveis, onde a farinha da amêndoa de pinhão e gelatina bovina foram utilizadas como matrizes dos filmes. Os filmes produzidos foram caracterizados quanto às propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água, solubilidade e opacidade, microestrutura e a degradação térmica. Os filmes obtidos apresentaram estruturas homogêneas e coesas. Além disso, o teor de casca do pinhão teve um efeito positivo nas propriedades mecânicas e de barreira, pois aumentou a resistência à tração e diminuiu a permeabilidade ao vapor de água dos filmes desenvolvidos, sendo as formulações de filme de farinha da amêndoa de pinhão (5,0% de farinha da amêndoa de pinhão, 1,2% de glicerol e 0,4% de pó da casca de pinhão) e gelatina (5,0% de gelatina, 2,0% de glicerol e 0,4% de pó da casca de pinhão) as que apresentaram os melhores resultados (5,06 MPa para RT e 0,14 g.mm.kPa<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> de água para PVA) e (3,88 MPa e 0,28 g.mm.kPa<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> de água para PVA), respectivamente. O estudo de degradação térmica revelou que os filmes são estáveis em temperaturas inferiores a 150 °C, perdendo apenas água livre e compostos voláteis de baixo peso molecular. Esses resultados indicam que o uso da casca de pinhão como reforço para filmes é viável, sugerindo que esses filmes, oriundos de um processo verde, possuem potencial de aplicação como embalagens comestíveis biodegradáveis em alimentos ecologicamente corretas, contribuindo para a economia circular do pinhão, preservação da biodiversidade e reduzindo o acúmulo de plásticos sintéticos na natureza.

**Palavras-chave:** microestrutura, biomateriais, filme comestível, material de reforço, embalagem.

## 4.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos dois anos a crise do COVID-19 promoveu mudanças na vida da população mundial, principalmente no comportamento do consumidor relacionadas à compra de produtos alimentícios (Oliveira *et al.*, 2021). A rápida disseminação da pandemia desencadeou um aumento acentuado na demanda de plásticos, onde a maioria dos plásticos usados para embalagens de alimentos é à base de petróleo, e não são degradáveis e causam muitos problemas ambientais associados ao seu descarte (Hazrol *et al.*, 2022; Spada; Luchese; Tessaro, 2018).

Em 2021, a produção mundial de plástico foi de 390,7 milhões de ton., sendo 90,2% da produção de plásticos de origem fóssil, enquanto os plásticos de base biológica/bioatribuída representaram apenas 1,5% (Plastics Europe, 2022). Estima-se que entre 1,15 e 2,41 milhões de ton. de partículas de plástico entrem no oceano anualmente, causando problemas como microplásticos e ilhas de lixo no oceano, sendo que o lixo plástico corresponde a 90% do lixo no meio ambiente (Duarte, 2022; Huang *et al.*, 2023). Além disso, os microplásticos são ingeridos por uma ampla gama de organismos marinhos, como peixes e moluscos, impactando significativamente a segurança do ecossistema marinho e a saúde humana (Huang *et al.*, 2023).

Diante deste problema, vem-se considerando o potencial da elaboração de polímeros biodegradáveis, como os filmes e/ou embalagens comestíveis e/ou biodegradáveis para aplicação em alimentos como uma alternativa (Daudt *et al.*, 2017; Hazrol *et al.*, 2022; Laureanti *et al.*, 2021; López-De-Dicastillo *et al.*, 2012; Mir *et al.*, 2018; Spada; Luchese; Tessaro, 2018). Pesquisas sobre o uso de materiais biodegradáveis à base de biopolímeros têm sido realizadas como uma das estratégias para reduzir a poluição plástica de origem fóssil, sendo os biopolímeros à base de proteínas e polissacarídeos as alternativas mais comuns aos plásticos (Muralidharan *et al.*, 2022). Os filmes obtidos dessas matrizes apresentam boas propriedades de barreira ao oxigênio devido à capacidade desses componentes de formar estruturas bem compactadas por meio de ligações, principalmente ligações de hidrogênio (Bermúdez-Oria *et al.*, 2019).

Uma das principais proteínas utilizadas na produção de filmes é a gelatina devido à sua abundância, baixo preço, acessibilidade, atoxicidade, resistência a gases e óleos, biodegradabilidade e boas propriedades formadoras de filme com baixo impacto ambiental (Ge *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2022; Shankar; Wang; Rhim, 2019).

Vários estudos foram relatados usando gelatina em filmes comestíveis nos últimos anos (Du *et al.*, 2022; Ge *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2022; Saranti *et al.*, 2021; Shankar; Wang; Rhim, 2019; Song *et al.*, 2023). No entanto, os filmes à base de gelatina têm altas taxas de permeabilidade ao vapor de água e baixa resistência a umidade, restringindo assim sua aplicação a produtos alimentícios com altas taxas de umidade (Lin *et al.*, 2019; Saranti *et al.*, 2021).

O amido é amplamente utilizado para produção de embalagens como substituto aos plásticos convencionais em embalagens de alimentos, devido ao seu baixo custo, alta biodegradabilidade, abundância na natureza, estabilidade química e capacidade de formação de filmes (de Carvalho *et al.*, 2021; Garavand *et al.*, 2022). A farinha da amêndoa de pinhão, que é rica em amido, tem sido considerada uma boa fonte para essa finalidade, contendo entre 63,7% e 81,0% de amido, além de proteínas (5,0% a 6,36%), lipídios (1,0% a 2,2%) e fibra alimentar (4,7% a 15%) (Barreto *et al.*, 2017; Helm *et al.*, 2020; Jorge *et al.*, 2018; Pigozzi *et al.*, 2019). Alguns estudos têm utilizado a farinha e/ou amido de pinhão como base para filmes comestíveis (Daudt *et al.*, 2016, 2017; Luchese *et al.*, 2015; Müller *et al.*, 2020; Spada; Da Silva; Tessaro, 2014). No entanto, os filmes a base de amido geralmente apresentam capacidade de barreira limitada à permeabilidade ao vapor de água e alta solubilidade em água, devido à sua hidrofobicidade o que dificulta sua utilização em aplicações industriais (Bermúdez-Oria *et al.*, 2019; Sutay Kocabaş *et al.*, 2021).

Uma alternativa para melhorar essas propriedades de filmes à base de amido e gelatina é a utilização de materiais que atuem como reforçadores de estrutura, como nanopartículas e aditivos funcionais, visando aumentar a resistência e conferir funcionalidade (Riahi *et al.*, 2021). Entre os estudos incorporando nanopartículas ou nanomateriais, as nanofibras são mais recorrentes. Em contraste, estudos usando nanofibras/nanocristais de celulose relataram melhorias na permeabilidade ao vapor de água, resistência à tração e elasticidade dos filmes (Adilah; Jamilah; Nur Hanani, 2018; Fazeli; Keley; Biazar, 2018; Garavand *et al.*, 2022; Guimarães *et al.*, 2015; Muralidharan *et al.*, 2022; Ruiz-Martínez; Rodrigue; Solorza-Feria, 2022; Silveira *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2012; Sutay Kocabaş *et al.*, 2021; Wegrzynowska-Drzymalska *et al.*, 2022). Além disso, há estudos que exploram nanomateriais de fontes menos convencionais, como nanofibras de rami (Marques *et al.*, 2019), bem como o uso de materiais com granulometria superior preparados por moagem, incluindo engaços de

uva (Laureanti *et al.*, 2021), bagaço de mandioca (de Carvalho *et al.*, 2021) e casca de pinhão (Daudt *et al.*, 2017; Spada; Luchese; Tessaro, 2018).

Com base na constante busca da indústria alimentícia por novos e inovadores produtos utilizando recursos renováveis, valorizando a biodiversidade e buscando agregar valor ao pinhão, este estudo contribui para a Economia Circular ao utilizar e valorizar a casca e eliminar o desperdício para um melhor aproveitamento. Como a casca corresponde a aproximadamente 22% do peso da semente, ela é descartada no meio ambiente sem qualquer reutilização. Este estudo teve como objetivo desenvolver novos filmes à base de farinha da amêndoa de pinhão e gelatina com a adição de pó da casca de pinhão como reforço estrutural para uma possível aplicação como embalagem de alimentos.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Materiais

Pinhões colhidos na Embrapa Florestas (Safrá 2020, coordenadas geográficas: 25°19'18.2"S, 49°09'33.7"W, Colombo, PR, Brasil) foram utilizados para produzir filmes comestíveis. Para obter a farinha da amêndoa de pinhão, as sementes frescas foram secas em estufa (45°C/48 h), descascadas e separadas em casca e semente manualmente. As sementes secas foram moídas em moinho de facas (STAR FT-50, Fortinox, Brasil) e peneiradas com uma malha de 60 *mesh*. As cascas das sementes foram moídas da mesma forma e peneiradas a 100 *mesh*. A gelatina bovina em pó comercial (sem sabor) foi adquirida da empresa Gelnex© (Bloom: 240, 30 *mesh*, Itá, Santa Catarina, Brasil), e o glicerol (Alphatec, Santana-SP, Grau Analítico, Brasil) foi usado como plastificante para preparar os filmes.

### 4.2.2 Análise de composição da farinha da amêndoa e da casca de pinhão

A farinha da amêndoa do pinhão e a casca foram caracterizadas quanto a composição química, avaliando os teores de umidade, proteínas, lipídios e cinzas, determinados através dos protocolos da AOAC (2005). Os teores de amido total e resistente da farinha da amêndoa de pinhão foram medidos por metodologia enzimática utilizando o Megazyme Assay Kit K-TSTA e K-RSTAR, respectivamente

(Megazyme International, Wicklow, Irlanda). O teor de fibras alimentares totais foi medido por metodologia enzimática usando o Megazyme Assay Kit Total Dietary Fiber (Megazyme International, Wicklow, Irlanda).

#### 4.2.3 Delineamento experimental

Um planejamento fatorial completo de dois níveis ( $2^3 = 8$ ) foi realizado para cada tipo de filme para avaliar três fatores independentes. Para os filmes à base de farinha da amêndoa de pinhão, os fatores independentes foram: quantidade de farinha da amêndoa de pinhão (3,0 e 5,0%), glicerol (1,2 e 2,5%) e concentração da casca de Pinhão em pó (0,2 e 0,4%). Já para os filmes à base de gelatina, os fatores independentes foram: a quantidade de gelatina (3,5 e 5,0%), glicerol (2,0 e 3,0%) e a concentração da casca de pinhão em pó (0,2 e 0,4%) (TABELA 11).

TABELA 11 – COMPOSIÇÃO DOS FILMES À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO E À BASE DE GELATINA COM ADIÇÃO DE DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO

| <b>Filmes de farinha da amêndoa de pinhão</b> |   |                     |                                  |
|---|---|---------------------|----------------------------------|
| <b>Formulação</b>                             | <b>Farinha da amêndoa de pinhão (%)</b> | <b>Glicerol (%)</b> | <b>Pó da casca de pinhão (%)</b> |
| <b>PF1</b>                                    | 3,0                                     | 1,2                 | 0,2                              |
| <b>PF2</b>                                    | 5,0                                     | 1,2                 | 0,2                              |
| <b>PF3</b>                                    | 3,0                                     | 2,5                 | 0,2                              |
| <b>PF4</b>                                    | 5,0                                     | 2,5                 | 0,2                              |
| <b>PF5</b>                                    | 3,0                                     | 1,2                 | 0,4                              |
| <b>PF6</b>                                    | 5,0                                     | 1,2                 | 0,4                              |
| <b>PF7</b>                                    | 3,0                                     | 2,5                 | 0,4                              |
| <b>PF8</b>                                    | 5,0                                     | 2,5                 | 0,4                              |
| <b>Filmes de gelatina</b>                     |   |                     |                                  |
| <b>Formulação</b>                             | <b>Gelatina (%)</b>                     | <b>Glicerol (%)</b> | <b>Pó da casca de pinhão (%)</b> |
| <b>GF1</b>                                    | 3,5                                     | 2,0                 | 0,2                              |
| <b>GF2</b>                                    | 5,0                                     | 2,0                 | 0,2                              |
| <b>GF3</b>                                    | 3,5                                     | 3,0                 | 0,2                              |
| <b>GF4</b>                                    | 5,0                                     | 3,0                 | 0,2                              |
| <b>GF5</b>                                    | 3,5                                     | 2,0                 | 0,4                              |
| <b>GF6</b>                                    | 5,0                                     | 2,0                 | 0,4                              |
| <b>GF7</b>                                    | 3,5                                     | 3,0                 | 0,4                              |
| <b>GF8</b>                                    | 5,0                                     | 3,0                 | 0,4                              |

PF – Filmes de farinha da amêndoa de pinhão; GF – Filmes de gelatina

FONTE: Autor (2024).

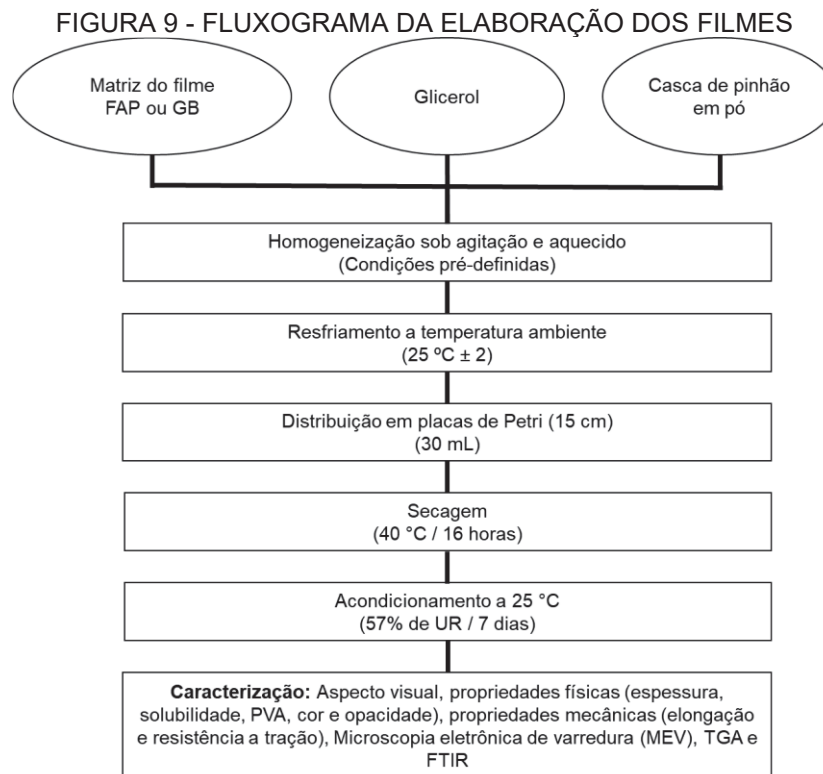
As variáveis de resposta avaliadas foram alongamento na ruptura, resistência à tração e permeabilidade ao vapor de água. Os dados experimentais foram analisados por planejamento fatorial completo para ajustar a seguinte equação polinomial de primeira ordem, como a Equação 10:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \varepsilon \quad (10)$$

Onde Y corresponde à variável de resposta,  $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_{23}$ , representam os coeficientes do modelo,  $x_1, x_2$  e  $x_3$  correspondem às variáveis independentes e  $\varepsilon$  é o erro.

#### 4.2.4 Elaboração dos filmes à base de farinha da amêndoa de pinhão e gelatina com adição de casca de pinhão em pó

Neste estudo, foram preparados filmes por meio do método *casting*, no qual uma solução filmogênica foi despejada em placas de Petri e desidratada por evaporação do solvente em condições controladas de tempo e temperatura. Foram realizados testes preliminares para determinar as quantidades dos constituintes dos filmes, como farinha da amêndoa de pinhão, glicerol e casca de pinhão em pó. As quantidades desses componentes foram variadas para diferentes formulações de filmes com farinha da amêndoa de pinhão e casca de pinhão em pó, bem como para filmes de gelatina. O processo de elaboração dos filmes pode ser visualizado na FIGURA 9.



FAP.: Farinha da amêndoa de pinhão; GB: Gelatina bovina  
FONTE: Autor (2024).

Os filmes à base de farinha da amêndoa de pinhão, foram preparados a partir de suspensões aquosas misturando a farinha da amêndoa de pinhão (3,0% a 5,0%) em água destilada. Glicerol (1,2% a 2,5%) foi utilizado como plastificante e casca de pinhão em pó (0,2% a 0,4%) como agente de reforço. A suspensão aquosa foi aquecida e mantida sob agitação constante (Fisatom, modelo 752A, Brasil) para atingir a gelatinização completa do amido (80 °C/30 min), e então resfriada à temperatura ambiente. Cada suspensão aquosa (30 mL) foi então despejada em placas de Petri estéreis (15 cm de diâmetro) e secas em estufa com circulação forçada de ar a 40 °C (Nova Ética, modelo 400/6ND, Brasil) por 16 h.

Para obtenção dos filmes de gelatina, as suspensões aquosas foram preparadas solubilizando a gelatina (3,5% a 5,0%) em água destilada sob agitação (70 °C/20 min). Em seguida, adicionou-se glicerol (2,0% a 3,0%) como plastificante e o pó da casca de pinhão (0,2% a 0,4%) como agente de reforço sob agitação (50 °C/30 min). Cada suspensão aquosa (30 mL) foi então despejada em placas de Petri estéreis (15 cm de diâmetro) e secas em estufa com circulação forçada de ar (40 °C/24 h). Após a secagem, todos os filmes foram acondicionados por 7 dias em um dessecador contendo uma solução saturada de  $Mg(NO_3)_2(H_2O)_6$  (54% UR, 25 °C) para posterior caracterização.

#### 4.2.4 Caracterização dos filmes

##### 4.2.4.1 Aspectos visuais e táteis

Foi realizada avaliação subjetiva dos parâmetros visuais e táteis dos filmes, a fim de se verificar a homogeneidade e continuidade dos filmes. A maleabilidade, facilidade de remoção das placas de Petri e adesividade também foram avaliadas.

##### 4.2.4.2 Propriedades mecânicas

A elongação de ruptura (ELO, %) e resistência à tração (RT, MPa) dos filmes foram avaliadas utilizando texturômetro (Brookfield CT3, Brookfield, EUA), equipado com probe TA-DGA (Conjunto aberto duplo, Brookfield) segundo o método padrão D882-12 (ASTM, 2012). A separação inicial das garras e a velocidade da probe foi de 20 mm e 1 mm/s, respectivamente, com força de disparo de 0,1 N. Para cada tipo de

filme foram realizadas oito repetições. A ELO (%) e a RT foram calculadas usando as seguintes equações (Eq. 11 e Eq. 12).

$$\text{ELO}(\%) = \frac{100 \times (L_{\max})}{L_0} \quad (\text{Eq. 11})$$

$$\text{RT}(\text{MPa}) = \frac{F_{\max}}{A} \quad (\text{Eq. 12})$$

Onde,  $L_{\max}$  é a deformação na ruptura (mm),  $L_0$  é o comprimento inicial do filme (mm),  $F_{\max}$  é a carga máxima (N), e  $A$  é a área da seção transversal do filme ( $\text{mm}^2$ ).

#### 4.2.4.3 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada de acordo com o método padrão E96/E96M-16 (ASTM, 2016) com modificações propostas por Guimarães et al. (2015). Amostras dos filmes com 3 cm de diâmetro foram fixadas sobre cápsulas de permeabilidade adaptadas com abertura de 2,5 cm de diâmetro (com uma área de exposição de  $0,0013 \text{ m}^2$ ) contendo cloreto de cálcio anidro ( $\text{CaCl}_2$ ), com 0% de umidade relativa (UR). Todo o sistema foi acondicionado em um dessecador contendo uma solução saturada de NaCl (70% UR) e mantido a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . O ganho de massa do sistema foi monitorado em intervalos de 24 h, durante 7 dias. A permeabilidade ao vapor de água foi determinada pela Equação 13.

$$\text{PVA} = \frac{G}{t} \frac{x}{A \cdot P_s \cdot (UR_1 - UR_2)} \quad (\text{Eq. 13})$$

Onde  $G/t$  ( $\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$ ), é o coeficiente angular, gerado pelo ganho de peso da amostra em função do tempo,  $x$  (mm) é a espessura do filme,  $A$  ( $\text{m}^2$ ) é a área disponível para permeação,  $P_s$  (KPa) é a pressão de saturação do vapor de água na temperatura de teste,  $UR_1$  e  $UR_2$  são as umidades relativas (expressas em fração) no interior do dessecador e da cápsula, respectivamente.

## 4.2.5 Caracterização complementar

### 4.2.5.1 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada utilizando micrômetro digital (resolução de 0,001 mm) (Mitutoyo, Japão) medido em 5 pontos dos filmes, 4 nas extremidades e um ponto ao centro do filme. A espessura dos filmes foi considerada como a média aritmética de 10 medidas por formulação.

### 4.2.5.2 Solubilidade em água

A solubilidade dos filmes foi avaliada conforme descrito por Ge *et al.* (2018). As amostras foram cortadas em um quadrado (2 x 2 cm) e secas em estufa convencional natural a  $100 \pm 5$  °C por 24 h e pesadas ( $M_0$ ). As amostras foram imersas em 50 mL de água destilada, cobertas e armazenadas por 24 h em temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, as amostras de filme residual foram secas em estufa a  $100 \pm 5$  °C por 24 h para determinar a massa seca final ( $M_1$ ), e a solubilidade foi calculada conforme a Equação (14).

$$S(\%) = \left( \frac{M_0 - M_1}{M_0} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 14})$$

### 4.2.5.3 Ângulo de contato

A hidrofobicidade dos filmes foi avaliada pela técnica do ângulo de contato aparente (CA) em um goniômetro Krüss DSA25 (Krüss GmbH, Alemanha) usando o método da gota séssil. Três gotas de água deionizada (tensão superficial de 72,80 mN/m) com volume de 5 µL foram depositadas na superfície de cada amostra, e o ângulo foi medido imediatamente após pingar na superfície do filme. Os cálculos dos valores angulares foram realizados usando o software de gerenciamento de equipamentos DSA4 (Krüss GmbH, Alemanha). As medições foram feitas em triplicata para cada filme.

#### 4.2.5.4 Propriedades ópticas

A cor instrumental dos filmes foi determinada avaliando os parâmetros de luminosidade ( $L^*$ ), teor de verde/vermelho ( $a^*$ ) e azul/amarelo ( $b^*$ ) com auxílio de um colorímetro digital (HunterLab, model MiniScan EZ 4500 L, EUA) previamente calibrado com placas branca e preta fornecidos pelo fabricante, sob o sistema CIELAB. Para a leitura das coordenadas de cor, as seguintes condições foram padronizadas: iluminante D65, ângulo de visão  $8^\circ$ , ângulo padrão do observador  $10^\circ$ . Os parâmetros de cor foram medidos em relação à placa branca (padrão) ( $L = 94,40$ ;  $a = -1,29$ ;  $b = 0,70$ ). A diferença colorimétrica total ( $\Delta E$ ) dos filmes foi calculada utilizando-se como referência a placa de calibração branca, conforme a Equação (15).

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (\text{Eq. 15})$$

Onde,  $\Delta L^* = L^*_{\text{placa branca}} - L^*_{\text{amostra}}$ ,  $\Delta a^* = a^*_{\text{placa branca}} - a^*_{\text{amostra}}$  e  $\Delta b^* = b^*_{\text{placa branca}} - b^*_{\text{amostra}}$ .

A opacidade dos filmes foi realizada de acordo como proposto por Nazurah; Nur Hanani (2017). Pedacos retangulares ( $1 \times 4$  cm) de filmes foram cortados e colocados dentro da cubeta de quartzo em espectrofotômetro, sendo utilizada uma cubeta de quartzo vazia como referência. A absorvância foi medida a 600 nm, e a opacidade do filme calculada usando a Equação (16):

$$\text{Opacidade} = \frac{\text{Abs}_{600 \text{ nm}}}{x} \quad (\text{Eq. 16})$$

Onde,  $\text{Abs}_{600}$  é o valor da absorvância a 600 nm e  $x$  é a espessura do filme (mm).

#### 4.2.5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A estrutura morfológica da superfície dos filmes foi analisada por meio de microscopia eletrônica de varredura (TescanVega 3 LMU, Kohoutovice, República

Tcheca). Para as análises de seção transversal, os filmes foram fraturados manualmente, através do congelamento com nitrogênio líquido. As amostras foram fixadas em suportes com fita de cobre e metalizadas por uma fina camada de ouro (Balzers Union, modelo FL 9496, Alemanha) usando voltagem de 15 kV.

#### 4.2.5.6 Espectroscopia no infravermelho por transformada de *Fourier* (FTIR)

Os filmes foram caracterizados pela espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de *Fourier* (FTIR), conduzida em equipamento *Vertex 70* (Bruker, EUA), com acessório de refletância total atenuada (ATR), munido com cristal de seleneto de zinco na faixa espectral de 500 - 4000  $\text{cm}^{-1}$  e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2.5.7 Análises Térmicas

A análise termogravimétrica dos filmes foi realizada utilizando um analisador termogravimétrico (TGA 4000, Perkin Elmer, EUA) com a finalidade de avaliar a estabilidade térmica dos filmes. Para isso amostras de aproximadamente 5 mg dos filmes pesando foram pesadas em cadinhos de alumina e aquecidas de 20 a 750 °C a uma taxa de 10 °C  $\text{min}^{-1}$ , utilizando nitrogênio como gás de purga (20  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). As curvas de TGA e DTG (derivada termogravimétrica) foram utilizadas para a interpretação dos dados.

#### 4.2.6 Análise estatística

As equações dos modelos foram ajustadas aos dados experimentais para produzir os modelos propostos e gráficos de superfície de resposta. A análise estatística dos resultados foi realizada pela análise de variância (ANOVA  $p \leq 0,05$ ) e as médias estatisticamente diferentes foram analisadas pelo teste de Tukey para análise *post hoc*, com o auxílio do software Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, EUA).

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.3.1 Análises de composição da farinha da amêndoa e da casca de pinhão

A amêndoa do pinhão corresponde a 67,54% da massa da semente, enquanto a casca corresponde a 32,46% da massa. Rendimento semelhante foi observado em pesquisa realizada por Helm *et al.* (2020), que observaram rendimento de pinhão seco de 68% para semente e de 32% para casca.

A composição química parcial da farinha da amêndoa de pinhão é composta principalmente de amido, água, e quantidades consideráveis de fibras alimentares (TABELA 12). A farinha da amêndoa de pinhão apresentou valores médios de umidade, cinzas, lipídios e proteínas de 9,76%; 2,56%; 1,94% e 5,12%, respectivamente. Valores similares foram relatados por Pigozzi *et al.* (2019) em farinhas de pinhão cru e cozidas, e por Helm *et al.* (2020) em farinha da amêndoa de pinhão cozido e seco (TABELA 12), e valores de lipídios e proteínas similares aos obtidos por Barreto *et al.* (2017) e Jorge *et al.* (2018) em farinhas de pinhão.

TABELA 12 – COMPOSIÇÃO PARCIAL DA FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO, CASCA E VALORES RELATADOS POR OUTROS AUTORES

| Parâmetro                 | Semente       |                       |                     |                       | Casca              |               |                                |                    |                         |
|---------------------------|---------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|---------------|--------------------------------|--------------------|-------------------------|
|                           | Esse trabalho | Barreto et al. (2017) | Jorge et al. (2018) | Pigozzi et al. (2019) | Helm et al. (2020) | Esse trabalho | Spada; Luchese; Tessaro (2018) | Timm et al. (2020) | Dorneles; Noreña (2020) |
| Umidade (%)               | 9,76±0,23     | 4,95                  | -                   | 5,87-7,17             | 5,0                | 10,56±0,08    | 10,3                           | 5,0                | 0,31                    |
| Cinzas (%)                | 2,56±0,02     | 1,75                  | 2,51                | 2,55-3,22             | 2,8                | 1,92±0,08     | 1,1                            | -                  | 2,46                    |
| Lipídios (%)              | 1,94±0,01     | 1,56                  | 0,97                | 1,7-3,06              | 2,2                | 0,71±0,01     | -                              | 6,0                | 0,82                    |
| Proteína (%)              | 5,12±0,21     | 5,98                  | 6,36                | 5,09-5,74             | 5,5                | 2,26±0,09     | 1,69                           | 1,8                | 9,44                    |
| Amido Total (%)           | 51,28±0,26    | 80,99                 | 63,75               | -                     | 67,0               | -             | -                              | -                  | -                       |
| Amido Resistente (%)      | 3,81±0,13     | -                     | -                   | -                     | 8,0                | -             | -                              | -                  | -                       |
| Fibra alimentar total (%) | 7,43±0,73     | 4,77                  | 5,20                | -                     | 15,0               | 69,23±0,73    | 65,1                           | 46,1               | 54,03                   |

FONTE: Autor (2024).

Foi observado que a farinha da amêndoa de pinhão pode ser considerada como fonte de amido total, com teor médio de 51,28%, onde o conteúdo de amido resistente corresponde a 3,81%. A farinha da amêndoa de pinhão apresentou ainda conteúdo considerável de fibras alimentares (7,43%). No entanto, o teor de amido total é inferior ao relatado em pesquisas recentes, que mostram valores de amido presente na farinha da amêndoa de pinhão entre 63,75 e 80,99% (TABELA 12). Além disso, a farinha da semente de pinhão obtido nesta pesquisa apresentou conteúdo de amido resistente e fibras inferiores ao relatado por Helm *et al.* (2020), que obtiveram valores de 8,0% e 15%, de amido resistente e fibras na farinha da amêndoa de pinhão cozido e seco. Essas diferenças na composição química parcial da farinha da amêndoa de pinhão podem ser atribuídas a possíveis diferenças no estado de maturação, solo, procedimentos de extração e/ou origem da planta (da Costa *et al.*, 2013).

A casca de pinhão é composta principalmente por fibras alimentares (69,23%), carboidratos (15,33) e água (10,56%) (TABELA 12). Na literatura são escassos os estudos que realizaram a caracterização centesimal da casca de pinhão. O conteúdo de umidade da casca de pinhão foi similar ao observado por Spada; Luchese; Tessaro (2018), que encontraram valor de umidade de 10,3% em casca de pinhão. No entanto, o valor de umidade obtido nesse estudo foi superior ao relatado por Timm *et al.* (2020) e Dorneles; Noreña (2020), que obtiveram valores de umidade de 5,0% e 0,31%, para casca de pinhão e brácteas, respectivamente. Além disso, Timm *et al.* (2020) obtiveram valores de lipídios e carboidratos superiores aos obtidos nesse estudo. A casca de pinhão apresentou valor superior aos estudos relatados para o conteúdo de fibras totais (Dorneles; Noreña, 2020; Timm *et al.*, 2020), e similares ao estudo de Spada; Luchese; Tessaro (2018). Segundo Dorneles; Noreña (2020), o elevado conteúdo de fibras, e o baixo teor de lipídios é uma característica comum de cascas de produtos que possuem alto teor de taninos.





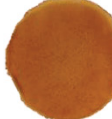


#### 4.3.2 Aspectos visuais e táteis dos filmes





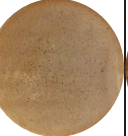
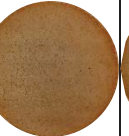


Em geral, todas as formulações propostas produziram filmes contínuos, com boa homogeneidade e coloração uniforme (TABELA 13). Alguns filmes apresentaram adesividade, dificultando o manuseio e maleabilidade.

As formulações PF1, PF3, PF5 e PF7 para os filmes a base de pinhão e GF3, GF5 e GF7 para os filmes de gelatina foram as que produziram filmes com aspecto

mais adesivo, o que ocasionou uma maior dificuldade na remoção das placas de Petri, além de exigirem maior cuidado no manuseio e acondicionamento dos filmes. Essa maior adesividade pode ser atribuída à grande quantidade de glicerol em relação à quantidade de farinha da amêndoa de pinhão/gelatina. Por outro lado, as demais formulações (PF2, PF4, PF6, PF8, GF1, GF2, GF4, GF6 e GF8) se apresentaram como as formulações de filmes mais fáceis de manusear e mantendo as características durante a secagem, possivelmente devido à maior quantidade de farinha da amêndoa de pinhão e gelatina. Além disso, foram observadas diferenças visuais principalmente na cor e rugosidade, na medida que as quantidades de casca de pinhão aumentavam.

TABELA 13 – APARÊNCIA VISUAL DE FILMES COMESTÍVEIS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO E À BASE DE GELATINA COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO

| Filmes de farinha da amêndoa de pinhão |   |           |                    |               |                  |                |              |
|--|---|-----------|--------------------|---------------|------------------|----------------|--------------|
| Formulação                             | Aparência   | Homogêneo | Remoção das placas | Maleabilidade | Manipulabilidade | Adesividade    | Continuidade |
| PF1                                    |    | Sim       | Pouca              | Boa           | Excelente        | Pouca          | Excelente    |
| PF2                                    |    | Sim       | Fácil              | Excelente     | Excelente        | Não apresentou | Excelente    |
| PF3                                    |    | Sim       | Difícil            | Difícil       | Péssima          | Muita          | Boa          |
| PF4                                    |    | Sim       | Fácil              | Excelente     | Excelente        | Não apresentou | Excelente    |
| PF5                                    |   | Sim       | Difícil            | Difícil       | Péssima          | Muita          | Boa          |
| PF6                                    |  | Sim       | Fácil              | Excelente     | Excelente        | Não apresentou | Excelente    |
| PF7                                    |  | Sim       | Difícil            | Difícil       | Péssima          | Muita          | Boa          |

|                           |   |                  |                           |                      |                         |                    |                     |
|---------------------------|---|------------------|---------------------------|----------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|
| <b>PF8</b>                |    | Sim              | Fácil                     | Boa                  | Boa                     | Não apresentou     | Excelente           |
| <b>Filmes de gelatina</b> |   |                  |                           |                      |                         |                    |                     |
| <b>Formulação</b>         | <b>Aparência</b>  | <b>Homogêneo</b> | <b>Remoção das placas</b> | <b>Maleabilidade</b> | <b>Manipulabilidade</b> | <b>Adesividade</b> | <b>Continuidade</b> |
| <b>GF1</b>                |    | Sim              | Fácil                     | Excelente            | Excelente               | Pouca              | Excelente           |
| <b>GF2</b>                |    | Sim              | Fácil                     | Excelente            | Excelente               | Pouca              | Excelente           |
| <b>GF3</b>                |    | Sim              | Difícil                   | Difícil              | Péssima                 | Muita              | Boa                 |
| <b>GF4</b>                |   | Sim              | Fácil                     | Excelente            | Excelente               | Pouca              | Excelente           |
| <b>GF5</b>                |  | Sim              | Difícil                   | Moderada             | Péssima                 | Muita              | Boa                 |
| <b>GF6</b>                |  | Sim              | Fácil                     | Excelente            | Excelente               | Pouca              | Excelente           |
| <b>GF7</b>                |  | Sim              | Difícil                   | Difícil              | Péssima                 | Muita              | Boa                 |

|            |   |     |       |     |     |       |           |
|------------|---|-----|-------|-----|-----|-------|-----------|
| <b>GF8</b> |  | Sim | Fácil | Boa | Boa | Pouca | Excelente |
|------------|---|-----|-------|-----|-----|-------|-----------|

FONTE: Autor (2024).

### 4.3.3 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes são características de grande importância de mensuração quando se trata da integridade dos filmes. A porcentagem de alongação (ELO) e resistência à tração (RT) dos filmes revelou diferença entre as formulações testadas para ambas as matrizes utilizadas ( $p < 0,05$ ) (TABELA 14). Foi observado que todas as variáveis avaliadas mostraram efeito significativo nas propriedades mecânicas dos filmes de farinha da amêndoa de pinhão e filmes de gelatina (TABELA 15).

TABELA 14 – RESULTADOS DE PROPRIEDADES MECÂNICAS (ELONGAÇÃO (ELO) E RESISTÊNCIA À TRAÇÃO (RT)) E PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA (PVA) DOS FILMES COMESTÍVEIS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO E À BASE DE GELATINA COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO

| Formulação                                   | ELO (%)                     | RT (MPa)                 | PVA (g.mm/kPa.h.m <sup>2</sup> ) |
|--|-----------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| <b>Filme de farinha da amêndoa de pinhão</b> |                             |                          |                                  |
| PF1  | 27,60 <sup>bc</sup> ±2,66   | 2,32 <sup>c</sup> ±0,21  | 0,34 <sup>c</sup> ±0,03          |
| PF2  | 40,26 <sup>a</sup> ±3,89    | 4,39 <sup>b</sup> ±0,35  | 0,18 <sup>d</sup> ±0,02          |
| PF3  | 26,11 <sup>c</sup> ±3,39    | 0,60 <sup>d</sup> ±0,07  | 0,90 <sup>a</sup> ±0,05          |
| PF4  | 32,33 <sup>b</sup> ±3,74    | 1,97 <sup>c</sup> ±0,14  | 0,66 <sup>b</sup> ±0,03          |
| PF5  | 25,83 <sup>c</sup> ±2,20    | 2,20 <sup>c</sup> ±0,14  | 0,44 <sup>c</sup> ±0,06          |
| PF6  | 44,51 <sup>a</sup> ±2,20    | 5,06 <sup>a</sup> ±0,73  | 0,14 <sup>d</sup> ±0,02          |
| PF7  | 22,98 <sup>c</sup> ±1,70    | 0,66 <sup>d</sup> ±0,05  | 1,00 <sup>a</sup> ±0,05          |
| PF8  | 24,00 <sup>c</sup> ±1,72    | 1,77 <sup>c</sup> ±0,19  | 0,61 <sup>b</sup> ±0,04          |
| <b>Filme de gelatina</b>                     |                             |                          |                                  |
| GF1  | 145,71 <sup>bc</sup> ±14,54 | 2,38 <sup>bc</sup> ±0,27 | 0,67 <sup>c</sup> ±0,05          |
| GF2  | 120,25 <sup>cd</sup> ±17,31 | 3,61 <sup>a</sup> ±0,26  | 0,49 <sup>d</sup> ±0,04          |
| GF3  | 199,86 <sup>a</sup> ±20,18  | 2,51 <sup>bc</sup> ±0,19 | 0,88 <sup>ab</sup> ±0,09         |
| GF4  | 171,09 <sup>ab</sup> ±22,13 | 2,83 <sup>b</sup> ±0,25  | 0,74 <sup>bc</sup> ±0,05         |
| GF5  | 97,02 <sup>de</sup> ±10,03  | 2,17 <sup>c</sup> ±0,29  | 0,68 <sup>c</sup> ±0,03          |
| GF6  | 86,37 <sup>e</sup> ±7,74    | 3,88 <sup>a</sup> ±0,41  | 0,28 <sup>e</sup> ±0,04          |
| GF7  | 153,41 <sup>b</sup> ±15,75  | 2,35 <sup>bc</sup> ±0,13 | 0,92 <sup>a</sup> ±0,06          |
| GF8  | 158,19 <sup>b</sup> ±14,34  | 2,39 <sup>bc</sup> ±0,25 | 0,74 <sup>bc</sup> ±0,02         |

Resultado expresso em média ± desvio padrão.

Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam uma diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

FONTE: Autor (2024).

TABELA 15 – COEFICIENTES DE REGRESSÃO E ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ELONGAÇÃO (ELO), RESISTÊNCIA À TRAÇÃO (RT) E PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA (PVA) DOS FILMES COMESTÍVEIS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO E À BASE DE GELATINA COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO

| Coeficientes   | Filme de farinha da amêndoa de pinhão |          |                                  | Filme de gelatina |          |                                  |
|----------------|---------------------------------------|----------|----------------------------------|-------------------|----------|----------------------------------|
|                | ELO (%)                               | RT (MPa) | PVA (g.mm/kPa.h.m <sup>2</sup> ) | ELO (%)           | RT (MPa) | PVA (g.mm/kPa.h.m <sup>2</sup> ) |
| $\beta_0$      | 30,498*                               | 2,371*   | 0,528*                           | 141,488*          | 2,782*   | 0,675*                           |
| $\beta_1$      | 4,868*                                | 0,926*   | -0,152*                          | -7,512*           | 0,429*   | -0,112*                          |
| $\beta_2$      | -4,143*                               | -1,121*  | 0,234*                           | 29,150*           | -0,264*  | 0,146*                           |
| $\beta_3$      | -1,168*                               | 0,053    | -0,005                           | -17,740*          | -0,051   | -0,020                           |
| $\beta_{12}$   | -3,058*                               | -0,306*  | -0,039*                          | 1,515*            | -0,340*  | 0,032*                           |
| $\beta_{13}$   | 0,058                                 | 0,067    | -0,062*                          | 6,045*            | 0,044    | -0,032*                          |
| $\beta_{23}$   | -1,698*                               | -0,086*  | -0,012                           | 2,902*            | -0,100*  | 0,032*                           |
| <b>ANOVA</b>   |                                       |          |                                  |                   |          |                                  |
| $R^2$          | 0,9673                                | 0,9922   | 0,9919                           | 0,9957            | 0,9677   | 0,9431                           |
| $R^2_{adj.}$   | 0,9557                                | 0,9894   | 0,9891                           | 0,9942            | 0,9663   | 0,9230                           |
| $F_{tab}$      | 2,77                                  | 2,90     | 2,90                             | 2,70              | 2,90     | 2,77                             |
| $F_{cal}$      | 106,17                                | 422,15   | 468,98                           | 654,79            | 104,13   | 49,97                            |
| <b>p-Valor</b> | <0,001                                | <0,001   | <0,001                           | <0,001            | <0,001   | <0,001                           |

$\beta_0$  – Intercepto;  $\beta_1$  - coeficiente linear da concentração da matriz utilizada (FAP ou GB);  $\beta_2$  - coeficiente linear da concentração de glicerol;  $\beta_3$  - coeficiente linear da concentração de pó da casca de pinhão;  $\beta_{12}$  = coeficiente da interação entre a concentração da matriz utilizada (FAP ou GB) e a concentração de glicerol;  $\beta_{13}$  = coeficiente da interação entre concentração da matriz utilizada (FAP ou GB) e a concentração de pó da casca de pinhão; e  $\beta_{23}$  = coeficiente da interação entre a concentração de glicerol e a concentração de pó da casca de pinhão.

$F_{cal}$  - Razão entre o quadrado médio da regressão e o quadrado médio dos resíduos;  $F_{tab}$  – Tabelado para o teste de Fisher usando o nível de significância e graus de liberdade.

\* Significância estatística (p-valor) relatada como  $p < 0,05$ .

FONTE: Autor (2024).

Os filmes de farinha da amêndoa de pinhão apresentaram variação de 22,98 a 44,51% para ELO e de 0,60 a 5,06 MPa para RT, enquanto os filmes de gelatina obtiveram valores entre 86,37 e 199,86% para ELO e entre 2,17 e 3,88 MPa para RT. Nos filmes de farinha da amêndoa de pinhão as formulações PF2 e PF6 apresentaram os maiores valores de alongação (40,26 e 44,51%) e resistência à tração (4,39 e 5,06 MPa). Já para os filmes à base de gelatina, as formulações GF2 e GF6 embora não apresentem os maiores valores de alongação (120,25 e 86,37%), são as que possuem maiores valores de RT (3,61 e 3,88 MPa), sendo as que conferem flexibilidade e resistência aos filmes. Para as propriedades mecânicas de ELO e RT as Eqs. 17, 18, 19 e 20 representam o modelo polinomial de primeira ordem proposto para dados experimentais, contendo apenas termos estatisticamente significativos, sendo as Eqs 17 e 18 correspondentes a ELO e RT dos filmes de farinha da amêndoa de pinhão e as Eqs 19 e 20 correspondem a ELO e RT dos filmes de gelatina:

$$ELO_{PF} = 30,498 + 4,868x_1 - 4,143x_2 - 1,168x_3 - 3,058x_1x_2 - 1,698x_2x_3 \quad (\text{Eq. 17})$$

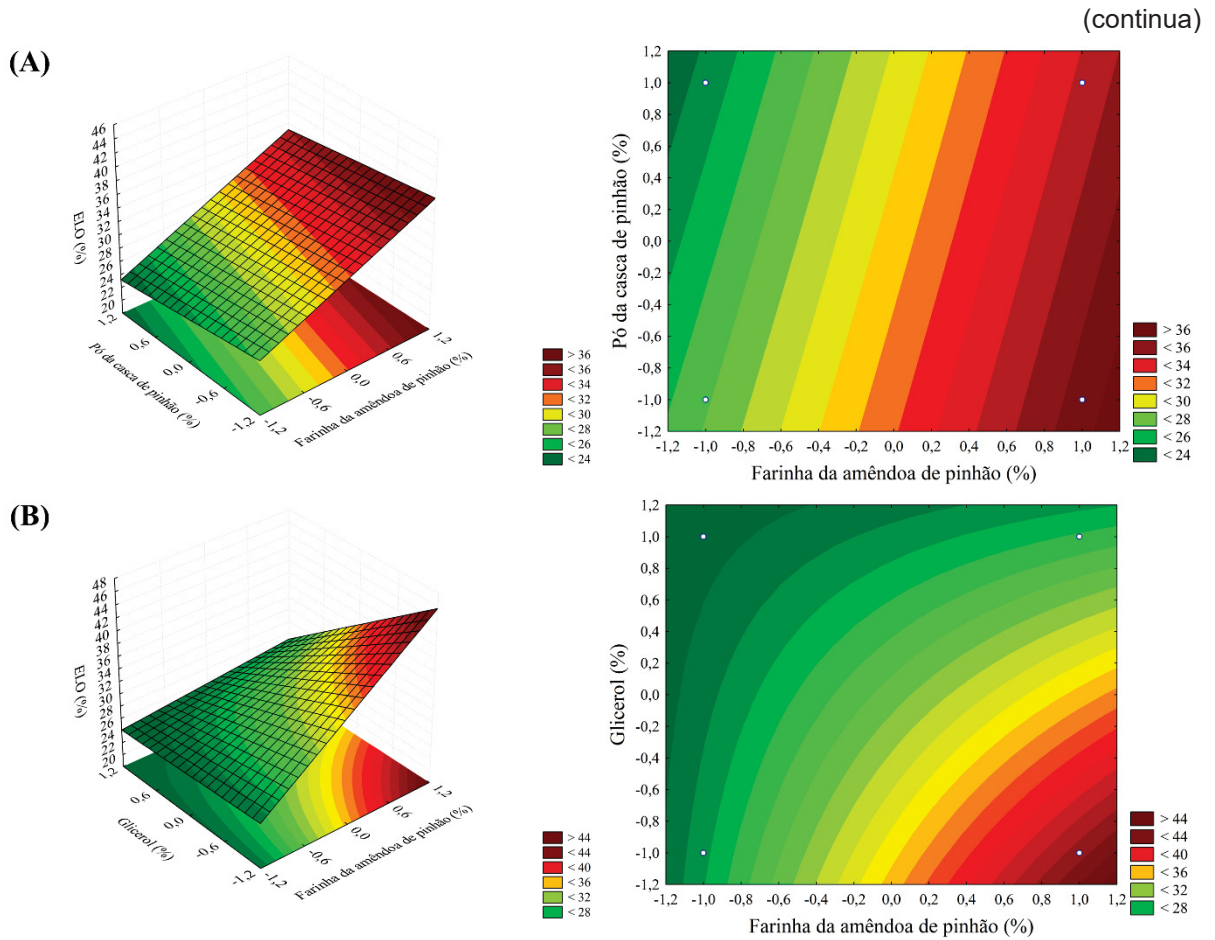
$$RT_{PF} = 2,371 + 0,926x_1 - 1,121x_2 - 0,306x_1x_2 - 0,086x_2x_3 \quad (\text{Eq. 18})$$

$$ELO_{GF} = 141,488 - 7,512x_1 + 29,150x_2 - 17,740x_3 + 1,515x_1x_2 + 6,045x_1x_3 + 2,902x_2x_3 \quad (\text{Eq. 19})$$

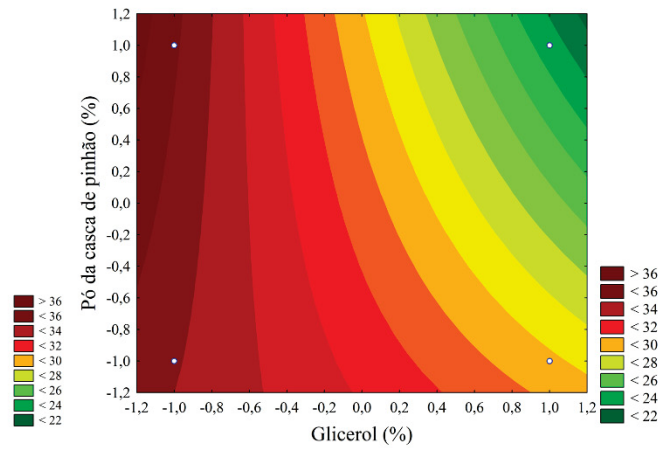
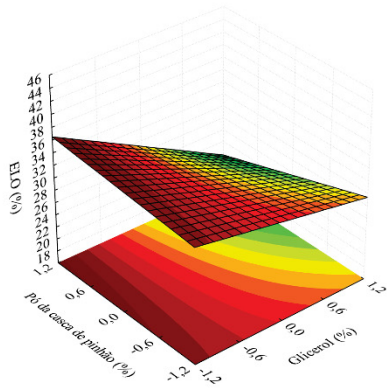
$$RT_{GF} = 2,782 + 0,429x_1 - 0,264x_2 - 0,340x_1x_2 - 0,100x_2x_3 \quad (\text{Eq. 20})$$

A partir das Equações 17-20, foram geradas as superfícies de resposta (FIGURAS 10 e 11). De acordo com as FIGURAS 10 e 11 as formulações em que foram empregadas maiores quantidades de glicerol apresentaram menores valores de ELO e RT.

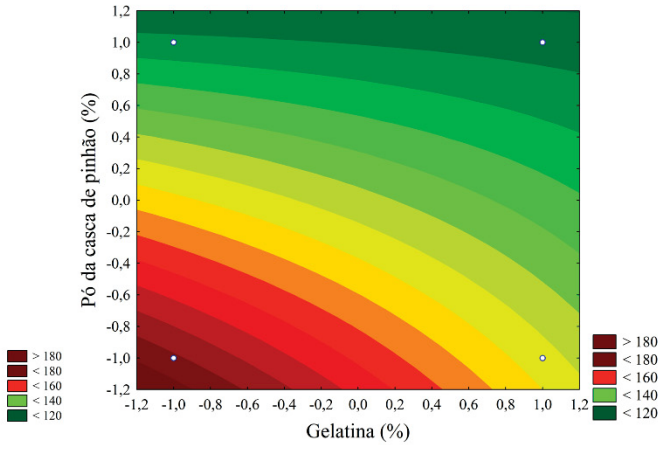
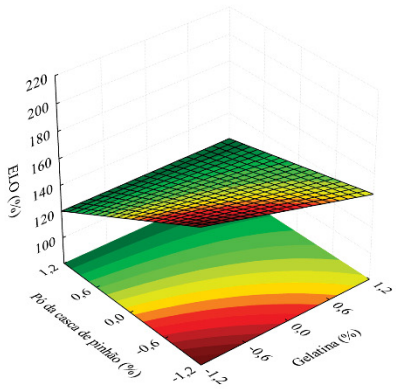
FIGURA 10 – SUPERFÍCIES DE RESPOSTA GERADAS PARA A VARIÁVEL ELONGAÇÃO (ELO %) EM FILMES DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO (A-C) E FILMES DE GELATINA (D-F) COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO



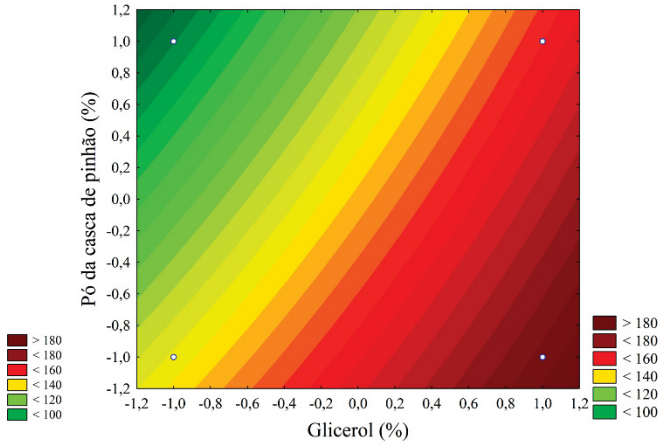
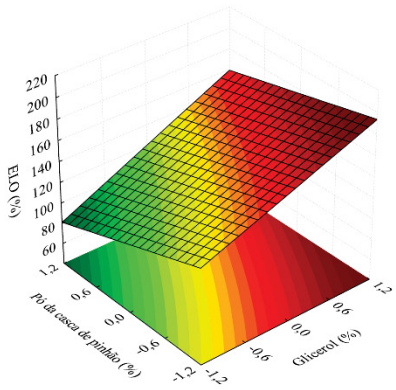
(C)



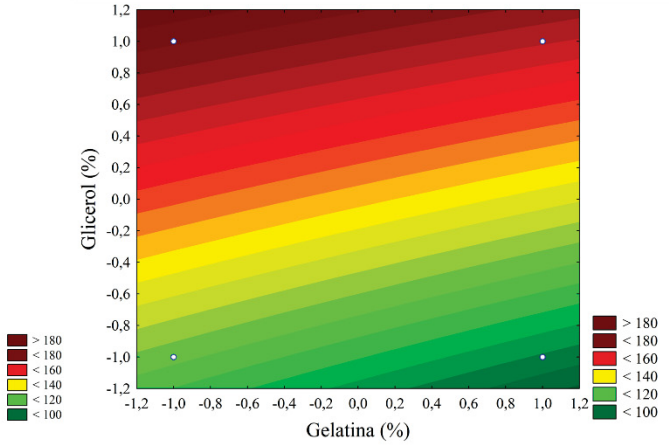
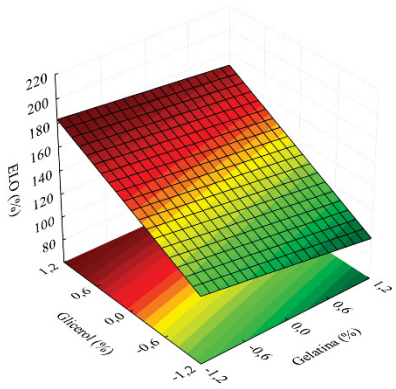
(D)



(E)



(F)

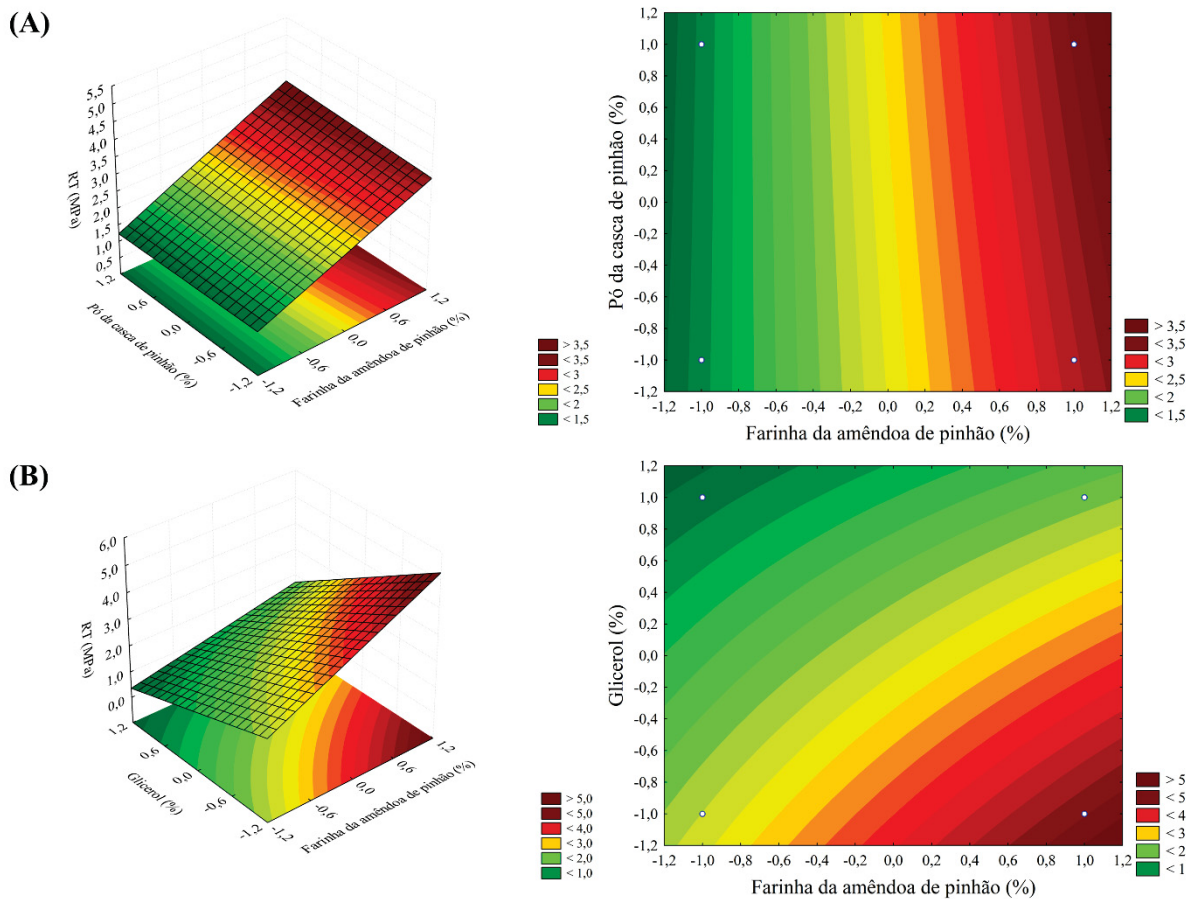


FONTE: Autor (2024).

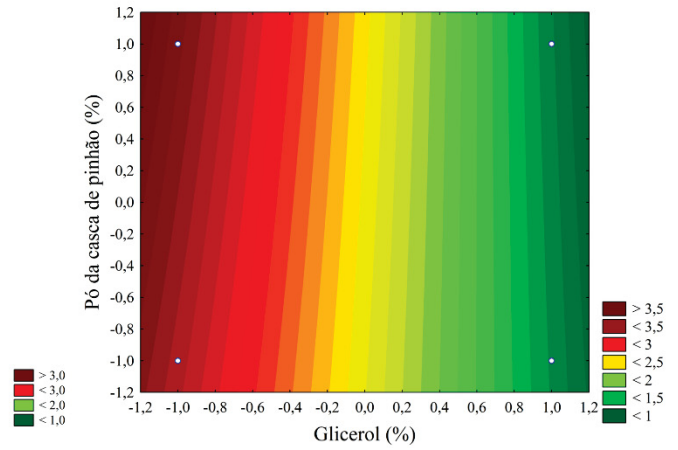
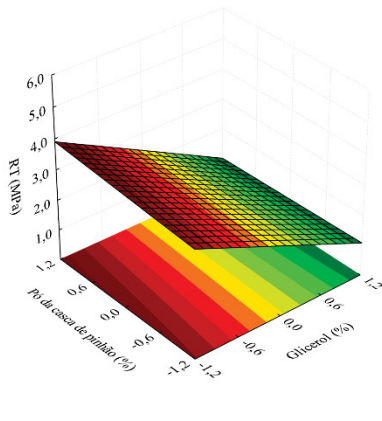
A incorporação do pó da casca de pinhão como fonte de fibras aos filmes proporcionou alterações nas propriedades mecânicas, reduzindo a ELO e aumentando a RT dos filmes (FIGURAS 10 e 11), sendo esse comportamento semelhante ao relatado em filmes com adição material como reforçador de estrutura (Daudt *et al.*, 2017; Lehman; Phengthai; Chinpa, 2018). De modo geral os melhores valores para essas propriedades foram obtidos nas formulações PF6 e GF6, que contêm 0,4% de pó da casca. Esse aumento pode ter se dado devido a presença de interações intermoleculares entre os componentes do filme, podendo essa ser a principal razão para o aumento significativo de ELO e RT (Chambi; Grosso, 2011).

FIGURA 11 – SUPERFÍCIES DE RESPOSTA GERADAS PARA A VARIÁVEL RESISTÊNCIA À TRAÇÃO (RT) EM FILMES DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO (A-C) E FILMES DE GELATINA (D-F) COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO

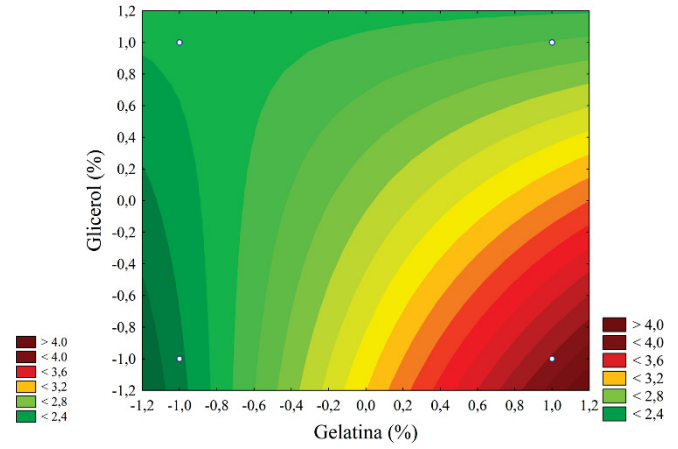
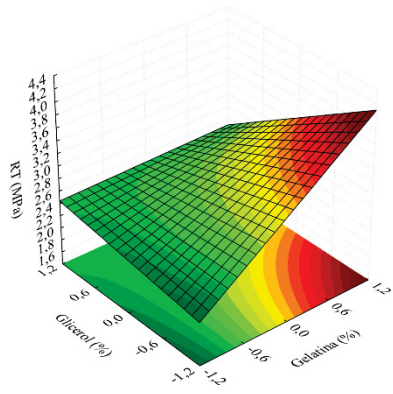
(continua)



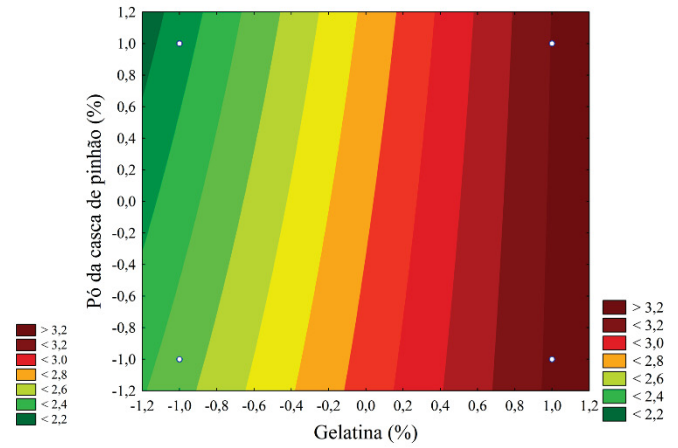
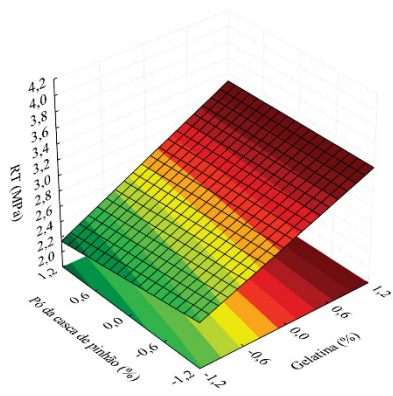
(C)



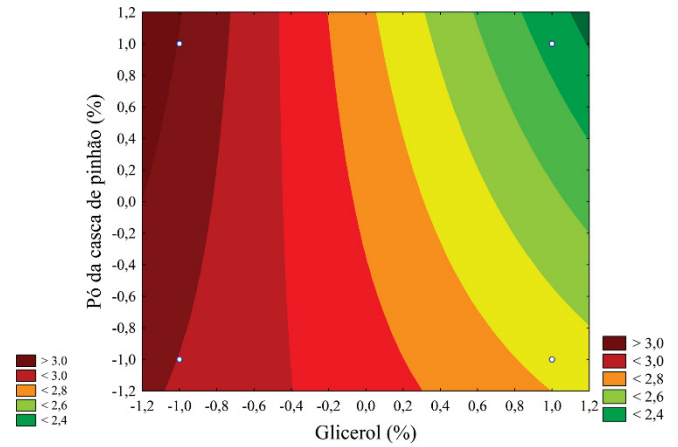
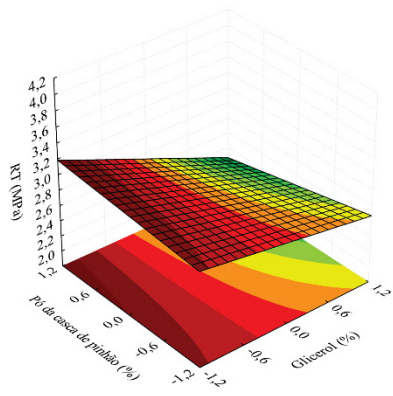
(D)



(E)



(F)



FONTE: Autor (2024).

Souza *et al.* (2012) relataram uma diminuição destas propriedades à medida que o teor de glicerol aumentou, no desenvolvimento de filmes biodegradáveis de fécula de mandioca com adição de nanopartículas de argila. Estudo similar foi realizado por Daudt *et al.* (2017), que desenvolveram filmes de farinha da amêndoa de pinhão com adição de diferentes concentrações de casca de pinhão triturada (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5%), que obtiveram valores de ELO de 4,2 a 19% e RT entre 1,5 e 2,5 MPa, valores até 90,56 % e 70,35% menor em média para ELO e RT, do que os obtidos neste estudo. As formulações PF6 e GF6 apresentam valores muito próximo aos valores encontrados em embalagens convencionais, como o polietileno de baixa densidade (PEBD) que é amplamente utilizado em alimentos. A formulação PF6 apresentou valores até 49,46% de ELO e 84,33% de RT de filmes de PEBD, enquanto a formulação GF6 apresentou valores até 95,97% de ELO e 64,67% de RT de filmes de PEBD; sendo assim essa formulação pode ser considerada como uma alternativa promissora na utilização como embalagem de alimentos (Coutinho; Mello; Maria, 2003; Kusumastuti *et al.*, 2020).

#### 4.3.4 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) é propriedade de barreira importante de ser avaliada no desenvolvimento de filmes, uma vez que avalia a capacidade da água em permear na matriz polimérica do filme, que pode interferir diretamente na vida de prateleira do alimento (Adilah; Jamilah; Nur Hanani, 2018). Durante os testes de permeabilidade, todos os filmes permaneceram intactos. Foi observado que as quantidades de farinha da amêndoa de pinhão/gelatina e glicerol mostraram efeito significativo. Para os filmes de farinha da amêndoa de pinhão foi observado que o uso do pó da casca de pinhão mostrou efeito de interação entre a farinha da amêndoa de pinhão, enquanto nos filmes de gelatina observou-se efeito de interação do pó da casca de pinhão com a gelatina e com o glicerol (TABELA 15).

A PVA dos filmes diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ), sendo os maiores valores observados para os filmes das formulações PF7 e GF7 (1,00 e 0,92 g.mm/kPa.h.m<sup>2</sup>) e menores para as formulações PF6 e GF6 (0,14 e 0,28 g.mm/kPa.h.m<sup>2</sup>, respectivamente) (TABELA 14). As formulações com maior teor de glicerol foram as que apresentaram maior permeabilidade. Para a PVA as Eqs. 21 e 22 representam o modelo polinomial de primeira ordem proposto para dados

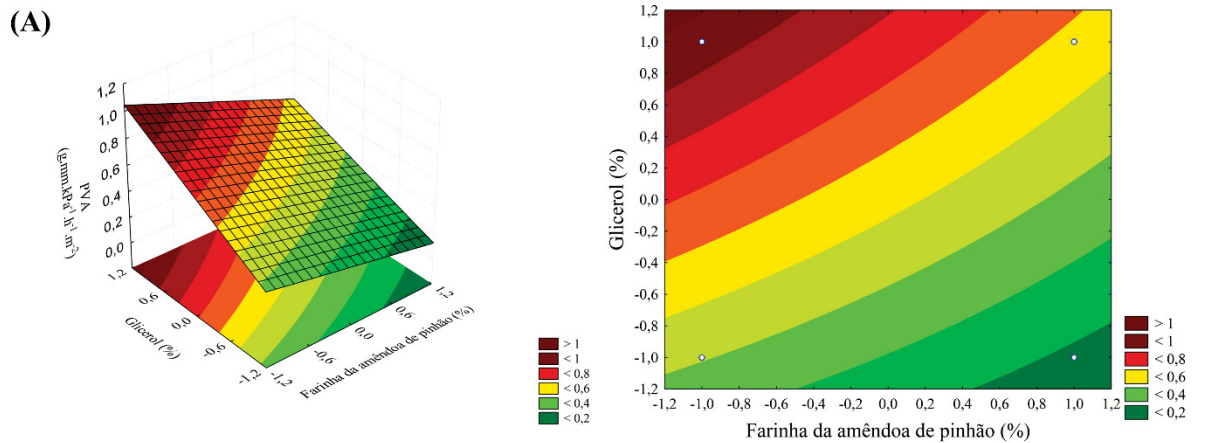
experimentais, contendo apenas termos estatisticamente significativos, sendo a Eq. 21 correspondente a PVA dos filmes de farinha da amêndoa de pinhão e a Eq. 22 corresponde a PVA dos filmes de gelatina:

$$PVA_{PF} = 0,528 - 0,152x_1 + 0,234x_2 - 0,039x_1x_2 - 0,062x_1x_3 \quad (\text{Eq. 21})$$

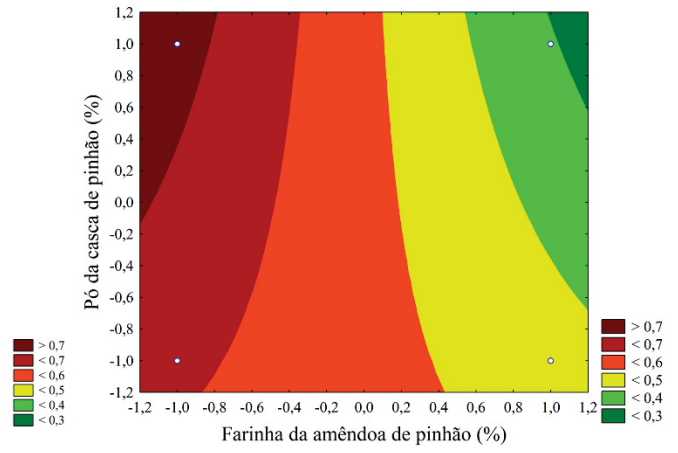
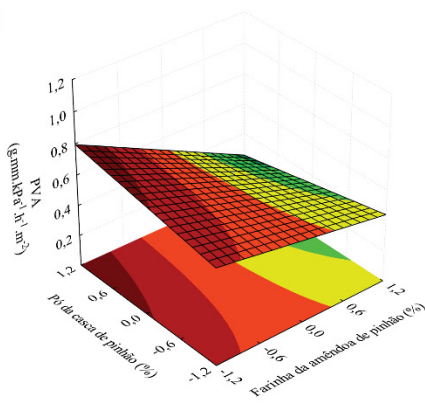
$$PVA_{GF} = 0,675 - 0,112x_1 + 0,146x_2 + 0,032x_1x_2 - 0,032x_1x_3 + 0,032x_2x_3 \quad (\text{Eq. 22})$$

Pode-se observar ainda que a variação da concentração de casca de pinhão também afeta a PVA (FIGURA 12). Comportamento similar foi relatado por alguns estudos na literatura, onde estes relatam que o aumento da concentração de materiais usados como reforçador de estrutura podem levar a uma diminuição da PVA dos filmes (Garavand *et al.*, 2022; Laureanti *et al.*, 2021; Lehman; Phengthai; Chinpa, 2018; Riaz *et al.*, 2020; Sogut; Cakmak, 2020; Sutay Kocabaş *et al.*, 2021). Essa redução da PVA nos filmes com maior teor de casca de pinhão pode ser atribuída ainda a possíveis interações entre os demais componentes dos filmes, aumentando as forças de ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxila no amido presente na farinha da amêndoa de pinhão e a possível distribuição ordenada da casca, dificultando a permeabilidade das moléculas de água (de Carvalho *et al.*, 2021; Sogut; Cakmak, 2020).

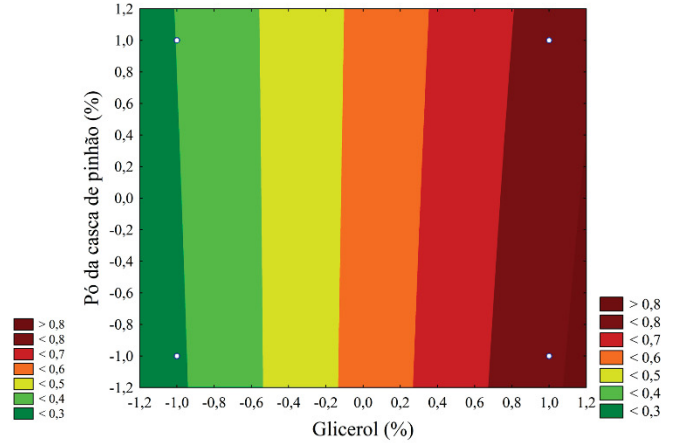
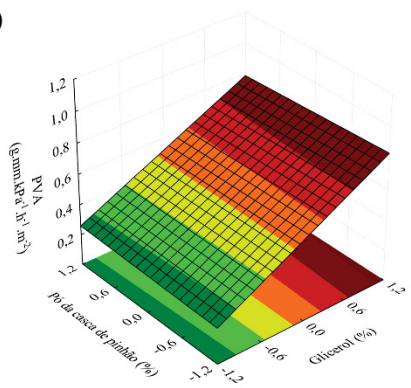
FIGURA 12 – SUPERFÍCIES DE RESPOSTA GERADAS PARA A VARIÁVEL PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA (PVA) EM FILMES DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO (A-C) E FILMES DE GELATINA (D-F) COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO



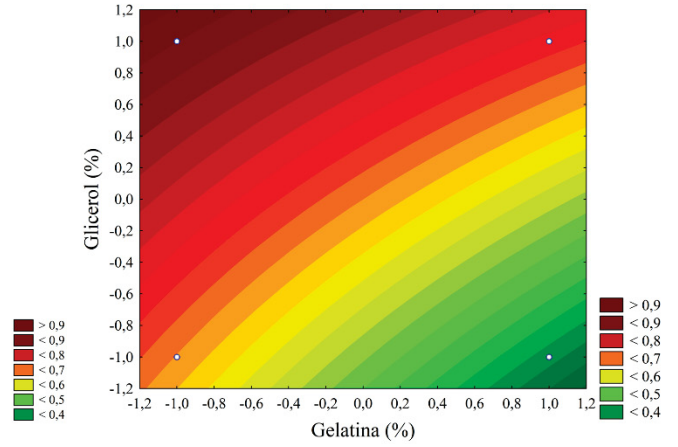
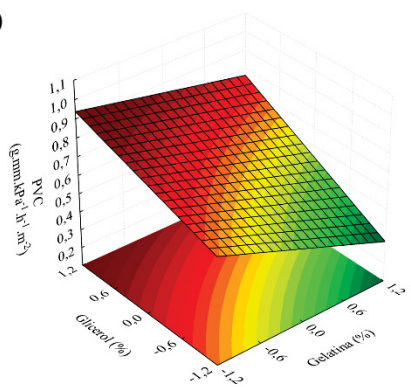
(B)



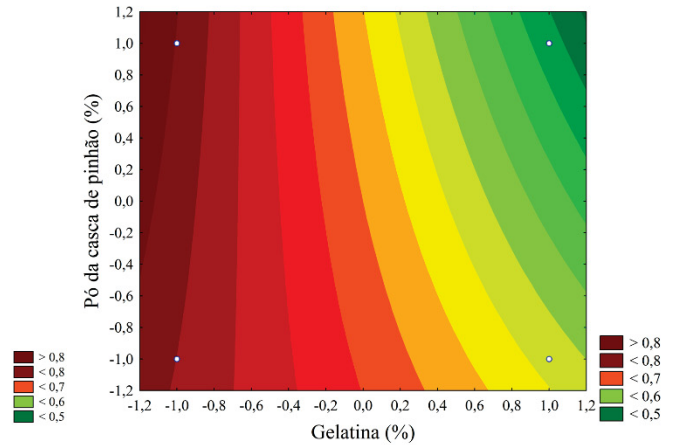
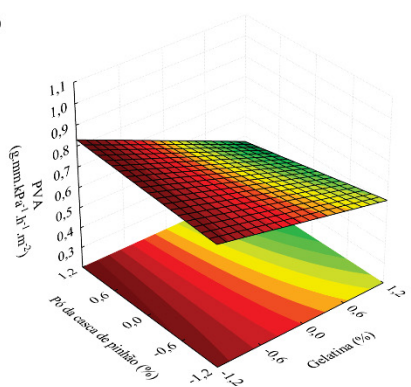
(C)

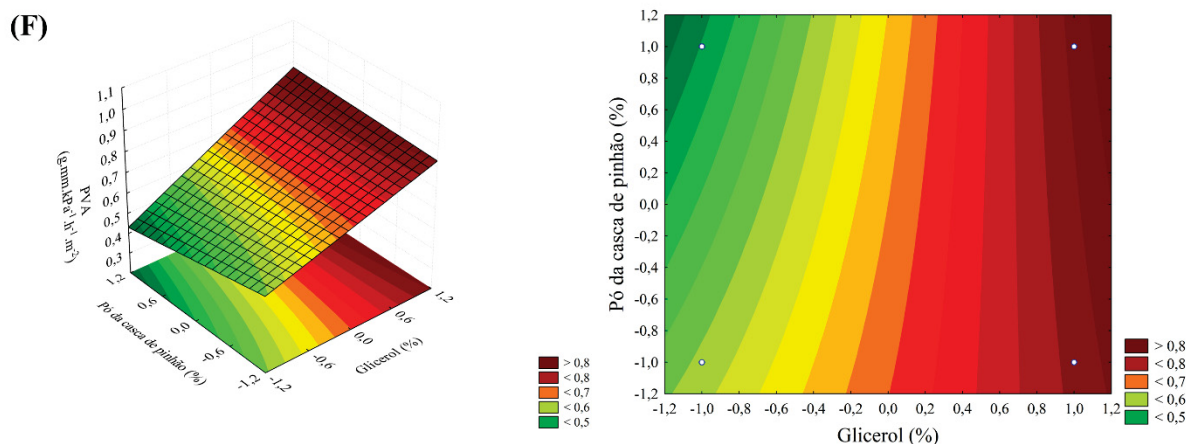


(D)



(E)





FONTE: Autor (2024).

Entretanto, em estudos realizados por Daudt *et al.* (2017) e Spada; Luchese; Tessaro (2018), foram observados comportamento contrário, onde os autores relataram que a presença de casca de pinhão aumentou a PVA entre 1,6 e 3,8 g.mm.kPa<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> para filmes de farinha da amêndoa de pinhão, sendo valores superiores aos obtidos no presente estudo, e entre 0,278 e 0,426 g.mm.kPa<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> em filmes a base de amido, semelhantes aos obtidos. Valores similares foram obtidos por Garavand *et al.* (2022) em filmes à base de amido-PVA reforçado com nanopartículas de quitosana, com valores de PVA variando de 0,28 a 0,41 g.mm.kPa<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> e por Saranti *et al.* (2021) em filmes de gelatina reforçados com nanoemulsão carregada com cloisite Na<sup>+</sup> e OE de pimenta preta, com valores de PVA variando de 0,32 a 0,61 g.mm.kPa<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>.

#### 4.3.5 Caracterização complementar

##### 4.3.5.1 Espessura

Os resultados de espessura dos filmes elaborados apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), sendo obtidos valores de espessura entre 0,124 e 0,167 para os filmes à base de farinha da amêndoa de pinhão e entre 0,096 e 0,140 para os filmes de gelatina (TABELA 16). Pode-se observar que ao aumentar a concentração da casca de pinhão triturada nas formulações dos filmes houve um aumento da espessura, ressaltando que a mesma foi diretamente influenciada pela quantidade de sólidos na solução filmogênica (Silva-Rodrigues *et al.*, 2020).

TABELA 16 – RESULTADOS DE ESPESSURA, SOLUBILIDADE E ÂNGULO DE CONTATO DOS FILMES COMESTÍVEIS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO E À BASE DE GELATINA COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO

| Formulação                                    | Espessura (mm)             | Solubilidade (%)           | Ângulo de Contato (°)     |
|---|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| <b>Filmes de farinha da amêndoa de pinhão</b> |                            |                            |                           |
| PF1   | 0,124 <sup>d</sup> ±0,007  | 25,25 <sup>abc</sup> ±1,63 | 46,60 <sup>bc</sup> ±4,97 |
| PF2   | 0,157 <sup>b</sup> ±0,005  | 26,86 <sup>ab</sup> ±1,46  | 46,03 <sup>bc</sup> ±2,65 |
| PF3   | 0,130 <sup>d</sup> ±0,005  | 28,03 <sup>a</sup> ±1,58   | 35,80 <sup>c</sup> ±2,08  |
| PF4   | 0,167 <sup>a</sup> ±0,006  | 27,14 <sup>a</sup> ±0,65   | 46,93 <sup>b</sup> ±3,44  |
| PF5   | 0,132 <sup>cd</sup> ±0,007 | 22,94 <sup>bcd</sup> ±1,30 | 53,00 <sup>ab</sup> ±3,66 |
| PF6   | 0,148 <sup>b</sup> ±0,003  | 21,28 <sup>cd</sup> ±1,87  | 60,73 <sup>a</sup> ±5,32  |
| PF7   | 0,139 <sup>c</sup> ±0,007  | 22,22 <sup>cd</sup> ±0,99  | 45,03 <sup>bc</sup> ±5,25 |
| PF8   | 0,166 <sup>a</sup> ±0,007  | 19,51 <sup>d</sup> ±1,44   | 44,50 <sup>bc</sup> ±1,83 |
| <b>Filme de gelatina</b>                      |                            |                            |                           |
| GF1   | 0,103 <sup>d</sup> ±0,001  | 30,63 <sup>ab</sup> ±0,56  | 94,87 <sup>a</sup> ±2,21  |
| GF2   | 0,129 <sup>c</sup> ±0,004  | 33,08 <sup>a</sup> ±1,23   | 92,83 <sup>ab</sup> ±1,23 |
| GF3   | 0,096 <sup>d</sup> ±0,004  | 25,36 <sup>c</sup> ±1,85   | 87,18 <sup>b</sup> ±1,50  |
| GF4   | 0,136 <sup>bc</sup> ±0,004 | 31,46 <sup>ab</sup> ±2,49  | 93,11 <sup>ab</sup> ±2,25 |
| GF5   | 0,107 <sup>d</sup> ±0,007  | 28,29 <sup>bc</sup> ±0,35  | 87,23 <sup>b</sup> ±2,51  |
| GF6   | 0,140 <sup>ab</sup> ±0,009 | 32,36 <sup>ab</sup> ±1,68  | 91,10 <sup>ab</sup> ±1,48 |
| GF7   | 0,100 <sup>d</sup> ±0,002  | 29,65 <sup>abc</sup> ±1,43 | 86,70 <sup>b</sup> ±5,19  |
| GF8   | 0,151 <sup>a</sup> ±0,004  | 32,72 <sup>ab</sup> ±1,93  | 88,30 <sup>ab</sup> ±2,76 |

Resultado expresso em média ± desvio padrão. Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam uma diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

FONTE: Autor (2024).

Todos os filmes foram considerados homogêneos, uma vez que apresentaram baixos valores de desvios padrão. No entanto, o aumento da espessura pode influenciar em outras propriedades, como nas propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água e opacidade (Adilah; Jamilah; Nur Hanani, 2018). O mesmo comportamento é relatado por outros autores, ao adicionar compósitos como reforçadores (Daudt *et al.*, 2017; de Carvalho *et al.*, 2019; Lehman; Phengthai; Chinpa, 2018; Marques *et al.*, 2019; Riaz *et al.*, 2020).

#### 4.3.5.2 Solubilidade e ângulo de contato

Uma das características importantes para uma embalagem de alimentos é a solubilidade, onde filmes com alta solubilidade em água resultam em baixa resistência ao aplicar em uma matriz alimentícia (Sganzerla *et al.*, 2020). Os filmes preparados neste estudo não perderam sua integridade em solução aquosa ao final de 24 h, sendo os filmes à base de gelatina os mais solúveis. A solubilidade permaneceu entre 19,51% (PF8) e 28,03% (PF3) para os filmes de farinha da amêndoa de pinhão e entre 25,36% (GF3) e 33,08% (GF2) para os filmes à base de gelatina (TABELA 16).

A adição de maiores níveis de casca de pinhão resultou na diminuição da solubilidade em água para os filmes de farinha da amêndoa de pinhão ( $p < 0,05$ ), enquanto para os filmes de gelatina essa variação não promoveu grandes variações nos valores de solubilidade. O fato dos filmes de gelatina se mostrarem mais solúveis em comparação aos filmes de farinha da amêndoa de pinhão é devido a maior disponibilidade de grupos hidroxilas com o aumento da concentração de glicerol (Ciannamea; Stefani; Ruseckaite, 2014; Ruiz-Martínez; Rodrigue; Solorza-Feria, 2022).

Essa menor solubilidade dos filmes PF pode ser atribuída à interação favorável entre os componentes, conservando os compostos, evitando a geração de poros grandes e diminuindo sua solubilidade (Hazrol *et al.*, 2022; Laureanti *et al.*, 2021). Além disso, a diminuição da solubilidade dos filmes pode ter relação com a presença das fibras e de compostos bioativos presentes na casca de pinhão, que pode estar relacionado à formação de ligações cruzadas na matriz polimérica que contribuiu para redução do caráter hidrofílico e de grupos polares no filme (Choi *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2022).

A solubilidade dos filmes no presente estudo foi inferior à relatada por Spada; Luchese; Tessaro (2018), que observaram solubilidade em filmes à base de amido com adição de casca de pinhão entre 30 e 36%. Os valores obtidos ainda se encontram dentro dos relatados por outros estudos na literatura. Por exemplo, Da Silva *et al.* (2019) obtiveram valores de solubilidade em filmes de pectina e mesocarpo de coco babaçu entre 13,89 e 50,64%; enquanto Ruiz-Martínez; Rodrigue; Solorza-Feria (2022) ao avaliar o efeito de nanoargilas e microfibras de agave em filmes à base de gelatina relatam valores entre 19,7 a 30,7% de solubilidade.

O teste de ângulo de contato da água ( $^{\circ}$ ) dos filmes biodegradáveis incorporados com casca de pinhão triturada se mostraram significativos ( $p < 0,05$ ). Os filmes de farinha da amêndoa de pinhão apresentaram valores entre  $\theta = 35,80^{\circ}$  (PF3) e  $\theta = 60,73^{\circ}$  (PF6), enquanto os filmes de gelatina apresentaram valores de entre  $\theta = 86,70^{\circ}$  (GF7) e  $\theta = 94,87^{\circ}$  (GF2) (TABELA 16).

De acordo com os resultados obtidos todas as amostras dos filmes de farinha da amêndoa de pinhão exibiram valores de ângulo de contato menores que  $65^{\circ}$ , que são indicativos de superfícies hidrofílicas (Piñeros-Hernandez *et al.*, 2017), sendo a amostra PF6 a que apresentou maior caráter hidrofóbico entre os filmes analisados ( $\theta = 60,73^{\circ}$ ). Os filmes de gelatina geralmente apresentam caráter mais hidrofóbico. Essa

hidrofobicidade dos filmes de gelatina pode ser devido ao rearranjo da parte hidrofóbica das moléculas de gelatina no ar durante a gelificação (Liu *et al.*, 2022). Esse caráter hidrofóbico das formulações PF6 e GF6 podem estar associados ainda com a menor PVA obtida nessas formulações.

Os valores de ângulo de contato obtidos em nosso estudo se encontraram dentro dos relatados por Spada; Luchese; Tessaro (2018), que relataram valores de ângulo de contato variando de  $\theta = 22^\circ$  e  $103^\circ$  entre em filmes de fécula de mandioca com pós de casca de pinhão não tratados e tratados. O aumento da hidrofobicidade da superfície do filme PF6 pode ser atribuído a presença de compostos fenólicos presentes no pó da casca de pinhão, que podem ter migrado para a superfície do filme durante o processo de secagem, bem como nos teores de lipídios, proteínas e, provavelmente, lignina presentes na casca de pinhão (de Carvalho *et al.*, 2021; Piñeros-Hernandez *et al.*, 2017). Tendência semelhante de resultados foi observada em filmes de gelatina bovina reforçados com bionanocompósitos de nanocristais de gelatina-celulose, que obtiveram valores do ângulo de contato com a água entre  $80,7^\circ$  e  $95,2^\circ$  (Leite *et al.*, 2020).

#### 4.3.5.3 Propriedades ópticas

Como esperado, a adição de diferentes quantidades de casca de pinhão promoveu alteração nos valores dos parâmetros de cor (TABELA 17). Os filmes exibiram diferenças significativas entre si para todos os parâmetros de cor ( $p < 0,05$ ). Como esperado, a adição de maior quantidade de casca de pinhão triturada (0,4%) resultou em filmes com menores valores de  $L^*$ , resultando em filmes mais escuros e com maiores valores de  $a^*$ ,  $b^*$  e  $\Delta E$ . Resultados semelhantes foram relatados em filmes elaborados à base de farinha da amêndoa de pinhão (Daudt *et al.*, 2017) e a base de amido (Spada; Luchese; Tessaro, 2018), bem como em filmes de gelatina incorporados com microfibras e nanoargilas de agave (Ruiz-Martínez; Rodrigue; Solorza-Feria, 2022) e com pó de casca de laranja (Taghavi Kevij *et al.*, 2021).

Os valores de  $a^*$  e  $b^*$  indicam que os filmes são mais avermelhados e amarelos, proporcionando-lhes uma coloração de aspecto alaranjado. Esse comportamento para os parâmetros de cor podem ser atribuído à presença de compostos fenólicos, flavonoides e taninos, além de outras substâncias extrativas presentes na casca de pinhão (Dorneles; Noreña, 2020; Timm *et al.*, 2020).

TABELA 17 – RESULTADOS DAS PROPRIEDADES ÓPTICAS DOS FILMES COMESTÍVEIS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO E À BASE DE GELATINA COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO

| Formulação                                    | L*                        | a*                        | b*                        | ΔE                        | Opacidade                |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| <b>Filmes de farinha da amêndoa de pinhão</b> |                           |                           |                           |                           |                          |
| <b>PF1</b>                                    | 73,47 <sup>a</sup> ±0,79  | 9,53 <sup>d</sup> ±0,50   | 27,66 <sup>e</sup> ±0,82  | 35,81 <sup>e</sup> ±1,23  | 4,43 <sup>ab</sup> ±0,32 |
| <b>PF2</b>                                    | 71,77 <sup>a</sup> ±1,33  | 9,27 <sup>d</sup> ±0,83   | 30,02 <sup>d</sup> ±1,37  | 38,52 <sup>d</sup> ±2,05  | 3,73 <sup>bc</sup> ±0,23 |
| <b>PF3</b>                                    | 65,60 <sup>b</sup> ±0,94  | 14,80 <sup>c</sup> ±0,58  | 34,09 <sup>c</sup> ±0,89  | 46,94 <sup>c</sup> ±1,40  | 3,84 <sup>bc</sup> ±0,34 |
| <b>PF4</b>                                    | 65,35 <sup>b</sup> ±0,25  | 13,91 <sup>c</sup> ±0,09  | 34,88 <sup>c</sup> ±0,14  | 47,36 <sup>c</sup> ±0,25  | 3,01 <sup>c</sup> ±0,23  |
| <b>PF5</b>                                    | 59,16 <sup>c</sup> ±1,08  | 20,04 <sup>b</sup> ±0,59  | 37,96 <sup>b</sup> ±0,74  | 55,55 <sup>b</sup> ±1,31  | 5,15 <sup>a</sup> ±0,45  |
| <b>PF6</b>                                    | 57,74 <sup>c</sup> ±0,21  | 19,68 <sup>b</sup> ±0,12  | 38,11 <sup>b</sup> ±0,22  | 56,43 <sup>b</sup> ±0,28  | 4,27 <sup>ab</sup> ±0,30 |
| <b>PF7</b>                                    | 52,36 <sup>d</sup> ±0,93  | 25,18 <sup>a</sup> ±0,53  | 39,62 <sup>a</sup> ±0,51  | 63,12 <sup>a</sup> ±0,94  | 5,10 <sup>a</sup> ±0,43  |
| <b>PF8</b>                                    | 57,93 <sup>c</sup> ±1,93  | 19,71 <sup>b</sup> ±0,69  | 37,18 <sup>b</sup> ±0,08  | 55,70 <sup>b</sup> ±1,13  | 4,53 <sup>ab</sup> ±0,35 |
| <b>Filme de gelatina</b>                      |                           |                           |                           |                           |                          |
| <b>GF1</b>                                    | 76,61 <sup>a</sup> ±2,19  | 4,59 <sup>cd</sup> ±0,37  | 18,91 <sup>c</sup> ±2,29  | 25,38 <sup>d</sup> ±3,12  | 2,86 <sup>a</sup> ±0,11  |
| <b>GF2</b>                                    | 71,64 <sup>ab</sup> ±1,60 | 5,48 <sup>c</sup> ±0,63   | 23,37 <sup>b</sup> ±1,72  | 32,07 <sup>c</sup> ±2,40  | 1,29 <sup>d</sup> ±0,13  |
| <b>GF3</b>                                    | 67,05 <sup>bc</sup> ±1,20 | 3,50 <sup>d</sup> ±0,41   | 21,18 <sup>bc</sup> ±0,87 | 33,64 <sup>bc</sup> ±1,33 | 2,20 <sup>bc</sup> ±0,18 |
| <b>GF4</b>                                    | 72,95 <sup>a</sup> ±2,08  | 4,85 <sup>cd</sup> ±0,43  | 20,32 <sup>bc</sup> ±1,54 | 28,93 <sup>cd</sup> ±2,38 | 1,24 <sup>d</sup> ±0,11  |
| <b>GF5</b>                                    | 64,23 <sup>c</sup> ±2,59  | 11,50 <sup>a</sup> ±1,39  | 30,41 <sup>a</sup> ±2,61  | 43,47 <sup>a</sup> ±3,91  | 2,01 <sup>c</sup> ±0,11  |
| <b>GF6</b>                                    | 64,87 <sup>c</sup> ±1,73  | 10,92 <sup>ab</sup> ±0,89 | 30,99 <sup>a</sup> ±1,31  | 43,28 <sup>a</sup> ±2,30  | 2,20 <sup>bc</sup> ±0,21 |
| <b>GF7</b>                                    | 66,56 <sup>c</sup> ±3,91  | 9,68 <sup>b</sup> ±1,15   | 28,11 <sup>a</sup> ±2,50  | 39,87 <sup>ab</sup> ±4,08 | 2,57 <sup>ab</sup> ±0,13 |
| <b>GF8</b>                                    | 66,85 <sup>bc</sup> ±3,27 | 9,38 <sup>b</sup> ±1,02   | 29,69 <sup>a</sup> ±3,06  | 40,68 <sup>a</sup> ±4,09  | 2,15 <sup>d</sup> ±0,02  |

Resultado expresso em média ± desvio padrão. Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam uma diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

FONTE: Autor (2024).

A opacidade dos filmes apresentou o mesmo comportamento dos parâmetros de cor, sendo observado que os filmes com maior quantidade de casca se mostraram mais opacos. Os filmes apresentaram valores de opacidade variando entre 3,01 (PF4) e 5,15 (PF5) e entre 1,24 (GF4) e 2,86 (GF1), apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) (TABELA 17). A capacidade de bloquear UV pode ser atribuída à presença de compostos fenólicos na estrutura do filme, devido a adição da casca de pinhão, pois os anéis fenólicos de compostos bioativos são capazes de aumentar a propriedade de proteção UV dos filmes (Ghadiri Alamdari; Salmasi; Almasi, 2021; López-Palestina *et al.*, 2019). Além disso, outros diversos fatores podem influenciar opacidade dos filmes, como a presença de aditivos, condições de processamento, espessura e heterogeneidade interna e superficial da estrutura do filme (Silva-Rodrigues *et al.*, 2020).

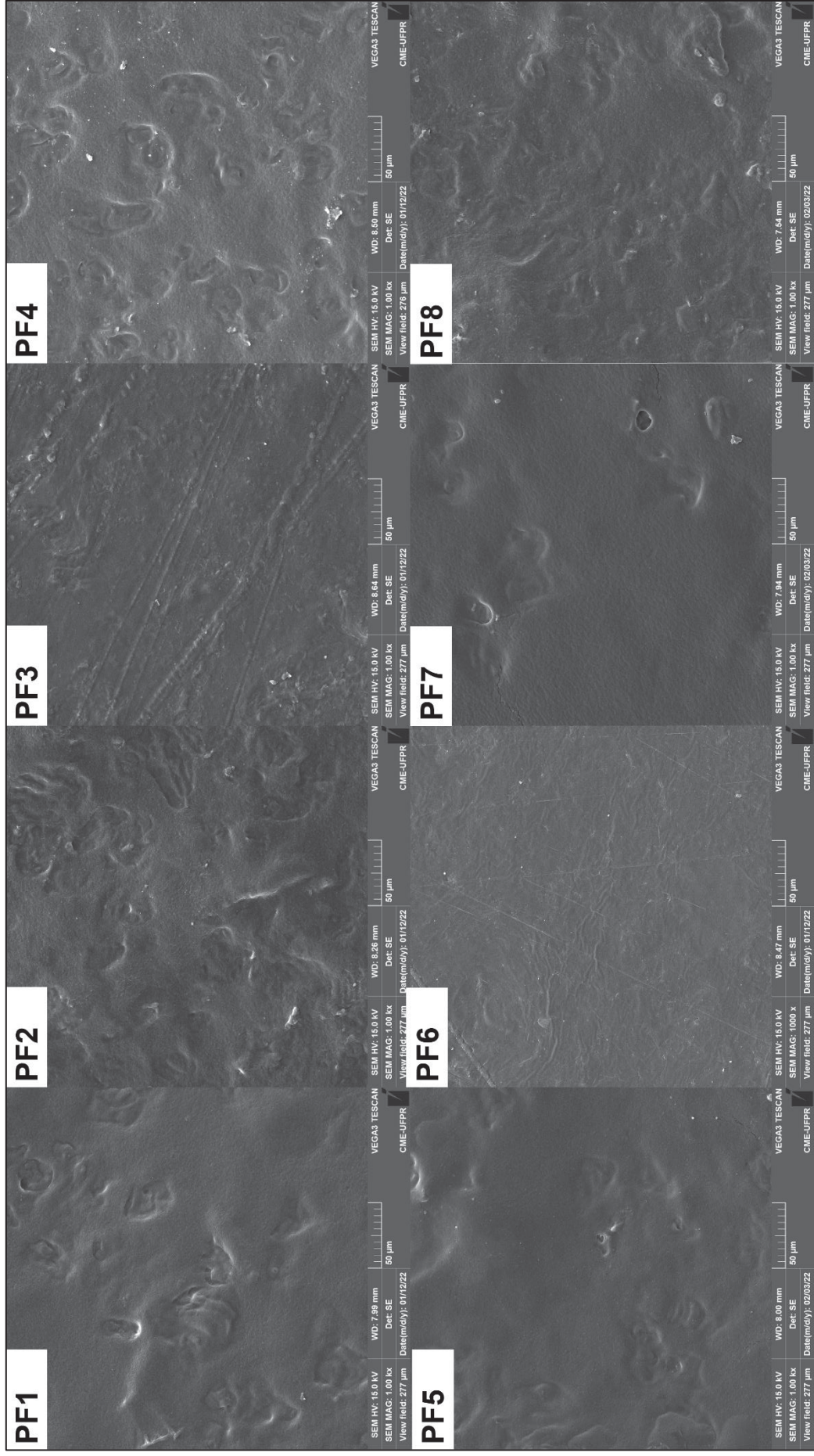
A opacidade é uma propriedade que, além de impactar na aparência, pode influenciar na vida útil do produto embalado. Embora os filmes transparentes sejam mais favoráveis por proporcionarem ao consumidor a visualização dos produtos, filmes mais opacos, e com coloração mais escura podem ser uma alternativa viável para diferentes tipos de alimentos, uma vez que esses podem proteger os alimentos contra os efeitos negativos da luz, aumentando a vida útil dos alimentos fotossensíveis (Arbeláez *et al.*, 2022; Sogut; Cakmak, 2020).

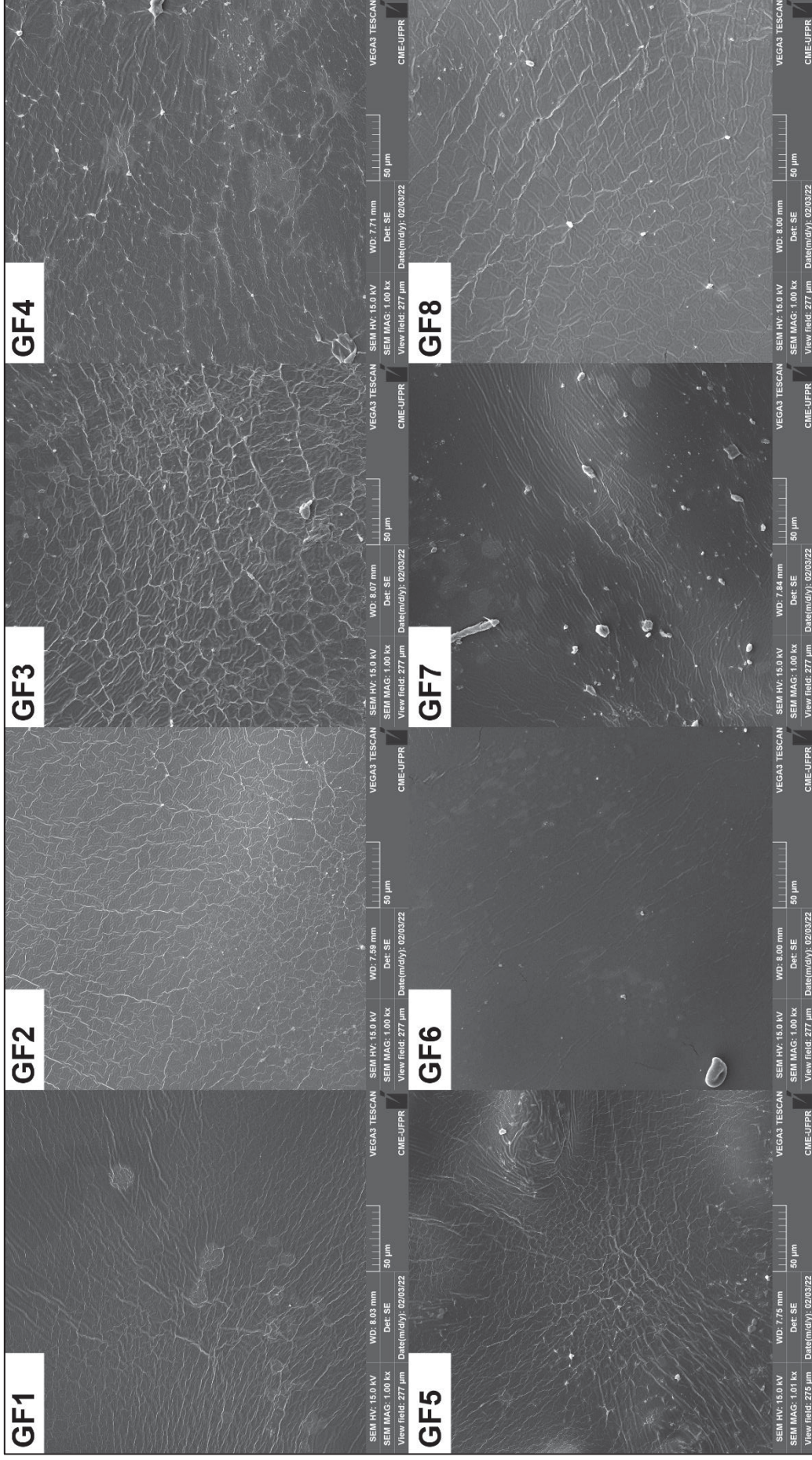
#### 4.3.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Analisando as micrografias dos filmes de farinha da amêndoa de pinhão e gelatina reforçados com casca de pinhão em pó nota-se que, em geral, as superfícies das formulações de todos os filmes analisados mostraram superfície áspera, irregular e sem trincas, provavelmente devido à interação adequada entre todos os componentes (FIGURA 13). Os filmes PF6 e GF6 foram os que apresentaram as superfícies mais regulares, coesas e homogêneas dentre todos os filmes estudados.

Observou-se que a presença da casca de pinhão triturada tornou os filmes mais ásperos e irregulares, devido à presença de fibras no interior da matriz dos filmes. A presença de rugosidade nos filmes pode estar relacionada com a presença de compostos fenólicos presentes na casca de pinhão triturada durante a elaboração dos filmes, que podem ter migrado para a superfície do filme durante a etapa de secagem (Piñeros-Hernandez *et al.*, 2017).

FIGURA 13 –. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DAS SUPERFÍCIES (1000X) DOS FILMES COMESTÍVEIS DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO (PF) E FILMES COMESTÍVEIS DE GELATINA (GF) INCORPORADOS COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO





FONTE: Autor (2024).

Além disso, a maior compactação da superfície dos filmes PF6 e GF6 pode ter ocorrido devido à interação intermolecular na matriz dos filmes que foi favorecida pela composição das formulações, enquanto que nas demais formulações o emaranhamento das cadeias poliméricas nas vias de ligações covalentes e não covalentes podem ter promovido a rugosidade da superfície (Soo; Sarbon, 2018). A adição da casca de pinhão triturada à matriz dos filmes de farinha da amêndoa de pinhão e gelatina podem gerar uma interface mais resistente e, assim, há um aumento na resistência mecânica e resistência à água dos filmes (de Carvalho *et al.*, 2021).

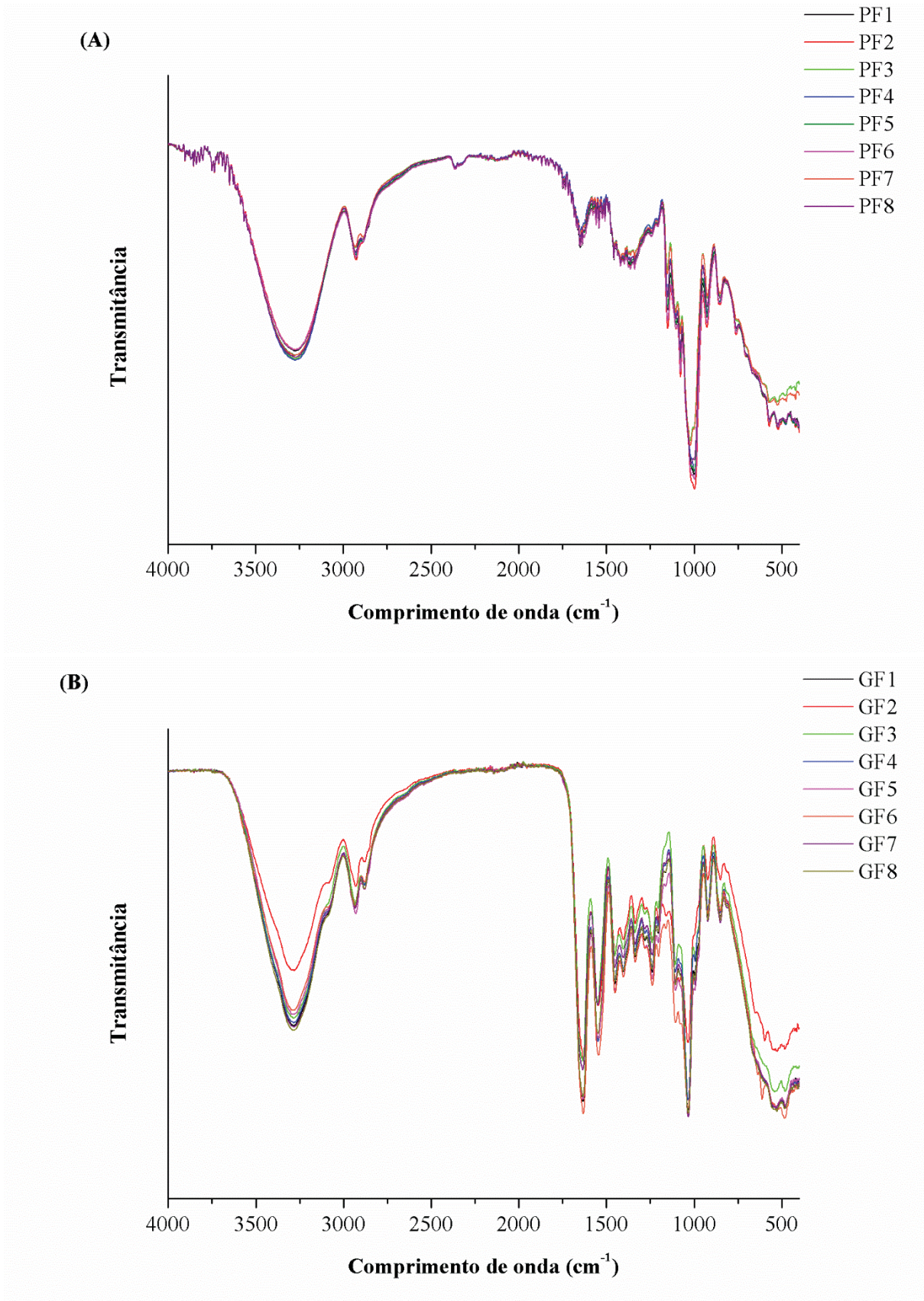
Características semelhantes quanto à rugosidade dos filmes foram relatadas em filmes à base de farinha da amêndoa de pinhão reforçados com pó da casca de pinhão (Daudt *et al.*, 2017), de fécula de mandioca reforçados com engaço de uva (Laureanti *et al.*, 2021) e de gelatina de pele de frango incorporada à farinha de arroz (Soo; Sarbon, 2018).

#### 4.3.5.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de *Fourier* (FTIR)

Os espectros dos filmes formulados com farinha da amêndoa de pinhão com adição da casca de pinhão triturada são mostrados na FIGURA 14A, na qual é possível observar um comportamento de absorção semelhante ( $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ) para os filmes. É possível observar bandas pronunciadas na faixa de  $3290\text{ cm}^{-1}$ , onde estão correlacionados com o alongamento dos grupos -OH característicos da formação de ligações de hidrogênio (Daudt *et al.*, 2017). Nesta região, os filmes PF1, PF2 e PF6 apresentaram bandas menos intensas, o que pode estar relacionado ao menor percentual de glicerol nas respectivas formulações.

Os grupos  $\text{CH}_2$  são identificados nas bandas na região de  $2930\text{ cm}^{-1}$ , cujos picos estão na região entre  $2800\text{ a }3000\text{ cm}^{-1}$  que estão correlacionados com a proporção de amilose e amilopectina; quanto maior a intensidade, maior o teor de amilose (Daudt *et al.*, 2016). Na região do espectro entre  $2335\text{ a }2800\text{ cm}^{-1}$ , vibrações de alongamento C-H assimétricas e simétricas foram observadas para porções alifáticas em polissacarídeos presentes no pinhão (Barros *et al.*, 2021).

FIGURA 14 – ESPECTROS DE FTIR DE FILMES COMESTÍVEIS DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO (A) E DOS FILMES COMESTÍVEIS DE GELATINA (B) COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO



FONTE: Autor (2024).

Foram identificados os picos na região em torno de  $1640\text{ cm}^{-1}$ , cuja região está correlacionada ao grupo amida das proteínas (Liao *et al.*, 2022). Segundo Ramos *et al.* (2013), a região entre  $800$  e  $1150\text{ cm}^{-1}$  está relacionada às bandas de absorção das moléculas de glicerol. Os picos nesta região, principalmente em  $995\text{ cm}^{-1}$  foram característicos de grupos alceno para ligação C-H (Spada; Luchese; Tessaro, 2018), foram menos intensos para as amostras PF3 e PF7. A proporção de farinha da amêndoa de pinhão e glicerol para esses filmes é aproximadamente igual a 1, o que pode estar afetando essa intensidade. Além disso, a casca do pinhão também está afetando esses picos, onde a menor concentração de pó da casca gerou uma menor intensidade de pico nessa região de absorção.

Já para os filmes de gelatina, foram encontrados em todas as amostras picos de absorção na faixa de  $3285$ ,  $1634$ ,  $1238$  e  $1056\text{ cm}^{-1}$  (Figura 14B). O pico em  $3285\text{ cm}^{-1}$  é atribuído ao alongamento dos grupos O-H e N-H na amida A e grupos funcionais de fenol na estrutura do filme. É possível identificar uma redução na intensidade do pico para o filme GF2, que possui maior proporção de gelatina em relação aos demais filmes. Isso pode estar relacionado a uma maior interação gelatina-gelatina em detrimento das ligações de hidrogênio (Riahi *et al.*, 2021).

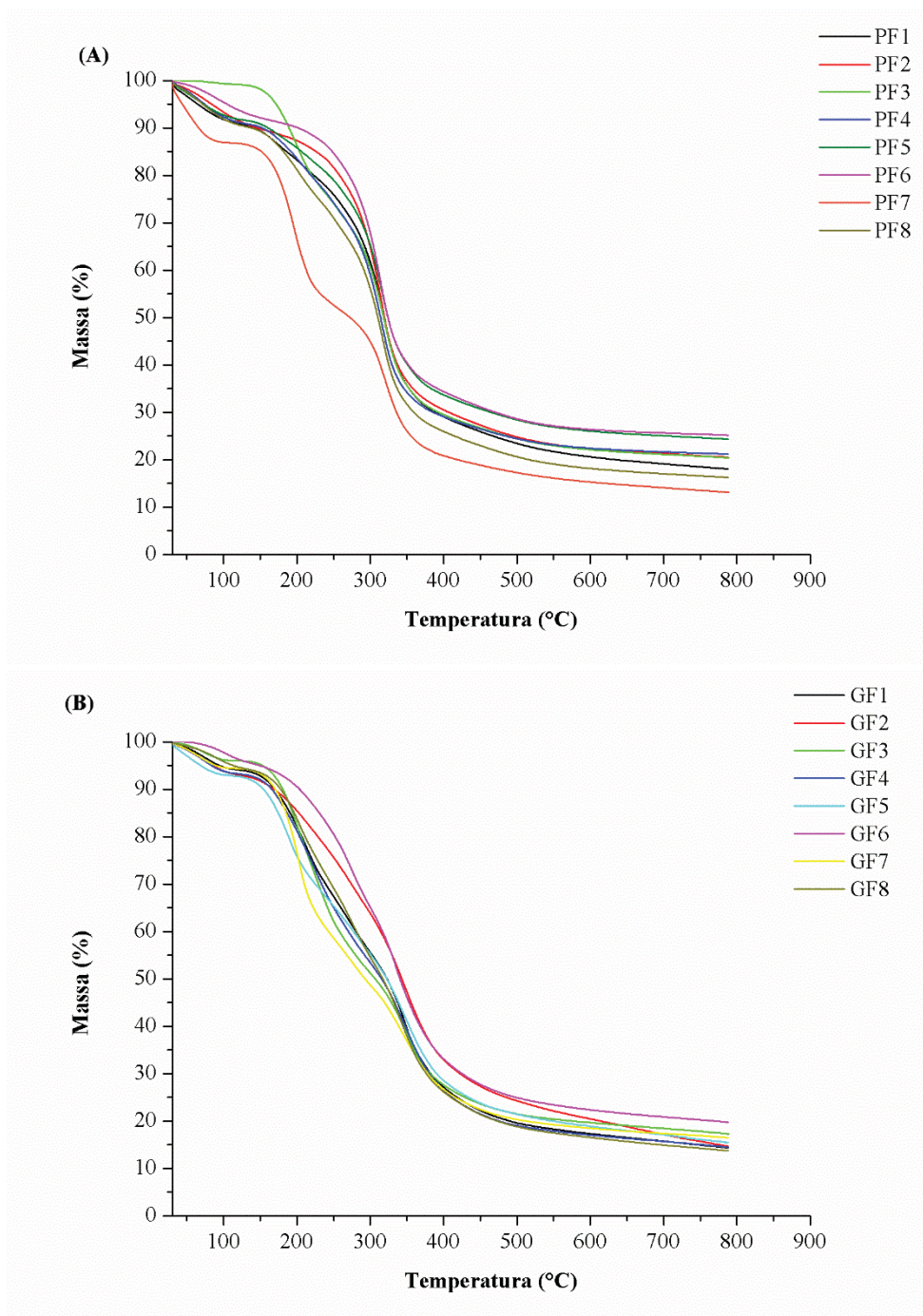
Além disso, os filmes mostraram as bandas características da gelatina no número de onda de  $1634\text{ cm}^{-1}$ ,  $1540\text{ cm}^{-1}$  e  $1238\text{ cm}^{-1}$  correlacionadas com a amida I (ilustrando a vibração de estiramento C=O acoplada com a flexão no plano da ligação N-H e alongamento da ligação C-N), amida II (representando a flexão N-H e alongamento C-N) e amida III (associada à vibração no plano dos grupos C-N e N-H da amina ligada ao longo). O pico em  $1056\text{ cm}^{-1}$  também é destacado, onde significa a interação entre o plastificante (grupos OH do glicerol) e a estrutura do filme de gelatina (Nurul Syahida *et al.*, 2020). Resultados semelhantes foram relatados para filmes de gelatina contendo aditivos (Haghighi *et al.*, 2021; Shankar; Wang; Rhim, 2019; Tavassoli *et al.*, 2021).

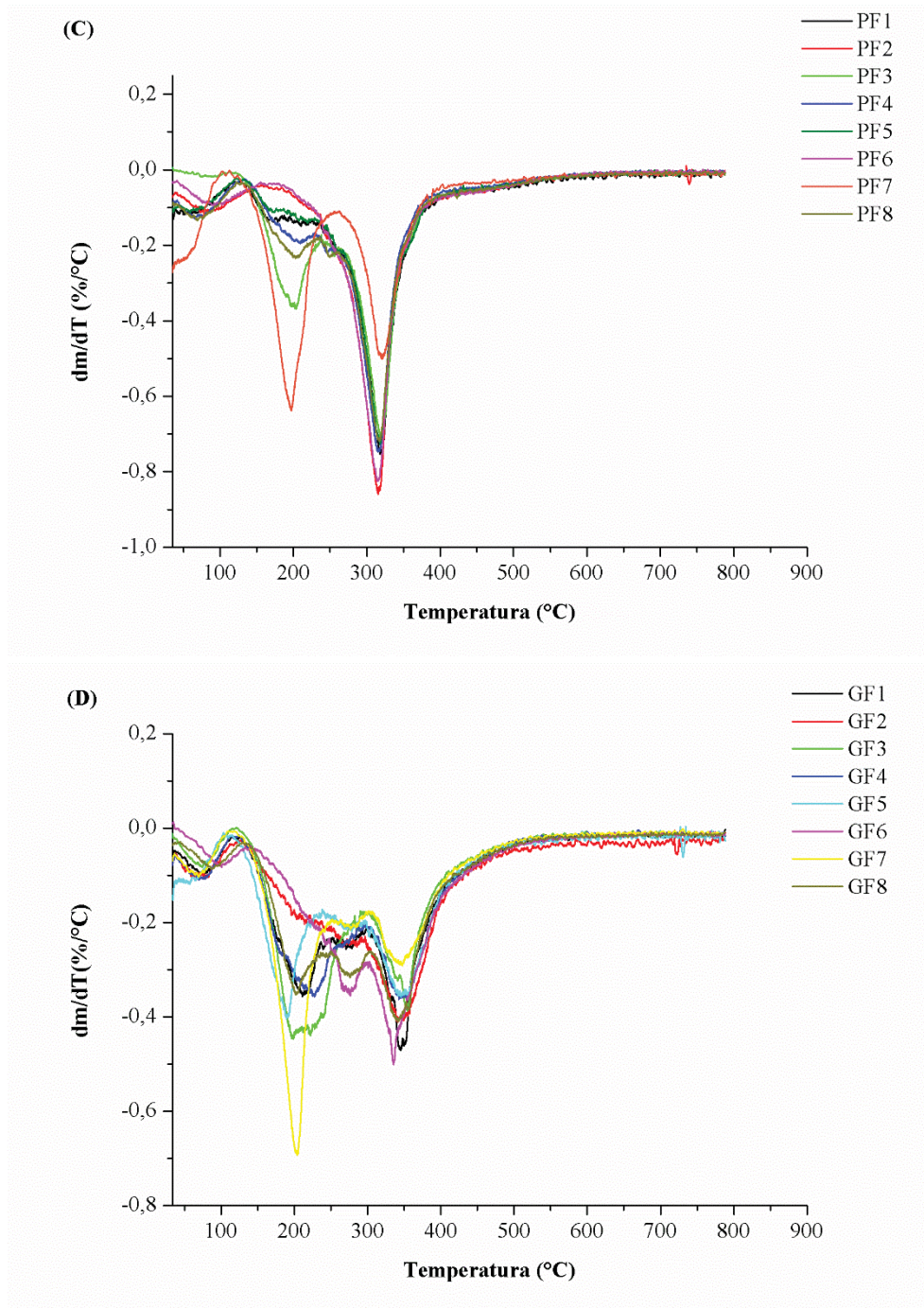
#### 4.3.5.6 Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica dos biofilmes em uma ampla faixa de temperatura (20 a  $750\text{ °C}$ ) foi avaliada mediante análise termogravimétrica (TGA) e sua primeira derivada (DTG) (FIGURA 15). A decomposição térmica apresentou múltiplos estágios

de perda de massa, com três estágios de decomposição de acordo com as curvas de DTG (FIGURA 15C e 15D).

FIGURA 15 – ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTG) DOS FILMES COMESTÍVEIS DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO (A E C) E DOS FILMES COMESTÍVEIS DE GELATINA (B E D) COM DIFERENTES TEORES DE PÓ DA CASCA DE PINHÃO





FONTE: Autor (2024).

O primeiro estágio de perda de massa ocorre entre 50 e 130  $^{\circ}\text{C}$ , essa perda é correspondente à eliminação de água livre e compostos voláteis de baixo peso molar presentes na amostra por evaporação/desidratação (Daudt *et al.*, 2017; Laureanti *et al.*, 2021), sendo observada maior perda de massa para os filmes PF7 com 13,09% e GF5 com 9,35%. O segundo estágio de perda de massa para os filmes PF e GF se deram entre temperaturas de 150 e 240  $^{\circ}\text{C}$ , sendo este estágio associado à degradação do glicerol, bem como a evaporação de componentes de baixo peso

molecular que podem estar presentes na casca de pinhão (Daudt *et al.*, 2017; de Carvalho *et al.*, 2019; Laureanti *et al.*, 2021). Nessa etapa de decomposição térmica os filmes que apresentaram maiores perdas de massa foram os que apresentaram maiores valores de glicerol em sua composição, com destaque para os filmes PF3 (25,22%), PF7 (34,29%), GF3 (33,04%) e GF7 (34,63%). Este evento mostra que os filmes são estáveis em temperaturas inferiores a 150 °C perdendo apenas água livre e compostos voláteis de baixo peso molecular.

O terceiro evento é observado aproximadamente entre 250 e 500°C e apresenta a maior perda de massa dos três estágios, variando de 36,48 (PF7) a 58,42% (PF2) da perda para os filmes PF, enquanto para os filmes GF variaram de 39,33 (GF7) a 57,08% (GF6). Esta etapa corresponde à degradação dos componentes do amido para os filmes PF, que é totalmente decomposto, juntamente com os outros componentes que estão na farinha e casca como proteína, lipídio e fibra, até 350°C (Daudt *et al.*, 2017; de Carvalho *et al.*, 2019; Laureanti *et al.*, 2021), enquanto que para os filmes GF essa etapa é relacionada principalmente à degradação das cadeias de gelatina, sendo observados dois picos distintos nas curvas DTG, correspondentes à pirólise dos componentes com diferentes estabilidades térmicas nessa etapa (Liu *et al.*, 2022; Ruiz-Martínez *et al.*, 2022), além da degradação de substâncias celulósicas presentes na casca de pinhão (Daudt *et al.*, 2017; de Carvalho *et al.*, 2019; Laureanti *et al.*, 2021; Ruiz-Martínez *et al.*, 2022).

Os filmes de PF e GF apresentaram comportamento semelhante. A decomposição térmica exibiu múltiplos estágios de perda de peso, comportamento semelhante com o relatado na literatura para filmes de farinha da amêndoa de pinhão com adição de casca de pinhão (Daudt *et al.*, 2017), filmes a base de amido (de Carvalho *et al.*, 2019; Laureanti *et al.*, 2021; Marques *et al.*, 2019) e filmes de gelatina (Liu *et al.*, 2022; Ruiz-Martínez *et al.*, 2022; Ruiz-Martínez; Rodrigue; Solorza-Feria, 2022) com reforços.

#### 4.4 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo confirmam que a casca de pinhão pode ser utilizada como material de reforço na produção de filmes à base de amido (farinha do pinhão) e gelatina. A incorporação da casca de pinhão em pó influenciou positivamente no aumento da resistência à tração, diminuição da PVA e solubilidade,

além de alterar as propriedades térmicas e microestruturais dos filmes. Além disso, ATR-FTIR e MEV foram capazes de gerar correlações com as propriedades físicas e mecânicas, observando que o uso da casca de pinhão foi eficiente em melhorar a uniformidade e coesão das estruturas dos filmes. O estudo de estabilidade térmica revelou que os filmes são estáveis em temperaturas inferiores a 150 °C, perdendo apenas água livre e compostos voláteis de baixo peso molecular.

De acordo com os resultados as formulações PF6 (5,0% farinha da amêndoa de pinhão, 1,2% de glicerol e 0,4% de pó da casca de pinhão) e GF6 (5,0% gelatina, 2,0% de glicerol e 0,4% de pó da casca de pinhão) foram as que apresentaram melhores valores de PVA, e propriedades mecânicas relacionadas a ELO e RT, respectivamente. Sendo que essas formulações apresentaram valores relativamente próximos aos do polietileno de baixa densidade (PEBD) (ELO = 49,46% e 95,97%; e RT e 84,33% e 64,67%), respectivamente. Esses resultados justificam o uso da casca de pinhão como reforço para filmes, sugerindo que esses filmes possuem potencial aplicação como embalagem comestível biodegradável em alimentos ecologicamente corretos, reduzindo o acúmulo de plásticos sintéticos na natureza.

## **5 CAPÍTULO 5 – FILMES COMESTÍVEIS À BASE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO COM EXTRATOS DE PINHÃO E DE PROPOLIS RICOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS PARA INIBIR A OXIDAÇÃO LIPÍDICA E PROTEICA EM HAMBÚRGUER BOVINO**

Este capítulo faz parte do artigo intitulado “Edible film based on pinhão almond flour with pinhão husk and propolis extracts rich in phenolic compounds to inhibit lipid and protein oxidation in beef patties.”

## FILMES COMESTÍVEIS À BASE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO COM EXTRATOS DE PINHÃO E DE PROPOLIS RICOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS PARA INIBIR A OXIDAÇÃO LIPÍDICA E PROTEICA EM HAMBÚRGUER BOVINO

**Resumo:** Filmes ativos à base de farinha da amêndoa de pinhão incorporados com extratos da casca de pinhão (PHE) e própolis (PE) foram desenvolvidos e utilizados para inibir alterações na qualidade de hambúrgueres bovinos durante o armazenamento. Sete tratamentos de filmes ativos à base de farinha da amêndoa de pinhão foram elaborados e caracterizados quanto a diversas propriedades, incluindo mecânicas, permeabilidade, atividade antioxidante e degradabilidade. As formulações contendo 6% de PHE (PF<sub>6PHE</sub>) e 6% de PE (PF<sub>6PE</sub>) foram usadas para avaliar o potencial de inibição de alterações na qualidade de hambúrgueres bovinos durante o armazenamento. O filme plástico de PVC foi usado como controle e a formulação PF foi adicionada com BHT como controle positivo. A incorporação dos extratos causou mudanças nas propriedades mecânicas e de barreira dos filmes. O PHE aumentou a resistência à tração (RT) e reduziu a elongação (ELO) dos filmes, enquanto o PE diminuiu a RT dos filmes desenvolvidos. Além disso, ambos extratos aumentaram a permeabilidade ao vapor de água dos filmes. Os filmes com maior concentração de extrato apresentaram menor degradabilidade no solo. Os filmes ativos foram eficazes no controle das alterações de cor e reações de oxidação em lipídios e proteínas nas amostras avaliadas. Os filmes PF<sub>6PHE</sub> e PF<sub>6PE</sub> resultaram em menores variações na cor dos hambúrgueres bovinos em comparação com os outros tratamentos durante o armazenamento. Os filmes reduziram significativamente a geração de hidroperóxidos (6,38% e 19,86%), formação de malonaldeído (39,29% e 41,07%) e compostos carbonílicos totais (26,78% e 38,25%), em comparação com a amostra de PVC. Os filmes ativos mostraram-se como uma boa estratégia para embalagens primárias de alimentos, prolongando a vida útil dos produtos e retardando as reações de oxidação lipídica e proteica.

**Palavras-chave:** *Araucaria angustifolia*, filme biodegradável, aditivo natural, hambúrguer de carne, embalagem, oxidação proteica, oxidação lipídica, polifenóis.

## 5.1 INTRODUÇÃO

Os produtos cárneos são alimentos altamente perecíveis e suscetíveis a processos oxidativos devido à sua rica composição química em gorduras e proteínas. Esses processos oxidativos têm sido identificados como os principais responsáveis pela deterioração dos produtos cárneos, levando a alterações sensoriais e nutricionais indesejáveis (Barbosa *et al.*, 2022; Mohan *et al.*, 2017; Umaraw *et al.*, 2020). Em particular, a oxidação dos lipídios e proteínas resulta no desenvolvimento de sabores desagradáveis, rancidez, alterações na textura e cor, além da perda de nutrientes, como ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) e aminoácidos essenciais (triptofano, histidina, metionina e cisteína), com a formação de aldeídos tóxicos (Santana Neto *et al.*, 2021; Yahaya *et al.*, 2019).

Para minimizar esses processos oxidativos, a indústria tem empregado diversas estratégias, incluindo o uso de antioxidantes sintéticos ou o desenvolvimento de tecnologias de embalagem adequadas (Santana Neto *et al.*, 2021; Yahaya *et al.*, 2019). O sistema de embalagem convencional utilizado pela indústria inclui hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT) como antioxidantes sintéticos. Entretanto, os consumidores têm demonstrado preferência por alimentos de alta qualidade, com vida útil prolongada e mínima utilização de conservantes e aditivos sintéticos, considerando estudos recentes sobre os efeitos adversos à saúde do consumo contínuo desses compostos (Kanatt, 2020; Yahaya *et al.*, 2019)

Uma alternativa promissora às embalagens convencionais, que frequentemente incorporam antioxidantes sintéticos e são derivadas do petróleo, é o uso de biopolímeros biodegradáveis naturais. Esses materiais podem ser produzidos a partir de resíduos agroindustriais e contribuir para a preservação dos recursos naturais (Jonaidi Jafari *et al.*, 2018). A aplicação de filmes e revestimentos biodegradáveis e/ou comestíveis, associados ao uso de conservantes naturais, tem mostrado potencial para reduzir a deterioração dos alimentos e a oxidação lipídica, prolongando a vida útil de carnes e produtos cárneos (Ansarian *et al.*, 2022; Barbosa *et al.*, 2022; Chaari *et al.*, 2022; Jonaidi Jafari *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2022; Venkatachalam; Lekjing, 2020).

Dentre os materiais biodegradáveis, o amido tem sido amplamente utilizado na produção de embalagens como substituto aos plásticos convencionais, devido ao seu baixo custo, alta biodegradabilidade, abundância na natureza, estabilidade

química e capacidade de formação de filmes (de Carvalho *et al.*, 2021; Garavand *et al.*, 2022). Os filmes ativos à base de amido/gomas e antioxidantes naturais têm recebido crescente interesse como uma alternativa potencial aos materiais de embalagem sintéticos para produtos cárneos, visando controlar a deterioração da qualidade da carne (Amiri *et al.*, 2019; Ansarian *et al.*, 2022; Kang; Song, 2019; Navikaite-Snipaitiene *et al.*, 2018; Rahmasari; Yemiş, 2022).

Entretanto, até o momento, não foram realizados estudos sobre o uso de filmes de farinha da amêndoa de pinhão contendo extratos hidroetanólico de pinhão (PHE) e própolis (PE) como inibidores da oxidação lipídica e proteica em hambúrgueres bovinos. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo verificar a influência de filmes de farinha da amêndoa de pinhão contendo extratos hidroetanólico de pinhão (PHE) e de própolis (PE) na qualidade de hambúrguer bovino refrigerado durante o armazenamento.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Materiais

Os pinhões foram provenientes da Embrapa Florestas (Safrá 2020, coordenadas geográficas: 25°19'18.2"S, 49°09'33.7"W, Colombo, PR, Brasil). As sementes foram secas em estufa (45 °C/48 h) e descascadas manualmente. As sementes foram trituradas em moinho de facas (STAR FT-50, Fortinox, Brasil) e peneirados com 60 *mesh* (farinha da amêndoa de pinhão), e as cascas trituradas e peneiradas a 100 *mesh* (pó da casca). A própolis bruta produzida pela abelha *Apis mellifera* foi obtida na cidade de Muzambinho (21°22'33"S, 46°31'33"O - Minas Gerais, Brasil) no ano de 2021. E o glicerol (Alphatec, Santana-SP, Analítico Grade, Brasil) foi utilizado como plastificante na preparação de filmes.

### 5.2.2 Obtenção dos extratos de casca de pinhão (PHE) e própolis (PE)

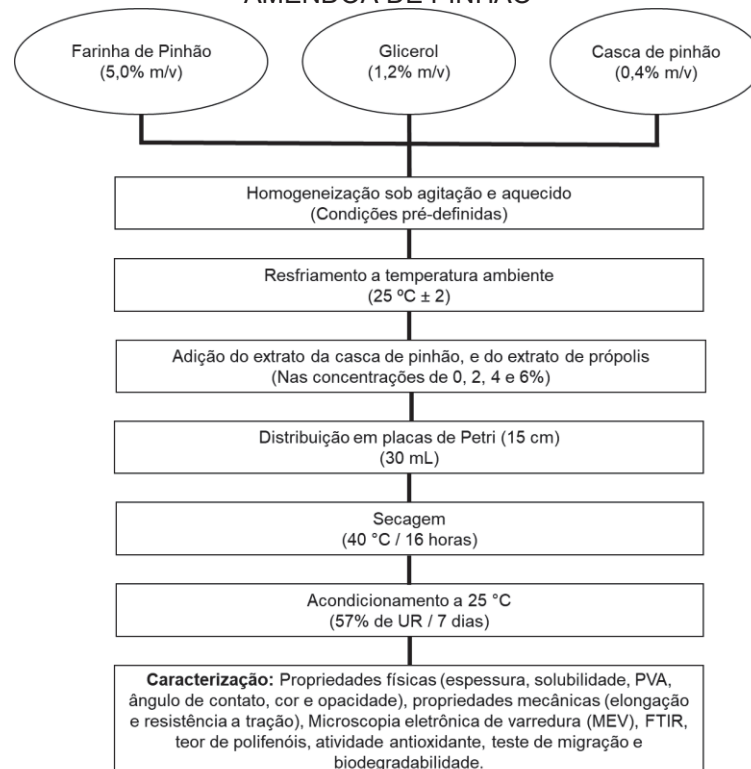
O extrato PHE foi obtido por meio da maceração em uma razão 1:50 (m/v) em etanol (42% v/v), conforme condição ótima determinada no Capítulo 2. A mistura foi homogeneizada e aquecida em banho-maria (70 °C/32 min). O extrato foi filtrado e a fração etanólica removida sob vácuo em evaporador rotativo (180 mbar/45 °C)

(Fisatom – 801, São Paulo - SP, Brasil), e o volume ajustado para 500 mL, e armazenado em frasco âmbar a -20 °C. Para a própolis verde a extração foi realizada como o método proposto por de Santana Neto *et al.* (2024). A própolis foi homogeneizada com etanol a 70% (v/v), e mantida sob agitação em ausência de luz (500 rpm/25 °C/48 h). Em seguida, submetida à sonicação em um banho ultrassônico (40 kHz/1 h), filtrada a vácuo e congelada (-20 °C/24 h) para precipitação de ceras e substâncias menos solúveis. Os extratos foram avaliados quanto ao teor de compostos fenólicos totais (método Folin Ciocalteu) conforme descrito por Waterhouse (2002) com modificações, e atividade antioxidante frente o radical DPPH\* conforme metodologia descrita por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995).

### 5.2.3 Elaboração dos filmes ativos comestíveis

Para a elaboração dos filmes, foram utilizadas as condições ótimas definidas por De Santana Neto *et al.* (2024), para as quantidades de farinha da amêndoa de pinhão, glicerol e pó da casca de pinhão utilizada nos filmes. O processo de elaboração dos filmes pode ser visualizado na FIGURA 16.

FIGURA 16 - FLUXOGRAMA DA ELABORAÇÃO DOS FILMES ATIVOS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO



FONTE: Autor (2024).

Os filmes de farinha da amêndoa de pinhão (PF) foram elaborados utilizando a farinha da amêndoa de pinhão (5% m/v), glicerol (1,2% m/v) e casca de pinhão (0,4% m/v) foram dispersos em água destilada, e mantidos sob agitação (Fisatom, modelo 752A, Brasil), a fim de atingir gelatinização completa do amido (80 °C/30 min), e em seguida resfriada até temperatura ambiente, para adição dos extratos. Cada solução filmogênica (30 mL) foi então vertida em placas de Petri estéreis (15 cm de diâmetro) e foram secos em estufa com circulação forçada de ar a 40 °C (Nova Ética, modelo 400/6ND, Brasil) por 16 h.

Um total de 140 filmes foram preparados e agrupados em quatro tratamentos (20 filmes por tratamento): filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão sem adição de PHE (PF), filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 2% PHE (PF<sub>2PHE</sub>) (v/v), filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 2% PE (PF<sub>2PE</sub>) (v/v), filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 4% PHE (PF<sub>4PHE</sub>) (v/v), filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 4% PE (PF<sub>4PE</sub>) (v/v), filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 6% PHE (PF<sub>6PHE</sub>) (v/v) e filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 6% PE (PF<sub>6PE</sub>) (v/v). Após a secagem, todos os filmes foram condicionados por 7 dias em um dessecador contendo uma solução saturada de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> (54% UR, 25 °C) para posterior caracterização.

#### 5.2.4 Caracterização dos filmes ativos

##### 5.2.4.1 Espessura e propriedades mecânicas

A espessura dos filmes foi determinada utilizando micrômetro digital (Mitutoyo, Japão) com precisão de 0,001 mm, onde a espessura média do filme foi tomada após 10 medições aleatórias. As propriedades mecânicas de alongação de ruptura (ELO, %) e resistência à tração (RT, MPa) dos filmes foram avaliadas utilizando texturômetro (Brookfield CT3, Brookfield, EUA), equipado com probe TA-DGA (Conjunto aperto duplo, Brookfield) segundo o método padrão D882-12 (ASTM, 2012). A separação inicial das garras e a velocidade da probe foi de 20 mm e 1 mm/s, respectivamente, com força de disparo de 0,1 N. Para cada amostra foram realizadas oito repetições.

#### 5.2.4.2 Solubilidade em água

A solubilidade dos filmes foi avaliada conforme descrito por Ge *et al.* (2018). As amostras foram cortadas (2 x 2 cm) e secas em estufa a  $100 \pm 5$  °C por 24 h e pesadas ( $M_0$ ). Os filmes secos foram embebidos em 50 mL de água destilada a 25 °C por 24 h. Posteriormente, as amostras foram secas a 105 °C por 24 h para determinar a massa seca final ( $M_1$ ), e a solubilidade calculada conforme a Equação 23.

$$S(\%) = \left( \frac{M_0 - M_1}{M_0} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 23})$$

#### 5.2.4.3 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada de acordo com o método padrão E96/E96M-16 (ASTM, 2016) com modificações. Amostras dos filmes com 3 cm de diâmetro foram fixadas sobre cápsulas de permeabilidade adaptadas com abertura de 2,5 cm de diâmetro (com uma área de exposição de 0,0013 m<sup>2</sup>) contendo cloreto de cálcio anidro (CaCl<sub>2</sub>), com 0% de umidade relativa (UR). Todo o sistema foi acondicionado em um dessecador contendo uma solução saturada de NaCl (70% UR) e mantido a 25 °C. O ganho de massa do sistema foi monitorado em intervalos de 24 h, durante 7 dias. A permeabilidade ao vapor de água foi determinada pela Equação 24.

$$PVA = \frac{G}{t} \frac{x}{A \cdot P_s \cdot (UR_1 - UR_2)} \quad (\text{Eq. 24})$$

O  $G/t$  (g.h<sup>-1</sup>) é o coeficiente angular, gerado pelo ganho de peso da amostra em função do tempo,  $x$  (mm) é a espessura do filme,  $A$  (m<sup>2</sup>) é a área disponível para permeação,  $P_s$  (kPa) é a pressão de saturação do vapor de água na temperatura de teste, enquanto  $UR_1$  e  $UR_2$  são as umidades relativas (expressas em fração) no interior do dessecador e da cápsula, respectivamente.

#### 5.2.4.4 Propriedades ópticas

A cor instrumental dos filmes foi avaliada pelos parâmetros de luminosidade ( $L^*$ ), tom de verde/vermelho ( $a^*$ ) e azul/amarelo ( $b^*$ ) com colorímetro digital (HunterLab, model MiniScan EZ 4500 L, EUA) previamente calibrado com placas branca e preta fornecidos pelo fabricante, sob o sistema CIELAB. As leituras foram realizadas com as seguintes condições padronizadas: iluminante D65, ângulo de visão  $8^\circ$ , ângulo padrão do observador 10, com uso da placa branca como fundo. A opacidade dos filmes foi realizada de conforme Nazurah; Nur Hanani (2017).

#### 5.2.4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A estrutura morfológica da superfície dos filmes foi analisada por meio de microscopia eletrônica de varredura (TescanVega 3 LMU, Kohoutovice, República Tcheca). Os filmes foram fraturados por congelamento com nitrogênio líquido, fixadas em suportes com fita de cobre e metalizadas com ouro (Balzers Union, modelo FL 9496, Alemanha), e as imagens capturadas usando voltagem de 15 kV.

#### 5.2.4.6 Espectroscopia no infravermelho por transformada de *Fourier* (FTIR)

Os filmes foram caracterizados pela espectroscopia na região do infravermelho por transformada de *Fourier* (FTIR), conduzida em equipamento *Vertex 70* (Bruker, EUA), com acessório de refletância total atenuada (ATR), munido com um cristal de seleneto de zinco na faixa espectral de  $500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  e resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 5.2.4.7 Teor de polifenóis e atividade antioxidante dos filmes

Os extratos dos filmes foram obtidos segundo Kang; Song (2019) com modificações. Foi utilizado 1 g das amostras do filme foram homogeneizados com 20 mL de etanol 80% em água (v/v), e mantidos sob agitação constante em banho-dubnoff (Dubnoff Bath, Solab, modelo SL – 157, Brasil) (3 h/45°C a 125 rpm), e o sobrenadante filtrado e o volume corrigido para o inicial de 20 mL. O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método do de Folin-Ciocalteu

(Waterhouse, 2002), e a atividade antioxidante foi testada através da capacidade de sequestrar os radicais DPPH<sup>•</sup> (Brand-Williams; Cuvelier; Berset, 1995) e o poder redutor do ferro (FRAP) (Benzie; Strain, 1996).

#### 5.2.4.8 Testes de migração dos compostos ativos

Os testes de migração foram realizados conforme descrito por Piñeros-Hernandez *et al.* (2017). As amostras de filme foram cortadas em pedaços de 2 cm<sup>2</sup> e imersas em 5 mL de meios simulados constituídos por: água (para representar meio aquoso) e etanol a 95% (para representar meio lipídico), respectivamente, e colocadas em um agitador a 25 °C e 125 rpm durante 7 dias. Após o tempo de exposição, a migração de polifenóis para cada meio simulado foi testada pelo método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002) com modificações, e os resultados expressos em mg de EAG.kg<sup>-1</sup> simulado de alimento.

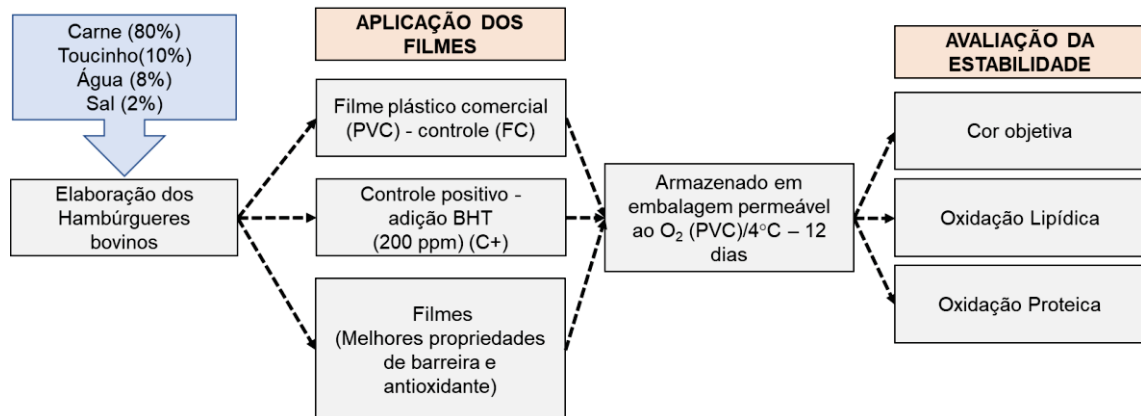
#### 5.2.4.9 Degradabilidade em solo

Os testes de degradabilidade em solo dos filmes foram conduzidos como descrito por Piñeros-Hernandez *et al.* (2017), com algumas modificações. Amostras dos filmes (2 cm<sup>2</sup>) foram submetidas a secagem em estufa (60 °C / 24 h). Em seguida, cada amostra seca foi envolvida por uma tela de alumínio (2,5 x 3,5 cm) para permitir o contato com o solo. No teste de biodegradabilidade dos filmes, as amostras foram enterradas a uma profundidade de 4 cm da superfície do solo orgânico adquirido em mercado local em Curitiba (Paraná, Brasil). Foram utilizadas cinco caixas plásticas (45 cm x 20 cm x 15 cm), sendo uma caixa destinada a cada tempo de amostragem. As caixas plásticas foram mantidas em sala com temperatura ambiente, em condições aeróbias, com umidade em torno de 60% e com adição periódica de água. As amostragens dos filmes foram realizadas após 5, 10, 15, 30 e 45 dias durante o teste de biodegradação. O processo de degradação foi monitorado mediante inspeção visual dos filmes, onde após cada período, o sistema (malha + filme) foi desenterrado, lavado com água destilada e seco com a ajuda de papel filtro, e mantidos em estufa a 60 °C seguido do registro das imagens.

### 5.2.5 Elaboração dos hambúrgueres e aplicação dos filmes

Os hambúrgueres foram elaborados utilizando carne bovina e toucinho adquiridos no mercado local de Bananeiras-PB. Um total de 75 hambúrgueres ( $\cong 50$  g) foram preparados seguindo-se a formulação básica geral: carne (80%), toucinho (10%), água gelada (8%) e cloreto de sódio (2%). Para a aplicação dos filmes ativos a formulação PF foi elaborada com adição de BHT (200 ppm) ( $PF_{BHT}$ ) como referência, e com maiores níveis de adição de extrato ( $PF_{6\%PHE}$  e  $PF_{6\%PE}$ ), sendo utilizado filme PVC como controle. A aplicação dos filmes foi realizada aleatoriamente aos hamburgueres, dispostos em bandejas de poliestireno expandido e revestidos em filme de policloreto de vinila (permeabilidade ao oxigênio:  $\cong 17$   $cm^3/m^2$  dia atm, permeabilidade à umidade:  $< 5$   $g/m^2$  dia), e armazenados sob refrigeração em geladeira ( $4 \pm 1$  °C/12 dias) (Eletrolux, TF39, Brasil), sendo as amostras coletadas para as análises no dia de elaboração dos hambúrgueres (dia 0) e durante o armazenamento (3, 6, 9 e 12 dias). O fluxograma do experimento é demonstrado na FIGURA 17.

FIGURA 17 - FLUXOGRAMA DA APLICAÇÃO DOS FILMES ATIVOS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO EM HAMBÚRGUERES BOVINOS



FONTE: Autor (2024).

### 5.2.6 Avaliação da estabilidade oxidativa dos hambúrgueres

Para avaliar a estabilidade oxidativa dos hambúrgueres foram realizadas as seguintes avaliações: Avaliação da cor objetiva e análises referentes a oxidação lipídica (índice de peróxido e TBARS) e proteica (compostos carbonílicos), descritas a seguir.

### 5.2.6.1 Cor objetiva

A estabilidade da cor objetiva dos hambúrgueres foi determinada avaliando os parâmetros de luminosidade ( $L^*$ ), teor de verde/vermelho ( $a^*$ ) e azul/amarelo ( $b^*$ ) com auxílio de um colorímetro digital (Konica Minolta, modelo CHROMA METER CR-400, Osaka, Japão), sob o sistema CIELAB. Durante o armazenamento refrigerado a diferença colorimétrica total ( $\Delta E$ ) das amostras de hambúrgueres foi calculada sempre em relação às amostras no início do armazenamento, utilizando-se a Equação 25.

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (\text{Eq. 25})$$

Onde,  $\Delta L^* = L^*_{0 \text{ dias de armazenamento}} - L^*_x \text{ dias de armazenamento}$ ,  $\Delta a^* = a^*_{0 \text{ dia de armazenamento}} - a^*_x \text{ dias de armazenamento}$  e  $\Delta b^* = b^*_{0 \text{ dia de armazenamento}} - b^*_x \text{ dias de armazenamento}$ .

### 5.2.6.2 Índice de peróxido

O índice de peróxido foi determinado de acordo com o método adaptado do IDF (1991), Mehta; Darji; Aparnathi (2015) e Semb (2012). Inicialmente a amostra (2,5 g) foi homogeneizada com 40 mL de clorofórmio: metanol (7:3 v/v) em ultra-turrax (IKA, T-25 Digital, IKA, Alemanha) (3500 rpm/3 min), e filtrada. Em seguida tomou-se uma alíquota de 10 mL do extrato lipídico, e foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de tiocianato de amônio (30% m/v), homogeneizado em vórtex (5 s), seguido da adição de 50  $\mu\text{L}$  de cloreto ferroso ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,02 M em HCl 3,7%) homogeneizado em vórtex (5 s), seguido de incubação por 5 min., e submetidos a leitura a 500 nm.

### 5.2.6.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O método de TBARS descrito por Rosmini *et al.* (1996) foi usado para medir os produtos da oxidação lipídica secundária nos hambúrgueres de carne ao longo do tempo de armazenamento. As substâncias foram extraídas em condições ácidas, onde as amostras (2,5 g) foram adicionadas de 250  $\mu\text{L}$  de solução de BHT 4,2% em álcool (m/v), e homogeneizadas com 7,5 mL de ácido tricloroacético (10% m/v) em ultra-turrax (3500 rpm/3 min) (T-25 Digital, IKA, Alemanha), para facilitar a extração

das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Em seguida, a mistura foi centrifugada (1372 g/3 min/4 °C) e filtrada. O extrato obtido foi utilizado para quantificação do teor de TBARS. As substâncias extraídas em condições ácidas foram submetidas a reação com ácido tiobarbitúrico (0,02 M) a 95 °C durante 30 min. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 532 nm. Uma curva padrão ( $y = 0,0007x + 2 \times 10^{-6}$ ,  $R^2 = 0,9994$ ) de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) ( $2,84 \times 10^{-8} - 1,40 \times 10^{-6}$  g TEP.mL<sup>-1</sup>) foi utilizada para determinar o teor de MDA, e o resultado expresso em mg de MDA.kg<sup>-1</sup> de amostra.

#### 5.2.6.4 Compostos carbonílicos totais

Os compostos carbonílicos totais (CCT) foram determinados após derivatização com 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), de acordo com a metodologia proposta por Ganhão; Morcuende; Estévez (2010). Para a quantificação 1 g das amostras foram homogeneizadas em solução de NaCl 0,6 M em tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM (pH 6,5) (1:10 m/v) com ultra-turrax (IKA, T-25 Digital, IKA, Alemanha) em banho de gelo por 1 min. Em seguida, foram tomadas alíquotas de 150 µL para determinação das concentrações de proteínas e CCT. Em ambas as determinações, inicialmente as proteínas foram precipitadas com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (m/v) seguido de centrifugação a frio (2400 g/4 °C). Para a determinação dos CCT, foi adicionado 1 mL de DNPH 0,2% (m/v) em HCl 2 M, enquanto para proteínas foi adicionado 1 mL de HCl 2 M, e as amostras submetidas a incubação em ambiente escuro, e temperatura ambiente durante 1 h. Após a incubação as proteínas foram precipitadas novamente com 1 mL de TCA 10% e centrifugadas (9000 g/10 min). Em seguida as amostras foram submetidas a quatro lavagens com 1 mL de etanol/acetato de etila (1:1 v/v) seguidas de centrifugações entre cada lavagem (9000 g/5 min), e as proteínas precipitadas foram redissolvidas em 1,5 mL de cloridrato de guanidina 6 M em tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM (pH 6,5). A concentração de proteínas das amostras foi calculada a partir da leitura das absorbâncias a 280 nm utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA). Enquanto os CCT foram expressos em nmoles de carbonílicos/mg de proteína, usando um coeficiente de extinção molar de hidrazonas (21,0 nM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), com leituras das absorbâncias a 370 nm.

### 5.2.7 Análise estatística

Os dados coletados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade. A ANOVA de uma via foi realizada para avaliar o efeito da incorporação de diferentes níveis de PHE e PE na qualidade dos filmes à base de farinha de amêndoa de pinhão e, quando diferenças significativas foram observadas ( $p \leq 0,05$ ), o teste de Tukey foi realizado. Os efeitos do tempo de armazenamento (dias 0, 3, 6, 9 e 12), tratamento (PVC, PF<sub>BHT</sub>, PF<sub>6PHE</sub> e PF<sub>6PE</sub>) e sua interação foram analisados por ANOVA de duas vias. O tempo de armazenamento, tratamento e sua interação foram considerados como fatores fixos, enquanto a replicação dos experimentos foi atribuída como efeito aleatório. A análise estatística foi realizada usando o sistema SAS<sup>®</sup> (2012) e a significância foi determinada no nível de 0,05. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos PHE e PE

A análise do conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos mostrou que o PHE mostrou  $337,05 \pm 1,68$  mg EAG.g<sup>-1</sup>. O extrato obtido apresentou valores superiores ao relatado por Fonseca *et al.* (2020), que obtiveram valor de CFT de 225.32 mg.g<sup>-1</sup> em extrato aquoso da casca de pinhão. Por outro lado, o PE apresentou elevado conteúdo de CFT na própolis verde ( $324,82 \pm 5,26$ ), corroborando com o relatado por Rajan *et al.* (2021).

Quanto a atividade antioxidante os extratos PHE e PE apresentaram valores de capacidade de sequestrar os radicais DPPH<sup>\*</sup> de  $1533,31 \pm 47,23$  e  $741,14 \pm 14,41$   $\mu\text{mol.g}^{-1}$  MS, respectivamente. O extrato PHE apresentou valor de DPPH<sup>\*</sup> superior ao observado por Dorneles; Noreña (2020), que obtiveram valores de  $467,79$   $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$  para DPPH<sup>\*</sup> em extratos de brácteas de pinhão por extração assistida por micro-ondas. O extrato PE obteve valor de DPPH<sup>\*</sup> inferior ao relatado por Skaba *et al.* (2013), que encontraram valores de  $1230,07$   $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$ . Esses resultados indicam que os extratos de PHE e PE podem ser considerados como fontes de antioxidantes para aplicação em embalagens de alimentos.

### 5.3.2 Caracterização dos filmes

#### 5.3.2.1 Espessura e propriedades mecânicas

De acordo com os valores de espessura, os filmes foram considerados homogêneos, uma vez que apresentaram baixos valores de desvios padrão (TABELA 18). A incorporação dos extratos PHE e PE não promoveram alterações significativa nos valores de espessura dos filmes ( $p > 0,05$ ).

TABELA 18 – VALORES DE ESPESSURA, PROPRIEDADES MECÂNICAS (ELONGAÇÃO (ELO) E RESISTÊNCIA À TRAÇÃO (RT)), PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA (PVA) E SOLUBILIDADE DOS FILMES ATIVOS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO COM ADIÇÃO DE EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO (PHE) E PRÓPOLIS (PE) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

| Filmes             | Espessura (mm)            | RT (MPa)                 | ELO (%)                  | Solubilidade (%)         | PVA ( $10^{-9} \text{g.m}^{-1} \text{Pa}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) |
|--------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| <b>PHE</b>         |                           |                          |                          |                          |  |
| PF                 | 0,145 <sup>a</sup> ±0,003 | 5,06 <sup>c</sup> ±0,73  | 44,51 <sup>a</sup> ±2,20 | 21,28 <sup>a</sup> ±1,87 | 1,23 <sup>c</sup> ±0,18  |
| PF <sub>2PHE</sub> | 0,142 <sup>a</sup> ±0,007 | 6,31 <sup>ab</sup> ±0,84 | 39,93 <sup>b</sup> ±1,11 | 21,43 <sup>a</sup> ±0,50 | 2,27 <sup>b</sup> ±0,06  |
| PF <sub>4PHE</sub> | 0,141 <sup>a</sup> ±0,002 | 5,77 <sup>bc</sup> ±0,52 | 36,77 <sup>b</sup> ±3,25 | 20,16 <sup>a</sup> ±0,31 | 2,66 <sup>a</sup> ±0,14  |
| PF <sub>6PHE</sub> | 0,141 <sup>a</sup> ±0,005 | 7,44 <sup>a</sup> ±0,58  | 39,74 <sup>b</sup> ±2,23 | 20,48 <sup>a</sup> ±0,52 | 2,86 <sup>a</sup> ±0,15  |
| <b>PE</b>          |                           |                          |                          |                          |  |
| PF                 | 0,145 <sup>a</sup> ±0,003 | 5,06 <sup>a</sup> ±0,73  | 44,51 <sup>a</sup> ±2,20 | 21,28 <sup>a</sup> ±1,87 | 1,23 <sup>b</sup> ±0,18  |
| PF <sub>2PE</sub>  | 0,139 <sup>a</sup> ±0,004 | 4,14 <sup>b</sup> ±0,06  | 47,45 <sup>a</sup> ±5,08 | 20,28 <sup>a</sup> ±0,30 | 2,46 <sup>a</sup> ±0,29  |
| PF <sub>4PE</sub>  | 0,141 <sup>a</sup> ±0,005 | 4,08 <sup>b</sup> ±0,25  | 44,65 <sup>a</sup> ±5,17 | 20,22 <sup>a</sup> ±1,77 | 2,34 <sup>a</sup> ±0,39  |
| PF <sub>6PE</sub>  | 0,140 <sup>a</sup> ±0,008 | 4,06 <sup>b</sup> ±0,34  | 41,46 <sup>a</sup> ±4,42 | 22,24 <sup>a</sup> ±1,07 | 1,89 <sup>ab</sup> ±0,29                                       |

PF - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão; PF<sub>2PHE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 2% PHE; PF<sub>4PHE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 4% PHE; PF<sub>6PHE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 6% PHE; PF<sub>2PE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 2% PE; PF<sub>4PE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 4% PE; PF<sub>6PE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 6% PE.

PHE - Extrato de casca de pinhão; PE - Extrato de própolis.

Média ± desvio padrão. As diferentes letras sobrescritas na coluna para cada tipo de filme indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

FONTE: Autor (2024).

O filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 6% PHE (PF<sub>6PHE</sub>) (v/v) apresentou RT de 7,44 MPa, valor 47% maior do que o filme controle (PF) (TABELA 18). Em relação à adição de extrato de própolis (PE) nos filmes, houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) na RT, com redução da RT de 5,06 para 4,06 MPa.

Os diferentes efeitos observados ao incorporar PHE e PE podem ser justificados principalmente devido a diferença da composição dos extratos, uma vez que o PHE apresenta importantes teores de lignina e polissacarídeos (como por exemplo glicose e xilose) (Queirós *et al.*, 2020). Estes compostos apresentam funções

estruturais essenciais nas matrizes vegetais e são utilizados como estratégias para aprimoramento das propriedades físicas e mecânicas de filmes comestíveis (Amaral *et al.*, 2022; Ji *et al.*, 2022). O PHE pode impactar de maneiras distintas e dependem principalmente do tipo de matriz base para a produção de filmes comestíveis.

Com relação aos resultados obtidos para ELO dos filmes ativos de farinha da amêndoa de pinhão com adição de extratos de pinhão e própolis em diferentes concentrações (TABELA 18), o extrato PHE impactou de forma negativa nos resultados (redução de até 17% com diferença significativa ( $p < 0,05$ )). Em estudo realizado por Marangoni Júnior *et al.* (2022), os autores relatam que a incorporação de extrato de própolis em filmes de alginato de sódio apresentou o mesmo comportamento no aumento da ELO (2,1 para 4,3%), contudo, sem apresentar diferença significativa ao nível de confiança de 95% ( $p > 0,05$ ). Estes autores destacam as interações secundárias através de ligações de hidrogênio entre os compostos polares (como antioxidantes presentes no extrato de própolis) e a matriz filmogênica como possíveis responsáveis pelo efeito nas propriedades mecânicas.

#### 5.3.2.2 Solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água

A solubilidade dos filmes ativos de farinha da amêndoa de pinhão com adição do extrato PHE apresentaram valores entre 20,16 e 21,43%, enquanto para os filmes com extrato PE obtiveram valores entre 20,22 e 22,24%. No entanto os resultados mostraram que a solubilidade dos filmes não foi influenciada pela adição dos extratos PHE e PE ( $p > 0,05$ ), indicando uma possível interação entre os componentes dos filmes e dos extratos (TABELA 18).

A incorporação tanto de PHE e PE impactaram significativamente ( $p < 0,05$ ) na permeabilidade do filme controle, gerando um aumento de 132% (6% de PHE) e 99% (2% de PE) (TABELA 18). A presença de compostos antioxidantes com sítios polares na molécula (como por exemplo os polifenóis, flavonoides e aminoácidos) presentes nos extratos, são os principais responsáveis por aumentar a hidrofiliabilidade da superfície filmogênica.

Assim, há um aumento da interação com vapor de água do ambiente e, conseqüentemente, gerando um gradiente de maior permeação identificado nos resultados obtidos (Zhang *et al.*, 2020). Segundo Tanwar *et al.* (2021), a natureza hidrofílica dos compostos adicionados impacta diretamente na PVA dos filmes, uma

vez que a interação desses compostos polares gera um aumento do espaço livre no filme e, por conseguinte, a umidade passe pela estrutura com menor esforço.

### 5.3.2.3 Propriedades ópticas

Os valores dos parâmetros de cor desempenham um papel crucial para o processo de aceitação de um produto por parte do cliente. Os valores são expressos na TABELA 19, de  $L^*$  implica na luminosidade e, quanto menor o valor de  $L^*$ , implica em um filme escuro. Já o parâmetro  $a^*$  denota uma variação do vermelho ( $+a^*$ ) ao verde ( $-a^*$ ) e parâmetro  $b^*$  implica uma variação do amarelo ( $+b^*$ ) ao azul ( $-b^*$ ). Com relação a mudança de coloração ao incorporar PHE e PH nos filmes de farinha da amêndoa de pinhão, é possível observar efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para os parâmetros estudados, principalmente para os filmes com a adição de 6% de extratos da casca de pinhão e própolis. Com relação ao parâmetro  $L^*$ , há um aumento proporcional com a concentração de extratos, o que indica um aumento da luminosidade dos filmes controle.

TABELA 19 – PARÂMETROS DE COR E OPACIDADE DOS FILMES ATIVOS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO COM ADIÇÃO DE EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO (PHE) E PRÓPOLIS (PE) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

| Filmes             | $L^*$                     | $a^*$                     | $b^*$                    | Opacidade (AU.mm <sup>-1</sup> ) |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| <b>PHE</b>         |                           |                           |                          |                                  |
| PF                 | 57,74 <sup>b</sup> ±0,21  | 19,68 <sup>a</sup> ±0,12  | 38,11 <sup>a</sup> ±0,22 | 4,27 <sup>a</sup> ±0,30          |
| PF <sub>2PHE</sub> | 57,97 <sup>b</sup> ±0,71  | 18,47 <sup>b</sup> ±0,42  | 36,63 <sup>b</sup> ±0,17 | 3,87 <sup>a</sup> ±0,27          |
| PF <sub>4PHE</sub> | 59,43 <sup>a</sup> ±0,37  | 17,71 <sup>c</sup> ±0,22  | 36,28 <sup>c</sup> ±0,10 | 3,85 <sup>a</sup> ±0,15          |
| PF <sub>6PHE</sub> | 59,08 <sup>a</sup> ±0,50  | 18,16 <sup>bc</sup> ±0,33 | 36,78 <sup>b</sup> ±0,19 | 3,78 <sup>a</sup> ±0,12          |
| <b>PE</b>          |                           |                           |                          |                                  |
| PF                 | 57,74 <sup>b</sup> ±0,21  | 19,68 <sup>a</sup> ±0,12  | 38,11 <sup>b</sup> ±0,22 | 4,27 <sup>a</sup> ±0,30          |
| PF <sub>2PE</sub>  | 59,99 <sup>a</sup> ±1,13  | 16,79 <sup>b</sup> ±0,60  | 35,82 <sup>d</sup> ±0,32 | 3,69 <sup>a</sup> ±0,29          |
| PF <sub>4PE</sub>  | 59,05 <sup>ab</sup> ±0,60 | 17,46 <sup>b</sup> ±0,43  | 37,27 <sup>c</sup> ±0,24 | 3,93 <sup>a</sup> ±0,24          |
| PF <sub>6PE</sub>  | 59,60 <sup>a</sup> ±1,05  | 17,02 <sup>b</sup> ±0,64  | 38,83 <sup>a</sup> ±0,42 | 4,02 <sup>a</sup> ±0,45          |

PF - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão; PF<sub>2PHE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 2% PHE; PF<sub>4PHE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 4% PHE; PF<sub>6PHE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 6% PHE; PF<sub>2PE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 2% PE; PF<sub>4PE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 4% PE; PF<sub>6PE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 6% PE.

PHE - Extrato de casca de pinhão; PE - Extrato de própolis.

Média ± desvio padrão. As diferentes letras sobrescritas na coluna para cada tipo de filme indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

FONTE: Autor (2024).

Já para os valores encontrados para o parâmetro  $a^*$  variaram de 19,68 (PF) a 17,71 (4% de PHE) e 16,79 (2% de PE), o que indicam uma coloração tendendo ao

vermelho correlacionada aos pigmentos majoritários presentes na farinha da amêndoa de pinhão. Para o parâmetro  $b^*$ , houve uma variação de 38,11 (PF) a 36,28 (4% de PHE) e 35,82 (2% de PE), o que indica uma coloração tendendo ao amarelo. No geral, a incorporação de extratos para ambos os parâmetros levou a uma redução dos valores. Este efeito basicamente está relacionado ao aumento da quantidade de compostos fenólicos a medida que a concentração de extrato foi elevada, os quais podem impactar no reflexo da luz (Tanwar *et al.*, 2021).

A adição dos extratos PHE e PE proporcionou redução nos valores da opacidade dos filmes (TABELA 19), embora a mesma não tenha sofrido influência pela adição dos extratos PHE e PE ( $p > 0,05$ ). Os filmes apresentaram baixa opacidade, que está diretamente relacionada à estrutura interna dos filmes (Kanatt, 2020). Filmes que apresentam baixa opacidade acabam sendo preferidos para comercialização devido ao seu impacto direto na aceitação do produto e do consumidor (Zhao *et al.*, 2023).

#### 5.3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

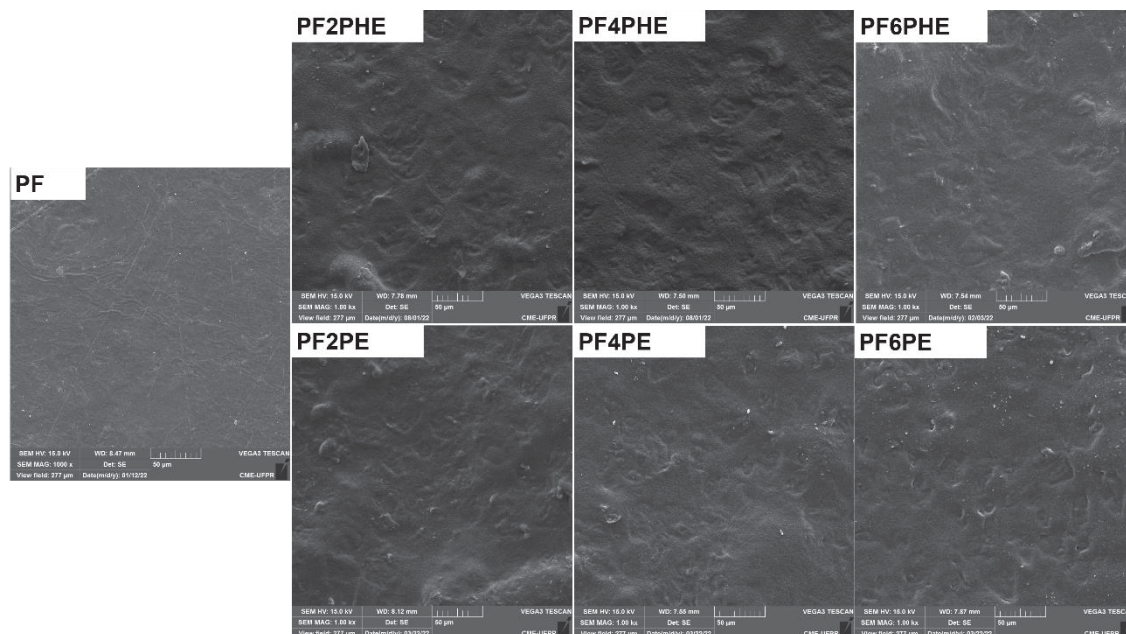
A homogeneidade dos filmes, bem como a presença de fissuras ou rachaduras foram avaliadas através da análise de MEV, sendo avaliadas as micrografias da superfície (FIGURA 18). Analisando as micrografias dos filmes nota-se que, em geral, as superfícies das formulações de todos os filmes analisados mostraram superfície áspera e irregular.

É possível observar que a adição do extrato aumentou ligeiramente a rugosidade do filme, sendo os filmes com extrato PHE os que apresentaram maiores irregularidades na superfície, quando comparados com os filmes com PE (FIGURA 18). A visualização de uma estrutura irregular permite inferir que houve maior interação molecular (pontes de hidrogênio) entre os grupos presentes na farinha da amêndoa de pinhão com a casca, como amido, lipídios, proteínas, fibras, e às interações entre esses e os extratos (dos Santos *et al.*, 2023; Peron-Schlosser *et al.*, 2021).

Não foi observada presença de bolhas ou rachaduras nas diferentes formulações estudadas, mostrando uma boa interação entre os componentes utilizados na elaboração dos filmes. A presença de rugosidade nos filmes com adição dos extratos PHE e PE podem ter se dado provavelmente ao aumento da quantidade

de compostos fenólicos oriundo dos extratos na estrutura do filme durante a secagem (Kang; Song, 2019; Laureanti *et al.*, 2021; Piñeros-Hernandez *et al.*, 2017).

FIGURA 18 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DAS SUPERFÍCIES (1000X) DOS FILMES ATIVOS DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO COM EXTRATOS PHE E PE



PF - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão; PF<sub>2</sub>PHE - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 2% PHE; PF<sub>4</sub>PHE - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 4% PHE; PF<sub>6</sub>PHE - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 6% PHE; PF<sub>2</sub>PE - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 2% PE; PF<sub>4</sub>PE - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 4% PE; PF<sub>6</sub>PE - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 6% PE.

FONTE: Autor (2024).

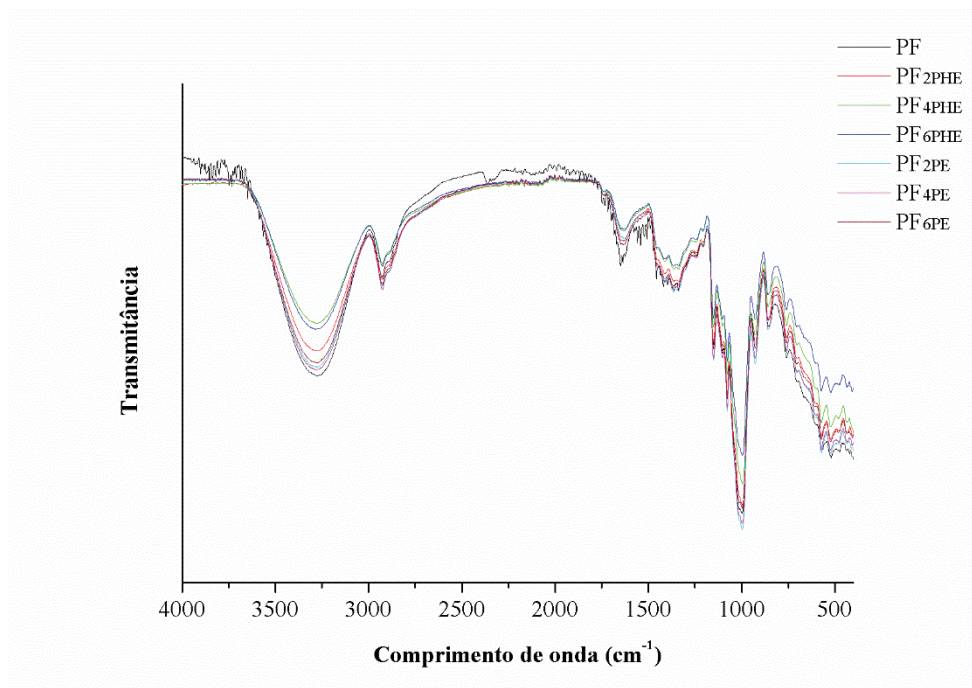
De acordo com estudos anteriores realizados por Rattaya; Benjakul; Prodpran (2009) e Silva *et al.* (2019), o aumento da rugosidade e a presença de estruturas compactas nos filmes podem ser atribuídos ao fortalecimento das ligações entre os compostos fenólicos e a matriz polimérica por meio de ligações covalentes e não covalentes. Características semelhantes quanto à rugosidade dos filmes foram relatadas em filmes ativos a base de TPS/PBAT com adição de extrato de pinhão, e filmes de fécula de mandioca reforçados com engaçõ de uva com adição de extrato de pimenta rosa (Laureanti *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2019).

### 5.3.2.5 Espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR)

Os espectros para os filmes com adição dos extratos PHE e PE são mostrados na FIGURA 19. Para os filmes desenvolvidos, um comportamento de absorção

semelhante foi observado em toda a faixa analisada (500-4000  $\text{cm}^{-1}$ ). Para os filmes à base de farinha da amêndoa de pinhão sem adição de extratos, foi identificado um pico na faixa de 3274  $\text{cm}^{-1}$ , onde estão correlacionados com o grupo -OH característico das pontes de hidrogênio (Daudt *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2022).

FIGURA 19 – ESPECTROS DE ATR-FTIR DOS FILMES ATIVOS DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO COM EXTRATOS PHE E PE



PF - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão; PF<sub>2PHE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 2% PHE; PF<sub>4PHE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 4% PHE; PF<sub>6PHE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 6% PHE; PF<sub>2PE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 2% PE; PF<sub>4PE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 4% PE; PF<sub>6PE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 6% PE.

FONTE: Autor (2024).

Ao comparar a adição dos extratos, houve variação na intensidade do pico e um leve deslocamento para a esquerda (3284  $\text{cm}^{-1}$ ), ou seja, houve variação no comprimento de onda de absorção com o aumento da concentração dos extratos PHE e PE. Isso pode ter ocorrido devido à substituição das ligações -OH por ligações mais estáveis resultantes da interação de grupos polares (flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, cumarinas, esteroides, aminoácidos e minerais) presentes no extrato de pinhão e própolis com a farinha do pinhão (Barros *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2019).

A banda observada no intervalo 2870–2930  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuída à vibração de alongamento C-H de ligações CH<sub>2</sub> alifáticas (Daudt *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2023). O pico intenso observado em 1620  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuído ao trecho de anel C–C de anéis

aromáticos (Spada; Luchese; Tessaro, 2018). Para o espectro da farinha da amêndoa de pinhão, o pico na região de  $1000\text{ cm}^{-1}$  é característico de grupos alceno para ligação C-H (Daudt *et al.*, 2016).

#### 5.3.2.6 Teor fenólico total e atividade antioxidante dos filmes ativos

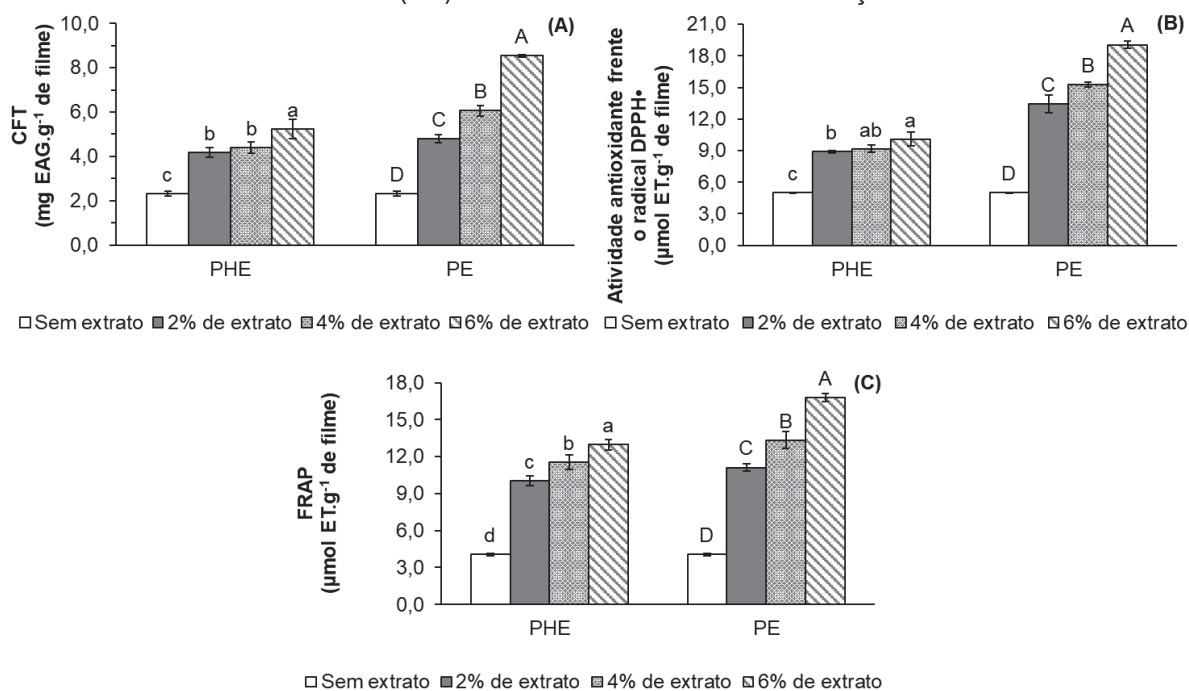
Foi observado que as adições dos extratos promoveram incremento significativo ( $p < 0,05$ ) no conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante. Para os ensaios de compostos fenólicos e capacidade antioxidante testados por DPPH e FRAP, foram observados a mesma tendência para todas as amostras: 6% de extrato > 6% de extrato > 2% de extrato > Controle (sem extrato), para ambos os extratos utilizados (FIGURA 20).

O conteúdo de compostos fenólicos presente nos filmes apresentaram diferença significativa para ambos os extratos empregados, sendo observados valores de CFT de 2,33 - 5,34 mg EAG.g<sup>-1</sup> de filme para os com adição de PHE, e entre 2,33 e 8,54 mg EAG.g<sup>-1</sup> de filme para os filmes com extrato PE (FIGURA 20A). Os valores obtidos para CFT foram superiores aos relatados em filmes ativos de TPS/PBAT com extrato de pinhão (Silva *et al.*, 2019). De Souza *et al.* (2020) relataram valores de CFT próximos de 3,5 mg EAG.g<sup>-1</sup> de filme em filmes a base de proteína isolada de soja com extrato de pinhão, enquanto Cunha *et al.* (2021) obtiveram valores entre 4,18 e 5,52 mg EAG.g<sup>-1</sup> de filme, em filmes de amido de mandioca com adição de extrato de própolis.

Foi possível ainda avaliar o potencial antioxidante dos filmes em relação ao sequestro do radical DPPH<sup>\*</sup> e ao poder redutor do ferro (FIGURAS 20B e 20 C). Observou-se que o filmes com PE foram os que apresentaram maiores atividades antioxidantes. Os filmes PF<sub>6PHE</sub> e PF<sub>6PE</sub> foram as formulações que mostraram os maiores valores para DPPH<sup>\*</sup> (PF<sub>6PHE</sub> =  $10,09 \pm 0,64\ \mu\text{mol.g}^{-1}$  de filme e PF<sub>6PE</sub> =  $19,05 \pm 0,37\ \mu\text{mol.g}^{-1}$  de filme, valores 2,02 e 3,81 vezes mais que a formulação base – PF =  $5,00 \pm 0,06\ \mu\text{mol.g}^{-1}$  de filme) e FRAP (PF<sub>6PHE</sub> =  $12,96 \pm 0,44\ \mu\text{mol.g}^{-1}$  de filme e PF<sub>6PE</sub> =  $16,78 \pm 0,33\ \mu\text{mol.g}^{-1}$  de filme, valores 3,20 e 4,14 vezes mais que a formulação base – PF =  $4,05 \pm 0,10\ \mu\text{mol.g}^{-1}$  de filme), respectivamente. O aumento na atividade antioxidante dos filmes é de grande interesse para a indústria, pois a atividade antioxidante dos filmes de farinha da amêndoa de pinhão pode ser ajustada de forma

personalizada, permitindo encontrar diferentes aplicações para cada tipo de filme (Piñeros-Hernandez *et al.*, 2017).

FIGURA 20 – TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (A), ATIVIDADE DE SEQUESTRO DO RADICAL DPPH<sup>•</sup> (B) E FRAP (C) OBTIDOS PARA OS FILMES ATIVOS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO COM ADIÇÃO DE EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO (PHE) E PRÓPOLIS (PE) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES



Valores médios ± desvio padrão.

PHE - Extrato de casca de pinhão; PE - Extrato de própolis.

As diferentes letras minúsculas (comparação entre filmes incorporados com diferentes concentrações de PHE) indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey;

Diferentes letras maiúsculas (comparação entre filmes incorporados com diferentes concentrações de PE) indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

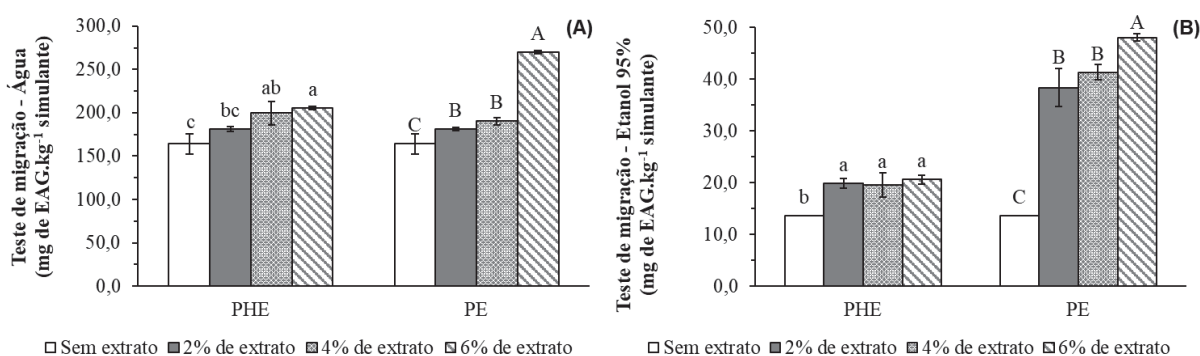
FONTE: Autor (2024).

O incremento na atividade antioxidante dos filmes pode estar relacionado a maior disponibilidade e abundância de grupos hidroxila dos compostos fenólicos presentes nos extratos adicionados aos filmes, bem como os presentes na casca de pinhão. Esses grupos são doadores de átomos de hidrogênio, que tornam esses compostos capazes de capturar radicais livres, aumentando sua atividade antioxidante (Laureanti *et al.*, 2021; Qin *et al.*, 2019), que torna promissor a utilização dos filmes. Esse resultado corrobora o comportamento observado por Silva *et al.* (2019), em filmes ativos de TPS/PBAT com extrato de pinhão, e por Laureanti *et al.* (2021), em filmes à base de amido de mandioca reforçado com engaço de uva e extrato de pimenta rosa.

### 5.3.2.7 Testes de migração

A migração dos polifenóis dos extratos de PHE e PE presentes nos filmes foi realizada em simuladores alimentares após 7 dias de exposição, e os resultados estão dispostos na FIGURA 21. Foi observada que os compostos fenólicos presentes nos filmes com PHE e PE migraram rapidamente para o meio aquoso, liberando maiores quantidades para as formulações com 6% de extratos. Foi observada diferença significativa para a migração em água entre os filmes adicionados de extratos para as duas formulações de filmes estudadas ( $p < 0,05$ ). Os filmes PF6<sub>PHE</sub> e PF6<sub>PE</sub> foram os que apresentaram maiores valores de migração em água, com 205,51 e 269,98 mg de EAG.kg<sup>-1</sup> simulado de alimento, respectivamente (FIGURA 21A).

FIGURA 21 – TESTE DE MIGRAÇÃO EM ÁGUA (A) E ÁLCOOL (B) OBTIDOS PARA OS FILMES ATIVOS À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO COM ADIÇÃO DE EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO (PHE) E PRÓPOLIS (PE) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES



Valores médios  $\pm$  desvio padrão.

PHE - Extrato de casca de pinhão; PE - Extrato de própolis.

As diferentes letras minúsculas (comparação entre filmes incorporados com diferentes concentrações de PHE) indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey;

Diferentes letras maiúsculas (comparação entre filmes incorporados com diferentes concentrações de PE) indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

FONTE: Autor (2024).

Em contraste, uma quantidade baixa de compostos fenólicos foi detectada quando o etanol foi usado como um simulador de alimentos gordurosos, quando comparados aos valores obtidos no meio aquoso (FIGURA 21B). Esse resultado mostra que os compostos presentes nos extratos de PHE e PE apresentaram maior afinidade com a matriz polimérica do que com o simulante utilizado (etanol). Foi observada diferença significativa entre os filmes adicionados do extrato PHE e a formulação base (PF) ( $p < 0,05$ ), mas não entre os níveis de extratos adicionados. Para os filmes com extrato PE foram observadas diferenças significativas entre todos

os níveis de extratos usados ( $p < 0,05$ ). Similar a migração em água os filmes PF6<sub>PHE</sub> e PF6<sub>PE</sub> foram os que apresentaram os maiores valores, de 20,63 e 48,11 mg de EAG.kg<sup>-1</sup> simulado de alimento, respectivamente.

De acordo com Piñeros-Hernandez *et al.* (2017), a menor migração de compostos fenólicos no simulante etanol pode ser explicada pela menor expansibilidade das matrizes à base de amido em meio etanólico. Isso resulta em uma taxa reduzida de penetração do simulante na matriz do filme, o que pode ser vantajoso em aplicações que requerem uma liberação prolongada dos antioxidantes.

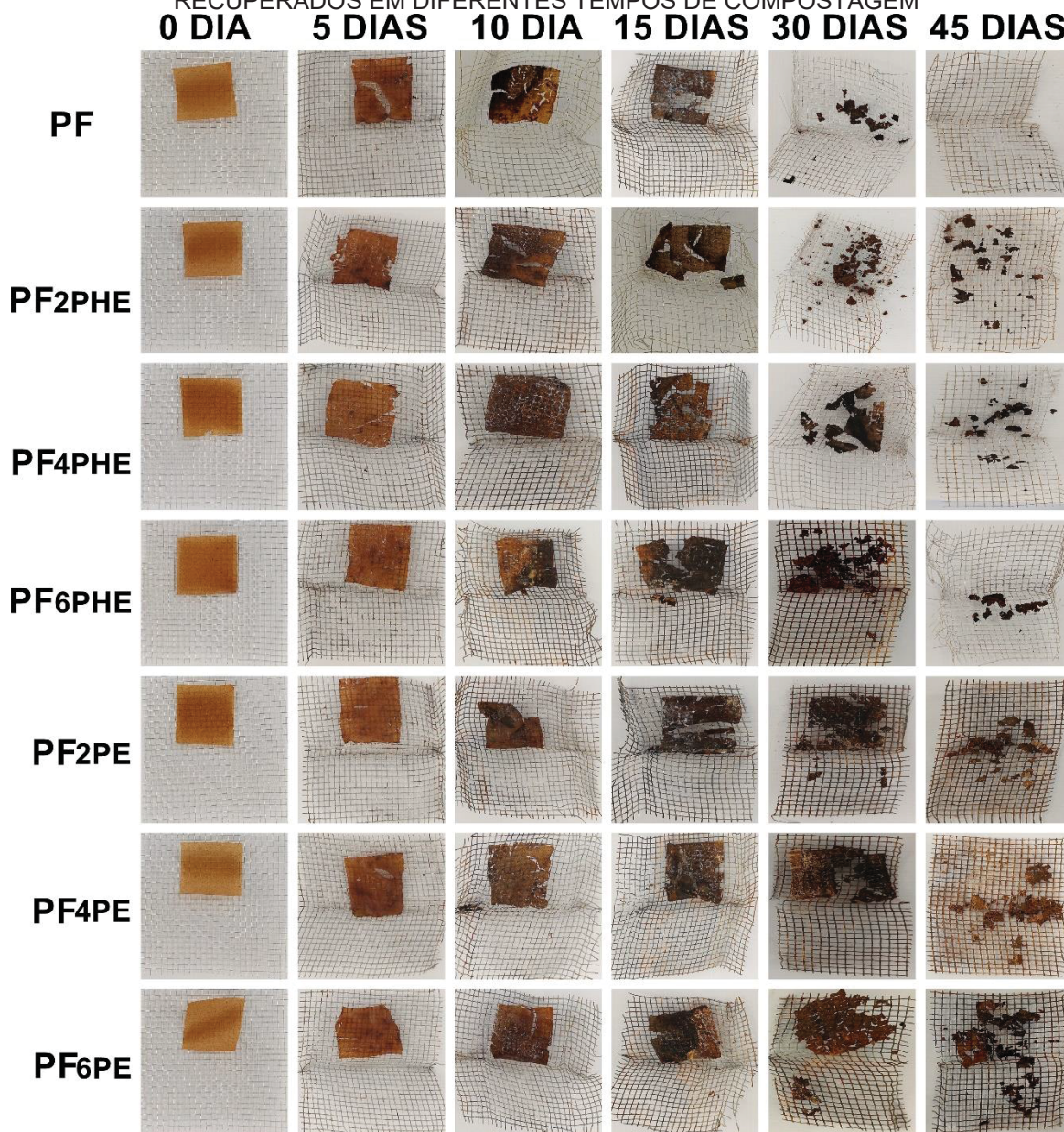
Estudos realizados por Adilah; Jamilah; Nur Hanani (2018) e Piñeros-Hernandez *et al.* (2017) ao desenvolverem filmes ativos à base de gelatina contendo extrato de caroço de manga e filmes à base de amido com extrato de alecrim, apresentaram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo em relação à migração de compostos fenólicos. Observou-se maiores valores de migração de compostos fenólicos para o meio simulante aquoso e valores mais baixos para o meio simulante gorduroso.

Devido aos consideráveis valores de atividade sequestradora do radical DPPH e ao poder antioxidante redutor de ferro férrico dos filmes adicionados de extratos PHE e PE, as formulações PF<sub>6PHE</sub> e PF<sub>6PE</sub> tornam-se promissoras a aplicação em alimentos. Desta forma, estas formulações foram utilizadas para avaliar a aplicabilidade dos filmes na inibição da oxidação lipídica e proteica de hambúrgueres bovinos frescos sob refrigeração.

#### 5.3.2.8 Degradabilidade em solo

Foi observado que todos os filmes estudados apresentaram boa degradabilidade em solo, sendo observada a evolução da biodesintegração dos filmes comestíveis ao longo do tempo (FIGURA 22). Pode-se observar que após 10 dias de estocagem em solo todos os filmes apresentaram alterações na tonalidade e integridade, sugerindo o início da degradação, onde o filme base (PF) apresentou total degradação ao final do ensaio de 45 dias. Além disso, os filmes com adição do extrato PHE apresentaram maior degradabilidade em solo que quando comparados aos filmes com extrato PE.

FIGURA 22 – APARÊNCIA VISUAL DOS FILMES ATIVOS DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO RECUPERADOS EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM



PF - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão; PF<sub>2</sub>PHE - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 2% PHE; PF<sub>4</sub>PHE - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 4% PHE; PF<sub>6</sub>PHE - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 6% PHE; PF<sub>2</sub>PE - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 2% PE; PF<sub>4</sub>PE - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 4% PE; PF<sub>6</sub>PE - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 6% PE.

FONTE: Autor (2024).

A menor degradação dos filmes pode estar relacionada com a baixa solubilidade dos filmes, uma vez que a biodegradabilidade do filme também está diretamente relacionada à sua solubilidade, que torna os componentes do filme disponíveis para os microrganismos presentes na microbiota do solo, que inclui

bactérias, fungos e protozoários (Carissimi; Flôres; Rech, 2018). É possível considerar ainda que a adição dos extratos PHE e PE afeta a degradabilidade dos filmes.

A partir da observação da FIGURA 22, fica evidente que a adição dos extratos resultou em uma relação inversamente proporcional. Quanto maior a concentração de extrato adicionado aos filmes, menor foi a sua degradabilidade no solo. Isso provavelmente ocorre devido à presença de polifenóis naturais que afetam a atividade dos microrganismos presentes no ambiente de compostagem (Cerruti *et al.*, 2011).

Considerando a norma ASTM D6400-12 (2012) de biodegradabilidade, que define polímeros biodegradáveis como aqueles que se degradam em até 180 dias, a FIGURA 22 indica que todos os filmes desenvolvidos neste estudo são 100% biodegradáveis. Estudos anteriores demonstraram que a adição de extratos de erva-mate e alecrim em filmes de amido resultou em degradação em 12 e 14 dias, respectivamente (Jaramillo *et al.*, 2016; Piñeros-Hernandez *et al.*, 2017). Além disso, filmes feitos com amido e adicionados com extrato de pimenta rosa e fibra de engaço de uva, assim como filmes funcionais de farinha de arroz com polpa de gabioba, alcançaram 100% de degradação em 30 e 45 dias, respectivamente (Laureanti *et al.*, 2021; Silva-Rodrigues *et al.*, 2020).

### 5.3.3 Aplicação dos filmes ativos em hambúrguer bovino

#### 5.3.3.1 Estabilidade nos parâmetros de cor de hambúrgueres bovinos sob armazenamento refrigerado

Com relação à visão geral dos hambúrgueres de bovinos revestidos e sua aparência durante o armazenamento, observou-se que o armazenamento influenciou gradativamente na aparência dos hambúrgueres (FIGURA 23). As mudanças na aparência dos hambúrgueres bovinos revestidos foram avaliadas a partir dos resultados de cor objetiva (FIGURA 24). De acordo com os resultados, foi observado um efeito significativo do tratamento, do tempo de armazenamento e da interação entre os fatores ( $p < 0,05$ ) para os parâmetros de cor. Para os parâmetros de luminosidade ( $L^*$ ) e intensidade de cor amarela ( $b^*$ ), foi observada diferença significativa apenas em relação ao tempo de armazenamento (FIGURA 24A e 24C).

FIGURA 23 – EFEITO DE DIVERSOS TRATAMENTOS NA APARÊNCIA DE HAMBÚRGUERES BOVINOS DURANTE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO POR ATÉ 12 DIAS



PVC - filme plástico PVC; PF<sub>BHT</sub> - filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão com BHT (200 ppm); PF<sub>6PHE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 6% PHE; PF<sub>6PE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 6% PE.

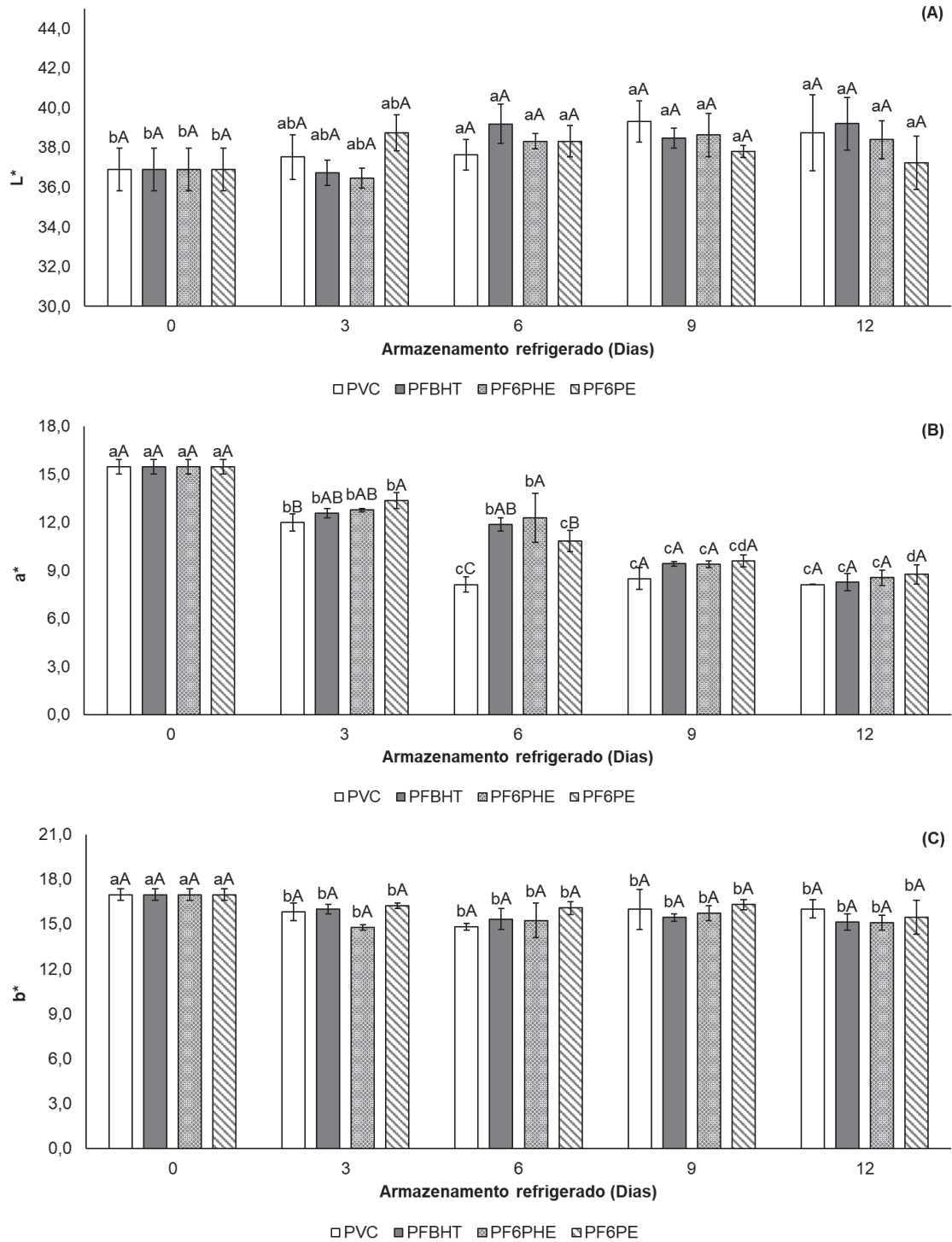
FONTE: Autor (2024).

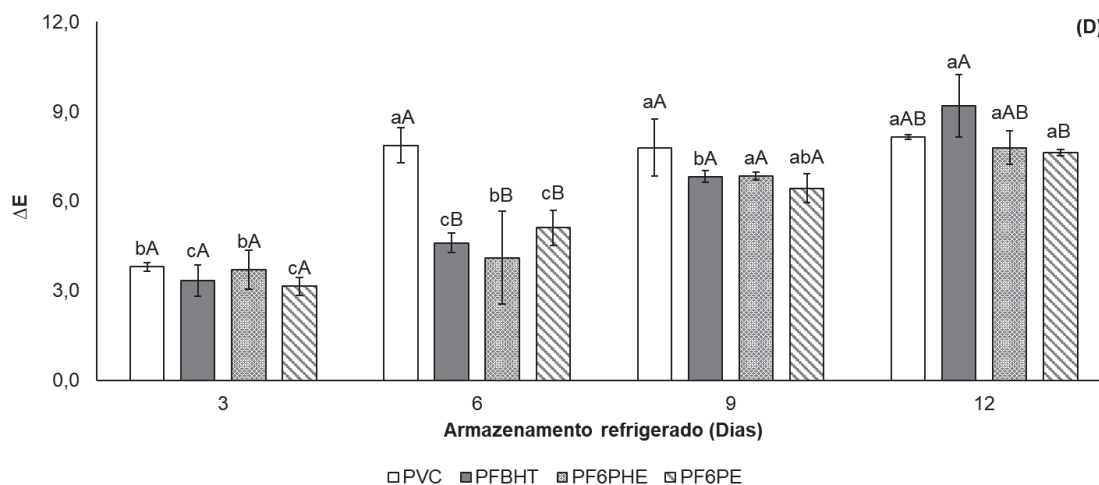
Verificou-se um aumento significativo no parâmetro L\* dos hambúrgueres bovinos durante o armazenamento, a partir do 6º dia, enquanto para o parâmetro b\* esse aumento ocorreu a partir do 3º dia. No entanto, embora o efeito dos tratamentos (filmes ativos) não tenha sido significativo na intensidade da cor amarela dos hambúrgueres bovinos ( $p > 0,05$ ), observou-se que as amostras com filmes apresentaram menores valores para o parâmetro b\* em relação à amostra revestida apenas com filme de PVC ao final do armazenamento. Os maiores valores do parâmetro b\* podem estar associados com a oxidação lipídica durante o armazenamento do produto.

Liang *et al.* (2022) relataram um comportamento inverso ao obtido nesse estudo para o parâmetro L\*, onde esses autores observaram redução nos valores de luminosidade em amostras de hambúrgueres embalados com atmosfera modificada com alto teor de oxigênio, combinados com subprodutos do processamento de alimentos vegetais. Enquanto isso, Santos *et al.* (2022) relataram comportamento

semelhante para o parâmetro b\* em hambúrguer bovino revestido com filmes à base de gelatina com adição de extrato de acerola.

FIGURA 24 – EFEITO DOS FILMES À BASE DE FARINHA DA AMÊNDOA DE PINHÃO COM EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO (PHE) E DE PRÓPOLIS (PE) NA ESTABILIDADE DA COR DE HAMBÚRGUER BOVINO DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO (12 DIAS A 4 ± 1 °C)





Valores médios  $\pm$  desvio padrão.

Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre períodos de armazenamento, diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamentos pelo teste de Tukey.

PVC - filme plástico PVC; PF<sub>BHT</sub> - filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão com BHT (200 ppm); PF<sub>6</sub>PHE - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 6% PHE; PF<sub>6</sub>PE - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 6% PE.

FONTE: Autor (2024).

Para o tom de vermelho das amostras ( $a^*$ ) houve efeito significativo da interação entre os filmes e o tempo de armazenamento ( $p < 0,05$ ), sendo observada diferença entre as amostras e o tempo de armazenamento a partir do 3° dia. Os filmes PF<sub>6</sub>PHE e PF<sub>6</sub>PE promoveram a manutenção da cor vermelha das amostras semelhante ao filme contendo BHT até o 9° dia, e foram as amostras que apresentaram maiores valores de  $a^*$  ao fim do armazenamento (FIGURA 24B).

A redução da cor vermelha nas carnes se dá pela formação de metamioglobina (cor marrom), que é proporcional à degradação oxidativa da carne ao longo do tempo de armazenamento (Yahaya *et al.*, 2019). Esta maior manutenção da cor vermelha dos hambúrgueres bovinos pode ser atribuída a presença dos compostos fenólicos oriundos dos PHE e PE que foram capazes de inibir a degradação da mioglobina. Esses resultados são relevantes, uma vez que a cor vermelha da carne é uma das características importantes de seu frescor e qualidade para os consumidores. Resultados similares foram relatados por Barbosa *et al.* (2022), que observaram maior estabilidade de  $a^*$  em hambúrgueres de cordeiro revestidos com filme ativo de amido-gelatina contendo extratos de *Syzygium cumini* e *Origanum vulgare* ao final do armazenamento sob congelamento.

A diferença colorimétrica total ( $\Delta E$ ) dos hambúrgueres em relação ao início do armazenamento foi afetada pelo tipo de filme e tempo de armazenamento, com efeito

da interação ( $p < 0,05$ ). Foi observada diferença entre os tratamentos a partir do 6º dia, onde a amostra de PVC apresentou maior variação de cor em relação ao início do armazenamento comparado aos demais tratamentos, sendo que os tratamentos obtiveram valores de  $\Delta E$  superiores a 2 desde o 3º dia (FIGURA 24D). No entanto, a amostra PF<sub>BHT</sub> foi a que apresentou o maior valor ao final do armazenamento. Ao final do armazenamento refrigerado os menores valores de  $\Delta E$  foram observados nas amostras PF<sub>6PHE</sub> e PF<sub>6PE</sub>, mostrando que esses filmes são eficazes na manutenção da cor dos hambúrgueres bovinos.

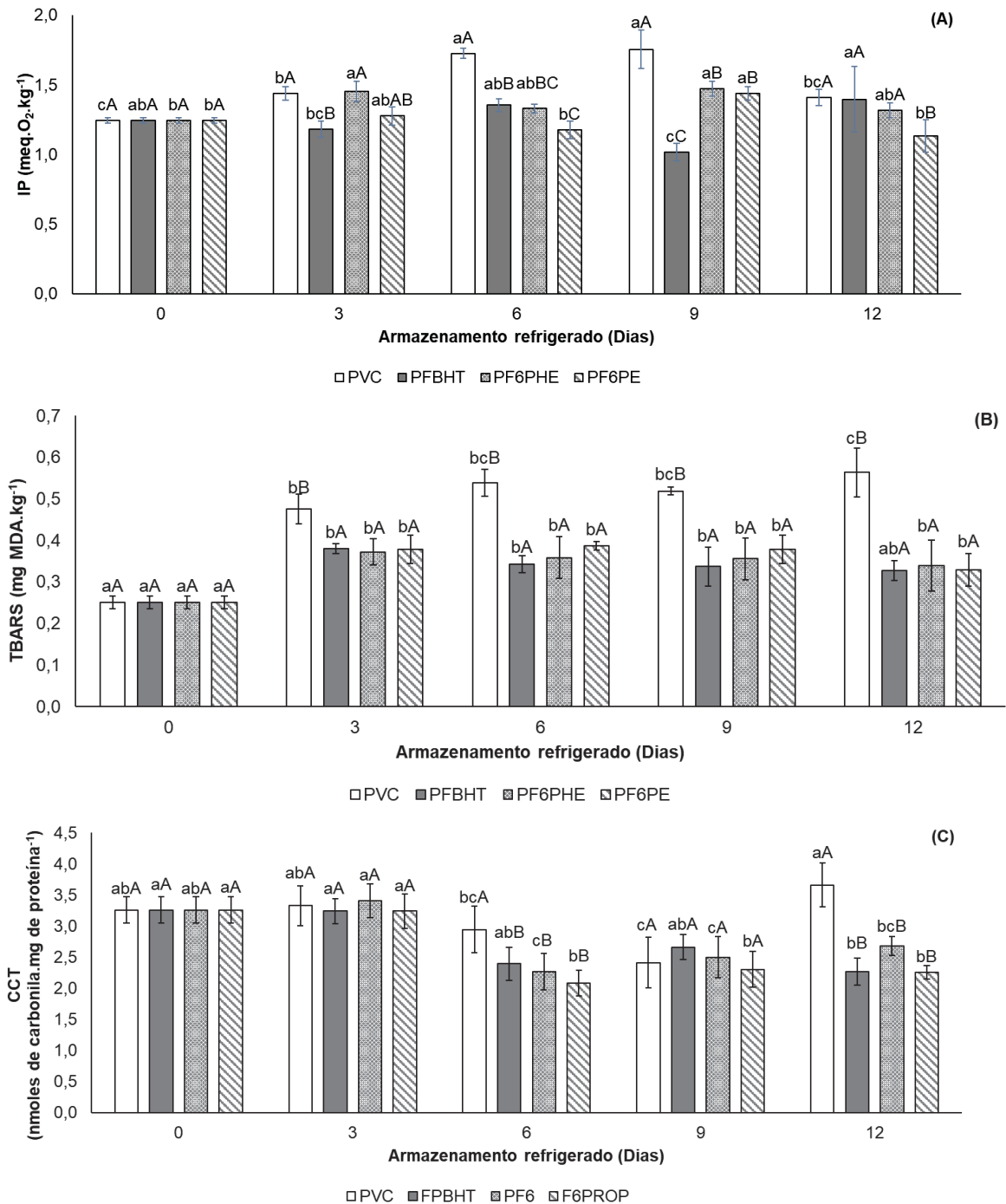
De acordo com Santana Neto *et al.* (2021), valores  $\Delta E$  acima de 2,0 são perceptíveis a visão humana, mostrando que a partir do 3º dia de armazenamento foi possível notar diferença visual das amostras de hambúrgueres bovinos. Em estudo realizado por Mohan *et al.* (2019), os autores também verificaram que amostras de carne de frango revestida em diferentes embalagens de filmes a base de amido da semente de tamarindo incorporados com as especiarias cravo (*Syzygium aromaticum*) e canela (*Cinnamomum cassia*) sob refrigeração apresentaram menores valores  $\Delta E$  em relação à amostra controle de durante o armazenamento refrigerado.

#### 5.3.3.2 Estabilidade oxidativa de hambúrguer bovino durante o armazenamento refrigerado (-4 °C)

O efeito dos filmes ativos na evolução dos índices de oxidação durante o armazenamento refrigerado dos hambúrgueres de bovino é observado na FIGURA 25. Foi observado efeito da interação significativa ( $P < 0,05$ ) para os parâmetros de índice de peróxido (IP), TBARS e compostos carbonílicos.

O IP é uma medida da quantidade de hidroperóxidos formados como produtos iniciais da oxidação de lipídios. Essas substâncias são altamente reativas e podem desencadear reações oxidativas adicionais tanto em lipídios quanto em proteínas (Akcan; Estévez; Serdaroğlu, 2017; Estévez, 2011). O IP para todas as amostras de hambúrguer revestidas com os filmes ativos flutuou durante o armazenamento, provavelmente devido à instabilidade dos hidroperóxidos. A partir do 3º dia de armazenamento foi observado o incremento nos valores de IP nas amostras, tendo um pico na geração de hidroperóxidos no 9º dia de armazenamento, observou-se diferença significativa entre os tipos exceto para o filme PF<sub>BHT</sub> (FIGURA 25A).

FIGURA 25 – RESULTADOS DOS ÍNDICES DE PERÓXIDOS (IP), TBARS E COMPOSTOS CARBONÍLICOS TOTAIS (CCT) DE HAMBÚRGUER BOVINO DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO (12 DIAS A  $4 \pm 1$  °C)



Valores médios  $\pm$  desvio padrão.

Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre períodos de armazenamento, diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamentos pelo teste de Tukey.

PVC - filme plástico PVC; PF<sub>BHT</sub> - filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão com BHT (200 ppm); PF<sub>6PHE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 6% PHE; PF<sub>6PE</sub> - Filme comestível da farinha da amêndoa de pinhão incorporado com 6% PE.

FONTE: Autor (2024).

Os valores de IP dos hambúrgueres PF<sub>6PHE</sub> e PF<sub>6PE</sub> apresentaram comportamento semelhante com os PE<sub>BHT</sub>, de modo que os hambúrgueres revestidos com o filme PF<sub>6PE</sub> tiveram valores de IP mais baixos do que os tratamentos controle (PVC). Ao final do armazenamento os filmes PF<sub>6PHE</sub> e PF<sub>6PE</sub> promoveram menor geração de hidroperóxidos durante o armazenamento refrigerado com redução de 6,38 e 19,86% na formação destes compostos em relação ao filme PVC, e superiores a redução obtida pelo filme PF<sub>BHT</sub> com redução de 0,71% na formação destes compostos em relação ao filme PVC. Essa maior redução no IP dos hambúrgueres se deu provavelmente porque os extratos PHE e PE adicionados aos filmes possuem uma alta atividade antioxidante, e os filmes demonstraram ter valores consideráveis sequestradora do radical livre DPPH e poder antioxidante redutor de ferro férrico (FRAP de 12,96±0,44 e 16,78±0,33 para os filmes PF<sub>6PHE</sub> e PF<sub>6PE</sub>, respectivamente).

Comportamento similar foi observado em estudos realizados por Akcan; Estévez; Serdaroğlu (2017) em almôndegas cozidas durante o armazenamento congelado com filmes comestíveis de proteína de soro de leite com extrato de *Laurus nobilis* L. e *Salvia officinalis* e por Goudarzi; Moshtaghi; Shahbazi (2023), que avaliaram o efeito de mantas de fibra eletrofiada de Kappa-carragenina-poli(álcool vinílico) com antocianinas de *Prunus domestica* e galato de epigallocatequina em carne bovina picada. Esses autores relataram que os filmes com adição de extrato embora tenha sofrido flutuações nos valores de peróxido se mostraram efetivos.

Quanto ao resultado de compostos secundários oriundos da oxidação lipídica, os valores de TBARS, sobre 12 dias de armazenamento refrigerado são mostrados na FIGURA 25B. No decorrer do armazenamento, foi observado o aumento de TBARS a partir do 3º dia de armazenamento para todas as amostras. No entanto as amostras revestidas com filmes ativos mantiveram valores de TBARS estáveis até o fim do armazenamento.

No que diz respeito à oxidação lipídica, esta é um processo no qual os ácidos graxos insaturados são expostos a espécies reativas de oxigênio. Isso resulta na degradação dos lipídios e na formação de produtos de oxidação secundária, como aldeídos e, principalmente, o malonaldeído, um dos produtos finais provenientes da decomposição do hidroperóxidos em função do tempo de armazenamento (Freitas; González-Martínez; Chiralt, 2023; Moradi *et al.*, 2023).

Durante o armazenamento, observou-se que todos os tratamentos apresentaram valores significativamente menores de TBARS em comparação ao

grupo controle ( $p < 0,05$ ). As amostras de PVC exibiram uma variação de 0,25 a 0,56 mg MDA.kg<sup>-1</sup> de amostra, enquanto as amostras PF<sub>6PHE</sub> e PF<sub>6PE</sub> registraram valores de 0,34 e 0,33 mg MDA.kg<sup>-1</sup> ao longo dos 12 dias de armazenamento refrigerado. Os resultados obtidos pelo IP foram consistentes com os valores de TBARS ao final do período de armazenamento. As amostras PF<sub>6PHE</sub> e PF<sub>6PE</sub> apresentaram um comportamento semelhante ao do PF<sub>BHT</sub>, demonstrando uma menor formação de malonaldeído durante o armazenamento refrigerado dos hambúrgueres. Esses tratamentos mostraram mais efetivos para o retardo da formação de compostos secundários da oxidação lipídica, com uma redução de 39,29%, 41,07% e 41,07% nos valores de TBARS, respectivamente, em comparação com o filme de PVC.

Estudo realizado por Navikaite-Snipaitiene *et al.* (2018) e Venkatachalam; Lekjing (2020), corroboram esse resultado. Esses autores observaram uma redução na formação de malonaldeído e, conseqüentemente, menores valores de TBARS em amostras de carne bovina fresca tratadas com filmes de amido de milho ceroso modificado e acetato de celulose contendo óleo essencial de cravo/eugenol, assim como em hambúrgueres de carne suína revestidos com filmes comestíveis à base de quitosana contendo óleo essencial de cravo e nisina, em comparação com as amostras controle durante o armazenamento refrigerado.

Quanto a oxidação proteica nos hambúrgueres bovino, sua evolução foi avaliada através da determinação dos compostos carbonílicos totais (CCT), e o resultado encontra-se disposto na FIGURA 25C. Foi observado efeito significativo do tratamento, do tempo de armazenamento e a interação entre os fatores sobre a oxidação das proteínas ( $p < 0,05$ ). O CCT para todas as amostras apresentou flutuações durante o armazenamento. As amostras revestidas com filme comercial (PVC) apresentaram concentração de compostos carbonílicos totais que variaram de 2,41 a 3,66 ao longo do armazenamento. Os hambúrgueres tratados com filmes contendo PHE e PE apresentaram menores valores de compostos carbonílicos no início do armazenamento, bem como quando comparados com a amostra PVC.

Os filmes PF<sub>6PHE</sub> e PF<sub>6PE</sub> foram efetivos na proteção contra a oxidação proteica dos hambúrgueres, onde os tratamentos mostraram uma redução de 26,78 e 38,25%, respectivamente, na produção de compostos carbonílicos, comparado à amostra PVC no final do armazenamento. Essa menor produção de carbonílicos totais nas amostras pode ser atribuída à presença dos compostos fenólicos, que se mostraram efetivos na inibição contra a formação de carbonilas proteicas totais

(Santana Neto *et al.*, 2021). Além disso, as amostras PF<sub>6PHE</sub> e PF<sub>6PE</sub> se mostraram tão efetivas quanto a PF<sub>BHT</sub> na produção de compostos carbonílicos durante todo o armazenamento refrigerado.

Sabe-se que a oxidação de proteínas é promovida durante o manuseio, processamento e armazenamento de alimentos, e a formação de carbonilas é considerada um indicador geral para avaliar o nível de oxidação de proteínas (Estévez; Xiong, 2021; Santana Neto *et al.*, 2021). A presença de compostos de oxidação lipídica como hidroperóxidos podem induzir na oxidação de proteínas, pois estes podem se decompor em carbonilas e outras substâncias (como os aldeídos) que prontamente oxidam componentes das proteínas, como tióis e aminoácidos, resultando na formação de compostos carbonílicos (Santana Neto *et al.*, 2021).

Em estudos recentes, Wang *et al.* (2020) e Amiri *et al.* (2019) reportaram menores valores de compostos carbonílicos em amostras de carne bovina temperada revestidas com filmes de quitosana incorporados com óleo essencial de caroço de damasco (*Prunus armeniaca*), e em carne moída fresca revestidas com filmes de amido de milho com nanoemulsão de óleo essencial de *Zataria multiflora* fortificado com cinamaldeído, quando comparado às amostras controle. Os resultados deste estudo também são corroborados por estudos realizados por Mohan *et al.* (2019), que relataram redução na formação de compostos carbonílicos em amostras de frango armazenadas em diferentes embalagens de filmes a base de amido da semente de tamarindo incorporados com as especiarias cravo (*Syzygium aromaticum*) e canela (*Cinnamomum cassia*) sob refrigeração.

#### 5.4 CONCLUSÕES

Com base neste estudo, foi possível observar que os extratos PHE e PE possuem alto teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. A incorporação dos extratos influenciou nas propriedades mecânicas e no PVA, além de alterar as propriedades microestruturais dos filmes à base de farinha da amêndoa de pinhão. Os filmes ativos apresentaram propriedades mecânicas próximas aos filmes usados em embalagens de alimentos, como PVC e LDPE.

Os filmes ativos contendo PHE e PE apresentaram valores relevantes de compostos fenólicos e atividade antioxidante, enquanto os testes de migração mostraram que, após 7 dias de exposição dos filmes, o conteúdo de polifenóis migrou

majoritariamente para o simulante aquoso, enquanto apenas uma baixa quantidade de compostos fenólicos foi detectada no simulante gorduroso. Os filmes ativos com PHE apresentaram alta taxa de biodegradação após 30 dias, enquanto os filmes ativos com PE apresentaram após 45 dias de compostagem.

É possível afirmar ainda que os filmes à base de farinha da amêndoa de pinhão incorporados com PHE e PE foram capazes de manter a coloração vermelha e menores variações de cor em relação ao início do armazenamento, quando comparados com o controle. O uso de níveis de 6% de PHE e PE nos filmes demonstrou ser tão eficiente quanto o uso do antioxidante sintético BHT em retardar as reações de oxidação lipídica e proteica dos hambúrgueres de carne bovina, prolongando sua vida útil. Dessa forma, os filmes ativos desenvolvidos podem ser utilizados como embalagens primárias para alimentos, a fim de retardar as reações de oxidação lipídica e proteica, aumentando a vida útil dos produtos.

## **6 CAPÍTULO 6 – EMBALAGENS ATIVAS À BASE DE GELATINA CONTENDO EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO E PRÓPOLIS PARA INIBIR A OXIDAÇÃO LIPÍDICA E PROTEICA EM HAMBÚRGUERES BOVINOS ARMAZENADOS A FRIO**

Este capítulo faz parte do artigo intitulado “Gelatin-based active packaging containing pinhão and propolis extracts to inhibit lipid and protein oxidation in refrigerated stored beef patties.”

## **EMBALAGENS ATIVAS À BASE DE GELATINA CONTENDO EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO E PRÓPOLIS PARA INIBIR A OXIDAÇÃO LIPÍDICA E PROTEICA EM HAMBÚRGUERES BOVINOS ARMAZENADOS A FRIO**

**Resumo:** Foram desenvolvidos filmes ativos à base de gelatina reforçados com pó da casca de pinhão e enriquecidos com extratos da casca de pinhão (PHE) e própolis (PE), com o objetivo de prevenir alterações na qualidade de hambúrgueres bovinos durante o armazenamento refrigerado. Para isso, sete formulações de filmes de gelatina foram elaboradas e os filmes foram caracterizados quanto às propriedades mecânicas, de barreira, atividade antioxidante e degradabilidade. As formulações contendo 6% dos extratos PHE (GF<sub>6PHE</sub>) e PE (GF<sub>6PE</sub>) foram escolhidas como embalagens ativas para avaliar o potencial antioxidante na oxidação lipídica e proteica de hambúrgueres bovinos durante o armazenamento. Filme PVC foi utilizado como controle e a formulação base (GF) adicionada com BHT como controle positivo. A incorporação dos extratos resultou em mudanças nas propriedades mecânicas e de barreira dos filmes. O PHE aumentou a resistência à tração (RT), enquanto o PE reduziu esse parâmetro. Os extratos também promoveram um aumento na permeabilidade ao vapor de água dos filmes, mas não tiveram influência na degradabilidade no solo. Os filmes GF<sub>6PHE</sub> e GF<sub>6PE</sub> foram eficazes na preservação da qualidade das amostras de hambúrgueres bovinos, resultando em menores variações na cor em comparação com os outros tratamentos durante o armazenamento. Além disso, reduziram significativamente a formação de malonaldeído (40,86% e 50%) e compostos carbonílicos totais (38,52% e 23,77%) em comparação com as amostras embaladas com PVC. Portanto, esses filmes podem ser utilizados como materiais de embalagem para melhorar as características de qualidade da carne, contribuindo para a conservação dos hambúrgueres bovinos durante o armazenamento refrigerado.

**Palavras-chave:** *Araucaria angustifolia*, capacidade antioxidante, embalagem ativa, produto cárneos, aditivo natural, estabilidade oxidativa, oxidação proteica, oxidação lipídica.

## 6.1 INTRODUÇÃO

O hambúrguer é um produto cárneo amplamente consumido em todo o mundo. No entanto, devido à sua natureza reestruturada, é mais suscetível à oxidação lipídica e proteica, uma vez que a superfície da carne é mais exposta ao oxigênio atmosférico e aos catalisadores de oxidação de metais (Amiri *et al.*, 2019). Dentre os processos de deterioração química, a oxidação é considerada um dos principais fatores que influenciam a degradação dos produtos cárneos (Amiri *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2022).

A incorporação de conservantes naturais em embalagens ativas tem surgido como uma solução eficaz para mitigar os efeitos adversos da autooxidação em produtos cárneos. No entanto, é essencial ressaltar que as embalagens plásticas convencionais apresentam preocupação ambiental significativa, uma vez que são incapazes de se biodegradar (Ansarian *et al.*, 2022). Além disso, essas embalagens frequentemente contêm antioxidantes sintéticos, como o hidroxianisol butilado (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT), os quais apesar de serem economicamente viáveis e altamente eficientes, apresentam potenciais riscos à saúde (Zhang *et al.*, 2019).

Nesse contexto, os filmes comestíveis e revestimentos feitos de biopolímeros naturais, como proteínas, polissacarídeos e lipídios, têm ganhado destaque como uma alternativa às embalagens sintéticas de alimentos, devido à sua segurança e capacidade de biodegradação (Benbettaïeb; Debeaufort; Karbowiak, 2019; Song *et al.*, 2023). Além disso, o uso de conservantes naturais em embalagens ativas pode ser uma opção eficaz para prevenir os efeitos adversos da autooxidação em produtos alimentícios (Ansarian *et al.*, 2022).

A gelatina, um hidrolisado do colágeno, é um dos principais biopolímeros utilizados na produção de filmes de embalagens biodegradáveis, devido à sua ampla disponibilidade, baixo custo, atoxicidade, resistência a gases e óleos, biodegradabilidade, boa capacidade de formação de filmes, baixo ponto de fusão e baixo impacto ambiental (Santos *et al.*, 2022; Shankar; Wang; Rhim, 2019; Zhang *et al.*, 2019). A aplicação de filmes à base de gelatina incorporados com antioxidantes naturais tem atraído interesse como uma alternativa potencial aos materiais de embalagem sintéticos para produtos cárneos, visando controlar a deterioração da qualidade da carne (Ahmadi; Ahmadi; Ehsani, 2020; Barbosa *et al.*, 2022; Chaari *et al.*, 2022; Gallego *et al.*, 2016; Jridi *et al.*, 2018; Qiu *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2022).

No entanto, até o momento, não existem estudos sobre o uso de filmes à base de gelatina contendo extratos hidroalcoólico da casca de pinhão (PHE) e própolis (PE) como inibidores da oxidação lipídica e proteica em hambúrgueres bovinos. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a incorporação de extratos da casca de pinhão (PHE) e própolis (PE) em filmes à base de gelatina para controlar a oxidação lipídica e proteica em hambúrgueres de carne bovina durante o armazenamento.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1 Materiais

A casca de pinhão foi obtida através da Embrapa Floresta (safra 2020, coordenadas geográficas: 25°19'18.2"S, 9°09'33.7"W, Colombo, PR, Brasil), seca e triturada em moinho de facas (STARFT-50, Fortinox, Brasil) e peneirada a 100 mesh (casca em pó). A própolis bruta produzida pela abelha *Apis mellifera* foi proveniente de Muzambinho (21°22'33"S, 46°31'33"O - Minas Gerais, Brasil) no ano de 2021. Glicerina (Alphatec, Santana-SP, grau analítico, Brasil) foi utilizada como plastificante na elaboração dos filmes.

### 6.2.2 Obtenção dos extratos de casca de pinhão (PHE) e própolis (PE)

O extrato da casca de pinhão foi obtido por extração sólido-líquido, usando a maceração em etanol 42% com uma razão de 1:50 (m/v). A mistura foi homogeneizada e aquecida em banho-maria (70 °C/32 min), seguida de filtração a vácuo. A fração etanólica removida sob vácuo em evaporador rotativo (180 mbar/45 °C) (Fisatom – 801, São Paulo - SP, Brasil). O volume final do extrato ajustado para 500 mL e armazenado em frasco âmbar a -20 °C.

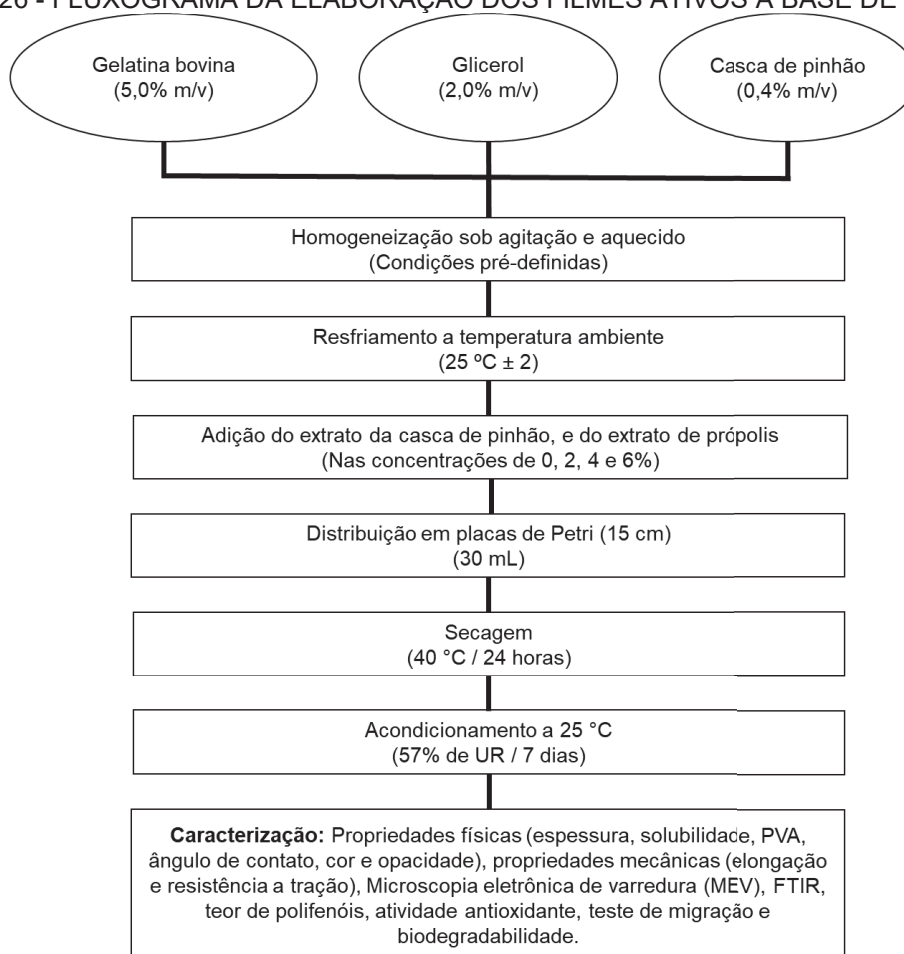
Para obter o extrato de própolis verde, foi realizada uma extração sólido-líquido conforme descrito por de Santana Neto *et al.* (2024). A própolis verde moída foi homogeneizada com etanol 70% (v/v) em uma razão de 1:25 (m/v), mantida sob agitação em ausência de luz (500 rpm/25 °C/48 h) (Fisatom, model 752A, Brazil). Em seguida, a mistura submetida à sonicação em um banho ultrassônico (40 kHz/1 h) (1440 DA Biodont, Brasil), e filtrada a vácuo e congelados (-20 °C/24 h) para precipitação de ceras e substâncias menos solúveis. O extrato foi filtrado novamente,

e a fração etanólica removida sob vácuo em evaporador rotativo (180 mbar/45 °C), o volume ajustado para 500 mL e armazenado em frasco âmbar a -20 °C. Os extratos foram avaliados quanto ao teor de compostos fenólicos totais conforme descrito Waterhouse (2002) com modificações, e atividade antioxidante frente ao radical DPPH<sup>•</sup> conforme descrito por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995).

### 6.2.3 Elaboração dos filmes ativos comestíveis

Para a elaboração dos filmes, foram utilizadas as condições ótimas definidas por De Santana Neto *et al.* (2024), para as quantidades de gelatina bovina, glicerol e pó da casca de pinhão utilizada nos filmes. O processo de elaboração dos filmes pode ser visualizado na FIGURA 26.

FIGURA 26 - FLUXOGRAMA DA ELABORAÇÃO DOS FILMES ATIVOS À BASE DE GELATINA



FONTE: Autor (2024).

Para os filmes ativos e comestíveis de gelatina (GF), a gelatina bovina (5% m/v) foi solubilizada em água destilada sob agitação por (70 °C/20 min) (Fisatom, modelo 752A, Brasil). Em seguida, foram adicionados glicerol (2% m/v) e casca de pinhão (0,4% m/v) à solução, sendo aquecida a 50°C sob agitação por 30 min. A solução foi resfriada a temperatura ambiente (25 °C ± 2) antes da adição dos extratos. Cada solução filmogênica (30 mL) foi então vertida em placas de Petri estéreis (15 cm de diâmetro) e secas em estufa com circulação forçada de ar a 40°C (Nova Ética, modelo 400/6ND, Brasil) por 24 h.

Foram preparados um total de 140 filmes, que foram agrupados em quatro tratamentos, com 20 filmes em cada tratamento. Os tratamentos incluíram: filme comestível de gelatina sem adição de extratos (GF), filme comestível de gelatina incorporado com 2% PHE (GF<sub>2PHE</sub>) (v/v), filme comestível de gelatina incorporado com 2% PE (GF<sub>2PE</sub>) (v/v), filme comestível de gelatina incorporado com 4% PHE (GF<sub>4PHE</sub>) (v/v), filme comestível de gelatina incorporado com 4% PE (GF<sub>4PE</sub>) (v/v), filme comestível de gelatina incorporado com 6% PHE (GF<sub>6PHE</sub>) (v/v) e filme comestível de gelatina incorporado com 6% PE (GF<sub>6PE</sub>) (v/v). Após a secagem, todos os filmes foram acondicionados por 7 dias em dessecador contendo solução saturada de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> (54% UR, 25 °C) para posterior caracterização.

#### 6.2.4 Caracterização dos filmes ativos

##### 6.2.4.1 Espessura e propriedades mecânicas

A espessura dos filmes foi avaliada utilizando um micrômetro digital (Mitutoyo, Japão) com resolução de 0,001 mm. A espessura média dos filmes foi obtida após 10 mensurações aleatórias. As propriedades mecânicas dos filmes para alongação na ruptura (ELO, %) e resistência à tração (RT, MPa) foram avaliadas utilizando um texturômetro (Brookfield CT3, Brookfield, EUA), equipado com probe TA-DGA (Conjunto aperto duplo, Brookfield) seguindo o método padrão D882-12 (ASTM, 2012). A separação inicial das garras e a velocidade da sonda foram de 20 mm e 1 mm/s, respectivamente, com uma força de disparo de 0,1 N. Foram feitas oito repetições para cada tipo de filme.

#### 6.2.4.2 Solubilidade em água

A solubilidade dos filmes foi avaliada conforme descrito por Ge *et al.* (2018). As amostras dos filmes foram cortadas em quadrados (2 x 2 cm), secas em estufa (100 ± 5 °C/24 h) e pesada ( $M_0$ ). Em seguida, os filmes secos foram imersos em 50mL de água destilada (25 °C/24 h). Posteriormente, as amostras foram secas em estufa (105 °C/24 h) para determinar a massa seca final ( $M_1$ ), e a solubilidade dos filmes foi calculada conforme a Equação 25.

$$\text{Sol}(\%) = \left( \frac{M_0 - M_1}{M_0} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 25})$$

#### 6.2.4.3 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes de gelatina foi avaliada de acordo com o método padrão E96/E96M-16 (ASTM, 2016), com modificações. Amostras dos filmes, com 3 cm de diâmetro foram fixadas em cápsulas de permeabilidade adaptadas com abertura de diâmetro de 2,5 cm (área de exposição de 0,0013 m<sup>2</sup>) contendo cloreto de cálcio anidro (CaCl<sub>2</sub>) com 0% de umidade relativa (UR). Todo o sistema foi mantido a 25 °C em dessecador contendo solução saturada de NaCl (70% UR). O ganho de massa do sistema foi avaliado em intervalos de 24 h, durante 7 dias. A permeabilidade ao vapor de água foi calculada pela Equação 26.

$$\text{PVA} = \frac{G}{t} \frac{x}{A \cdot P_s \cdot (UR_1 - UR_2)} \quad (\text{Eq. 26})$$

A razão  $G/t$  (g.h<sup>-1</sup>) representa o coeficiente angular gerado pelo ganho de massa da amostra em função do tempo,  $x$  (mm) é a espessura da amostra,  $A$  (m<sup>2</sup>) é a área disponível para permeação,  $P_s$  (kPa) é a pressão de saturação do vapor de água na temperatura de 25 °C, enquanto  $UR_1$  e  $UR_2$  são as umidades relativas (expressas em fração) no interior do dessecador e cápsula, respectivamente.

#### 6.2.4.4 Propriedades ópticas

A cor instrumental dos filmes foi avaliada por meio da análise dos parâmetros de luminosidade ( $L^*$ ), tonalidade de verde/vermelho ( $a^*$ ) e azul/amarelo ( $b^*$ ) utilizando um colorímetro digital (HunterLab, model MiniScan EZ 4500 L, EUA) previamente calibrado com placas branca e preta fornecidos pelo fabricante, sob o sistema CIELAB. Para a leitura das coordenadas de cor, foram padronizadas as seguintes condições: iluminante D65, ângulo de visão  $8^\circ$ , ângulo padrão do observador 10, com uso da placa branca como fundo. A opacidade dos filmes foi avaliada conforme descrito por Nazurah; Nur Hanani (2017).

#### 6.2.4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A estrutura morfológica da superfície dos filmes de gelatina foi avaliada com auxílio da microscopia eletrônica de varredura (TescanVega 3 LMU, Kohoutovice, República Tcheca). Os filmes foram fraturados por congelamento com nitrogênio líquido, e fixadas em suportes com fita de cobre e, em seguida, metalizadas com ouro (Balzers Union, modelo FL 9496, Alemanha). As imagens foram capturadas utilizando uma voltagem de 15 kV.

#### 6.2.4.6 Espectroscopia no infravermelho por transformada de *Fourier* (FTIR)

Os filmes de gelatina foram caracterizados pela espectroscopia na região do infravermelho por transformada de *Fourier* (FTIR), realizada em equipamento *Vertex 70* (Bruker, EUA) equipado com acessório de refletância total atenuada (ATR) contendo um cristal de seleneto de zinco. A análise foi conduzida na faixa espectral de  $500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  e resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 6.2.4.7 Degradação dos filmes em solo

A degradação dos filmes foi determinada seguindo a metodologia proposta por Piñeros-Hernandez *et al.* (2017), com modificações. Inicialmente as amostras de filme foram cortadas em formato retangular ( $2 \times 2 \text{ cm}$ ), secas em estufa ( $60 \text{ }^\circ\text{C}/24 \text{ h}$ ). Cada amostra previamente seca, foi envolvida em tela de alumínio ( $2,5 \times 3,5 \text{ cm}$ ), para

permitir o contato do filme com o solo. No ensaio de degradabilidade dos filmes, cada amostra foi colocada a uma profundidade de 4 cm da superfície do solo orgânico natural, adquirido em mercado local em Curitiba (Paraná, Brasil) em caixas plásticas (45 cm x 20 cm x 15 cm). Foram necessárias cinco caixas, sendo destinada uma caixa para cada tempo de amostragem. As bandejas plásticas foram colocadas em uma sala com temperatura ambiente e mantidas em condições aeróbias, com umidade em torno de 60% e com adição periódica de água. Após isso, as amostras dos filmes foram retiradas após 5, 10, 15, 30 e 45 dias do teste de desintegração. O processo de degradação foi monitorado mediante de inspeção visual dos filmes, onde após cada período, o sistema (malha + filme) foi desenterrado, lavado com água destilada e seco com a ajuda de papel filtro, e mantidos em estufa a 60 °C seguido do registro das imagens.

#### 6.2.4.8 Teor de polifenóis e atividade antioxidante dos filmes

A extração dos compostos antioxidantes dos filmes foi realizada segundo Kang; Song (2019) com modificações. As amostras do filme (1 g) foram homogeneizadas com 20 mL de etanol 80% em água (v/v) e mantidas sob agitação constante em banho-dubnoff (Dubnoff Bath, Solab, modelo SL – 157) (45°C/3 h a 125 rpm). Em seguida, o extrato foi filtrado e o volume corrigido para o inicial de 20 mL.

Os compostos fenólicos totais dos extratos dos filmes foram quantificados pelo método do reagente Folin-Ciocalteu, como descrito por Waterhouse (2002) com modificações, e a atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo ensaio frente ao radical DPPH<sup>•</sup> (Brand-Williams; Cuvelier; Berset, 1995) e pelo poder redutor do ferro (FRAP) (Benzie; Strain, 1996).

#### 6.2.4.9 Testes de migração dos compostos ativos

Os testes de migração foram conduzidos de acordo como descrito por Piñeros-Hernandez *et al.* (2017). As amostras de filme foram cortadas em pedaços de 2 cm<sup>2</sup> e imersas em 5 mL de meios simulados, sendo água para representar meio aquoso e etanol a 95% para representar meio lipídico. Em seguida, foram colocadas em um agitador a 25 °C e 125 rpm durante 7 dias. Após o tempo de exposição, a migração de polifenóis para cada meio simulado foi avaliada utilizando o método de

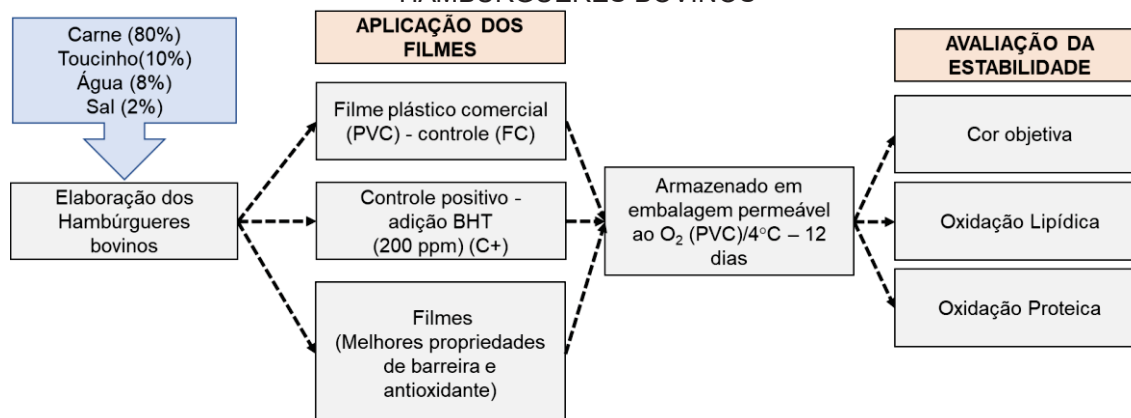
Folin-Ciocalteu, conforme Waterhouse (2002) com modificações, e os resultados expressos em mg de EAG.kg<sup>-1</sup> simulado de alimento.

### 6.2.5 Elaboração dos hambúrgueres e aplicação dos filmes

Os hambúrgueres foram preparados utilizando carne bovina e toucinho adquiridos no mercado local. Um total de 75 hambúrgueres, com aproximadamente 50 g cada, foi preparado seguindo a formulação básica: carne (80%), toucinho (10%), água gelada (8%) e cloreto de sódio (2%). Para a aplicação dos filmes ativos, utilizamos a formulação GF como base, que foi elaborada com adição de BHT (200 ppm) como referência (GF<sub>BHT</sub>), e os filmes com maiores níveis de adição de extrato (GF6%<sub>PHE</sub> e GF6%<sub>PE</sub>), sendo o filme de PVC utilizado como controle.

Os filmes foram aplicados aleatoriamente nos hambúrgueres, que foram dispostos em bandejas de poliestireno expandido e revestidos com filme de policloreto de vinila (PVC) (permeabilidade ao oxigênio:  $\cong 17 \text{ cm}^3/\text{m}^2 \text{ dia atm.}$  e permeabilidade à umidade:  $< 5 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\text{dia}$ ). Os hambúrgueres foram armazenados sob refrigeração em uma geladeira (modelo Eletrolux TF39, Brasil) a uma temperatura de  $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  por 12 dias. As amostras para análise foram coletadas no dia em que os hambúrgueres foram preparados (dia 0) e nos dias 3, 6, 9 e 12 de armazenamento. O fluxograma do experimento é demonstrado na FIGURA 27.

FIGURA 27 - FLUXOGRAMA DA APLICAÇÃO DOS FILMES ATIVOS À BASE DE GELATINA EM HAMBÚRGUERES BOVINOS



FONTE: Autor (2024).

## 6.2.6 Avaliação da estabilidade oxidativa dos hambúrgueres

### 6.2.6.1 Cor objetiva

A estabilidade da cor objetiva dos hambúrgueres foi determinada por meio da avaliação dos parâmetros de luminosidade ( $L^*$ ), teor de verde/vermelho ( $a^*$ ) e azul/amarelo ( $b^*$ ), utilizando um colorímetro digital (Konica Minolta, modelo CHROMA METER CR-400, Osaka, Japão), sob o sistema CIELAB. Durante o armazenamento refrigerado, a diferença colorimétrica total ( $\Delta E$ ) das amostras de hambúrgueres foi calculada em relação às amostras no início do armazenamento, utilizando-se a Equação 27.

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (\text{Eq. 27})$$

Onde,  $\Delta L^* = L^*_{0 \text{ dias de armazenamento}} - L^*_x \text{ dias de armazenamento}$ ,  $\Delta a^* = a^*_{0 \text{ dias de armazenamento}} - a^*_x \text{ dias de armazenamento}$  e  $\Delta b^* = b^*_{0 \text{ dias de armazenamento}} - b^*_x \text{ dias de armazenamento}$ .

### 6.2.6.2 Índice de peróxido

O índice de peróxido foi determinado de acordo com o método adaptado do IDF (1991), Mehta; Darji; Aparnathi (2015) e Semb (2012), com modificações. Para isso, foram utilizados 2,5 g de amostra, que foi homogeneizada com 40 mL de clorofórmio: metanol (7:3 v/v) em ultraturrax (3500 rpm) por 3 min e filtrada. Em seguida uma alíquota de 10 mL do extrato lipídico foi transferida e adicionada de 50  $\mu\text{L}$  de tiocianato de amônio (30%), e homogeneizada em vórtex por 5 s. Em seguida foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de cloreto ferroso ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,02M em HCl 3,7%), e a amostra novamente homogeneizada em vórtex por 5 s. A mistura foi incubada por 5 min, e submetidos a leitura em espectrofotômetro a 500 nm.

### 6.2.6.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foram quantificadas utilizando o método descrito por Rosmini *et al.* (1996). As amostras de hambúrgueres (2,5 g) foram submetidas à extração em condições ácidas, onde foram adicionados 250  $\mu\text{L}$

de solução de BHT 4,2% em álcool (m/v), e homogeneizadas com 7,5 mL de ácido tricloroacético (10% m/v) em ultra-turrax (3500 rpm/3 min) (T-25 Digital, IKA, Alemanha) para facilitar a extração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Em seguida, a mistura foi submetida à centrifugação (1372 g/3 min/4 °C) e filtrada para obtenção do extrato, o qual foi utilizado para a quantificação do teor de TBARS.

As substâncias extraídas em condições ácidas foram submetidas a reação com ácido tiobarbitúrico (0,02 M) a 95 °C durante 30 min. A leitura das amostras foi realizada em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 532 nm. Para determinar o teor de MDA (malonaldeído), utilizou-se uma curva padrão ( $y = 0,0007x + 2 \times 10^{-6}$ ,  $R^2 = 0,9994$ ) construída a partir de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) em concentrações conhecidas ( $2,84 \times 10^{-8} - 1,40 \times 10^{-6}$  g TEP.mL<sup>-1</sup>). Os resultados foram expressos em mg de MDA.kg<sup>-1</sup> de amostra.

#### 6.2.6.4 Compostos carbonílicos totais

O conteúdo de carbonílicos totais (CCT) foi determinado conforme metodologia proposta por Ganhão; Morcuende; Estévez (2010), através da derivatização das amostras com solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Para a quantificação, 1 g das amostras foram homogeneizadas em uma solução de NaCl 0,6 M em tampão de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM (pH 6,5) (1:10 m/v) com ultra-turrax (IKA, T-25 Digital, IKA, Alemanha) em um banho de gelo (1 min). Em seguida, foram coletadas alíquotas de 150 µL para determinar as concentrações de proteínas e CCT. Para a precipitação das proteínas, 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% foi adicionado, seguido de centrifugação a frio (2400 g/4 °C). Para a determinação dos CCT, foi adicionado 1 mL de DNPH 0,2% (m/v) em HCl 2 M. Para as proteínas, foi adicionado 1 mL de HCl 2 M. As amostras foram então incubadas em ambiente escuro e temperatura ambiente por 1 h. Após a incubação, as proteínas foram precipitadas novamente com 1 mL de TCA 10% e centrifugadas (9000 g/10 min). Em seguida, as amostras foram submetidas a quatro lavagens com 1 mL de etanol/acetato de etila (1:1 v/v), com centrifugação entre cada lavagem (9000 g/5 min). As proteínas precipitadas foram redissolvidas em 1,5 mL de cloridrato de guanidina 6 M em tampão de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM (pH 6,5). A concentração de proteínas das amostras foi calculada com base na leitura das absorbâncias a 280 nm utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA). Os CCT foram expressos em nmoles de carbonílicos por miligrama de proteína,

utilizando um coeficiente de extinção molar de hidrazonas ( $21,0 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) com leitura das absorvâncias a 370 nm.

### 6.2.7 Análise estatística

Os dados coletados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade. Uma ANOVA de uma via foi realizada para avaliar o efeito da incorporação de diferentes níveis de PHE e PE na qualidade dos filmes de gelatina e, quando diferenças significativas foram observadas ( $p \leq 0,05$ ), o teste de Tukey foi realizado. Os efeitos do tempo de armazenamento (dias 0, 3, 6, 9 e 12), tratamento (PVC, GF<sub>BHT</sub>, GF<sub>6PHE</sub> e GF<sub>6PE</sub>) e sua interação foram analisados por ANOVA de duas vias. O tempo de armazenamento, tratamento e sua interação foram considerados como fatores fixos, enquanto a replicação dos experimentos foi atribuída como efeito aleatório. A análise estatística foi realizada usando o sistema SAS<sup>®</sup> (2012) e a significância foi determinada no nível de 5% pelo teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.3.1. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos PHE e PE

Os extratos PHE e PE apresentaram altos valores de CFT de  $337,05 \pm 1,68$  e  $324,82 \pm 5,26 \text{ mg EAG} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$  respectivamente. O extrato PHE obtido apresentou valores superiores ao relatado por Dorneles; Noreña (2020), que obtiveram valor de CFT de  $52,74 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  em extratos aquoso de brácteas de pinhão por extração assistida por micro-ondas. Enquanto que o PE apresentou elevado conteúdo de CFT na própolis verde, demonstrando valor superior ao relatado por Saito *et al.* (2021), que obtiveram valores de CFT em extratos de própolis verde obtidos por diferentes técnicas de extração entre 4,9 a  $127 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ .

Em relação à atividade antioxidante frente ao radical DPPH, os extratos PHE e PE apresentaram valores de  $1533,31 \pm 47,23$  e  $741,14 \pm 14,41 \text{ } \mu\text{mol ET} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MS}$ , respectivamente. O extrato PHE apresentou valor de DPPH<sup>\*</sup> superior ao observado por Dorneles; Noreña (2020), que obtiveram valores de  $466,31 \text{ } \mu\text{mol ET} \cdot \text{g}^{-1}$  para DPPH<sup>\*</sup> em extratos de brácteas de pinhão por extração assistida por micro-ondas.

Enquanto que o extrato PE obteve valor de DPPH\* inferior ao observado por Andrade *et al.* (2017), que obtiveram valor de 4554,35  $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g}^{-1}$  de própolis em amostras de própolis verde oriundas do Nordeste Brasileiro. Com base nesses resultados, pode-se indicar que os extratos de PHE e PE possuem potencial uso como fonte de antioxidantes naturais. Desse modo estes extratos podem ser considerados como fontes de antioxidantes para aplicação em embalagens de alimentos.

### 6.3.2 Caracterização dos filmes

#### 6.3.2.1 Espessura e propriedades mecânicas

De acordo com os valores de espessura (TABELA 20), apenas a incorporação dos extratos PE promoveu alterações significativas nos valores de espessura dos filmes ( $p < 0,05$ ), sendo as formulações com extrato PE apresentaram valores médios de espessura entre 0,123 e 0,140 mm. A incorporação dos extratos PHE e PE promoveram alterações distintas e significativas nos valores das propriedades mecânicas dos filmes ( $p < 0,05$ ) (TABELA 20). Com relação a RT, PHE gerou aumento de 3,88 para 5,69 MPa e PE influenciou na redução de 3,88 para 2,42 MPa em relação ao filme controle, os quais representam aumento de 46% e diminuição de 37%, respectivamente.

Os diferentes efeitos observados ao incorporar PHE e PE podem ser justificados principalmente devido a presença de importantes teores compostos antioxidantes, lignina e polissacarídeos (como por exemplo glicose e xilose) na casca do pinhão e na própolis (Queirós *et al.*, 2020). Estes compostos podem interagir por meio de ligações de hidrogênio entre seus sítios polares e, conseqüentemente, promovendo o aperfeiçoamento da estrutura filmogênica. Além disso, a lignina e polissacarídeos têm sido utilizados na produção de filmes por causa da sua habilidade de gerar estruturas estáveis (Ojagh *et al.*, 2011; Venkatachalam; Rakkapao; Lekjing, 2023; Wu *et al.*, 2023).

TABELA 20 – RESULTADOS DE ESPESSURA, PROPRIEDADES MECÂNICAS (ELONGAÇÃO (ELO) E RESISTÊNCIA À TRAÇÃO (RT)), PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA (PVA) E SOLUBILIDADE DOS FILMES ATIVOS À BASE DE GELATINA COM ADIÇÃO DE EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO (PHE) E PRÓPOLIS (PE) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

| Filmes             | Espessura (mm)            | RT (MPa)    | ELO (%)     | PVA ( $10^{-9}\text{g.m}^{-1}.\text{Pa}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) | Solubilidade (%) |
|--------------------|---------------------------|-------------|-------------|--|------------------|
| <b>PHE</b>         |                           |             |             |  |                  |
| GF                 | 0,140 <sup>a</sup> ±0,014 | 3,88c±0,41  | 86,37a±7,74 | 2,44b±0,33   | 32,36a±1,68      |
| GF <sub>2PHE</sub> | 0,135 <sup>a</sup> ±0,008 | 5,69a±0,36  | 84,6a±3,75  | 5,10a±0,07   | 25,27b±1,77      |
| GF <sub>4PHE</sub> | 0,137 <sup>a</sup> ±0,011 | 4,82b±0,36  | 84,18a±2,41 | 5,54a±0,24   | 24,41b±1,09      |
| GF <sub>6PHE</sub> | 0,134 <sup>a</sup> ±0,07  | 4,50bc±0,34 | 84,90a±5,36 | 5,57a±0,16   | 25,20b±1,95      |
| <b>PE</b>          |                           |             |             |  |                  |
| GF                 | 0,140a±0,014              | 3,88a±0,41  | 86,37a±7,74 | 2,44b±0,33   | 32,36a±1,68      |
| GF <sub>2PE</sub>  | 0,122b±0,013              | 2,42b±0,24  | 90,49a±8,97 | 4,14a±0,80   | 23,23b±1,66      |
| GF <sub>4PE</sub>  | 0,124b±0,014              | 2,73b±0,13  | 91,69a±5,02 | 4,41a±0,60   | 24,98b±2,09      |
| GF <sub>6PE</sub>  | 0,123b±0,009              | 2,60b±0,21  | 91,36a±4,40 | 3,29ab±0,78  | 25,42b±3,33      |

Média ± desvio padrão.

GF - Filme comestível gelatina; GF<sub>2PHE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 2% PHE; GF<sub>4PHE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 4% PHE; GF<sub>6PHE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 6% PHE; GF<sub>2PE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 2% PE; GF<sub>4PE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 4% PE; GF<sub>6PE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 6% PE.

PHE - Extrato de casca de pinhão; PE - Extrato de própolis.

As diferentes letras sobrescritas na coluna para cada tipo de filme indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

FONTE: Autor (2024).

Com relação aos resultados obtidos para a elongação na ruptura (ELO) dos filmes ativos de gelatina com adição de extratos de pinhão e própolis em diferentes concentrações (TABELA 20), observou-se que o extrato de própolis teve um impacto negativo nos resultados, sem diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Esse comportamento semelhante foi também observado em um estudo realizado por Santos *et al.* (2022), no qual relataram a redução nos valores de elongação em filmes de gelatina com diferentes níveis de extrato de acerola. Em relação à incorporação de extrato de pinhão, houve um aumento da ELO de 86,37% para 91,69% em comparação com o filme controle, porém não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

Apesar dos resultados não serem significativos, o pequeno aumento da ELO pode ser atribuído à interação entre os componentes da própolis (por exemplo, ácidos fenólicos e seus ésteres) e alguns grupos funcionais de resíduos de aminoácidos, que reforçam as interações cadeia-cadeia do biopolímero. Normalmente, quando se incorpora extrato ou qualquer outro aditivo em matrizes filmogênicas, espera-se uma alteração significativa nas propriedades dos filmes. No entanto, os resultados de ELO para o extrato de pinhão obtidos neste estudo diferem de algumas pesquisas encontradas na literatura. Estudos mostraram que houve influência significativa nos resultados de ELO ao adicionar extrato de própolis em concentrações de 1 a 3% (v/m) em filmes à base de proteína de soja/goma de semente de manjeriço (Shahabi;

Soleimani; Ghorbani, 2023), 10% (m/m) em filmes de amido de milho (Ardjoum *et al.*, 2023) e 0,8% (v/v) em filmes à base de gelatina (Reyes; Landgraf; Sobral, 2021). Apesar desse comportamento, os resultados de ELO para os filmes incorporados de PE são excelentes ao comparar diversos trabalhos na literatura utilizando gelatina para produção de filmes comestíveis (Al-Hassan; Norziah, 2012; Fatima *et al.*, 2022; Jridi *et al.*, 2020; Reyes; Landgraf; Sobral, 2021).

Os valores de RT e ELO dos filmes desenvolvidos neste estudo demonstraram valores similares com filmes sintéticos. Os filmes ativos com PHE apresentaram valores superiores de RT, enquanto que os filmes com PE mostraram valores inferiores, além disso, os valores de ELO para os filmes foram próximos dos obtidos Luchese; Spada; Tessaro (2017), que relataram resultados de RT de 3,9 MPa e ELO de 99 % para filmes de polietileno de baixa densidade (LDPE).

#### 6.3.2.2 Solubilidade e permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Os resultados da solubilidade dos filmes ativos de gelatina com adição do extrato PHE apresentaram valores entre 25,27% (GF<sub>2PHE</sub>) e 24,41% (GF<sub>4PHE</sub>), e enquanto para os filmes com extrato PE obtiveram valores entre 23,23% (GF<sub>2PE</sub>) e 25,42% (GF<sub>6PE</sub>), enquanto o filme de gelatina base (GF) apresentou solubilidade de 32,26%. Os resultados mostraram que a solubilidade dos filmes foi influenciada pela adição dos extratos PHE e PE ( $p < 0,05$ ) (TABELA 20).

À medida que a concentração de extratos PHE e PE na matriz do filme aumentou, a solubilidade em água dos filmes diminuiu. Essa redução na solubilidade dos filmes pode estar relacionada à maior formação de ligações cruzadas e à formação de fortes pontes de hidrogênio entre os compostos fenólicos dos extratos na matriz polimérica, uma vez que a solubilidade em água é influenciada pelo número de grupos hidroxila livres disponíveis na matriz polimérica (Kanatt, 2020; Riaz *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2022). Essas ligações cruzadas e pontes de hidrogênio foram incapazes de serem quebradas pelas moléculas de água, levando à diminuição da solubilidade. Comportamento similar foram relatados na literatura em filmes à base de quitosana/gelatina contendo nanopartículas de casca de maçã e filmes de gelatina com adição de extrato hidroalcolico de acerola (Riaz *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2022)

A PVA desempenha uma função crucial sobre as propriedades de barreiras dos filmes comestíveis pois, a partir da sua análise criteriosa, podemos inferir sobre a

vida útil dos produtos. A permeabilidade ao vapor de água dos filmes ativos gelatina observou-se que tanto a incorporação de PHE quanto PE geraram mudanças significativas ( $p < 0,05$ ), onde houve a elevação da PVA de 2,44 para até 5,57 e 4,41  $10^{-9}g.m^{-1}.Pa^{-1}s^{-1}$ , respectivamente (TABELA 20).

Este efeito pode ser explicado devido os extratos PHE e PE interromperem a estrutura ordenada do filme de gelatina, criando espaços vazios e canais para a passagem da água e levando a uma maior permeabilidade ao vapor de água (Mir *et al.*, 2018). A incorporação de extrato além de aumentar os espaços vazios nos filmes, a natureza hidrofílica também impacta no aumento da permeabilidade, uma vez que a adição dos extratos aumenta a permeabilidade e a hidrofílicidade da superfície dos filmes (Kanmani; Rhim, 2014).

### 6.3.2.3 Propriedades ópticas

Com relação a mudança de coloração ao incorporar PHE e PH nos filmes de gelatina, é possível observar efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) para os parâmetros estudados, principalmente para os filmes com a adição de 6% de extratos da casca de pinhão e própolis (TABELA 21).

TABELA 21 – RESULTADOS DOS PARÂMETROS DE COR E OPACIDADE DOS FILMES ATIVOS À BASE DE GELATINA COM ADIÇÃO DE EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO (PHE) E PRÓPOLIS (PE) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

| Filmes                   | L*                       | a*                       | b*                        | Opacidade (AU.mm <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| <b>PHE</b>               |                          |                          |                           |                                  |
| <b>GF</b>                | 64,87 <sup>a</sup> ±1,73 | 10,92 <sup>c</sup> ±0,89 | 30,99 <sup>b</sup> ±1,31  | 2,20 <sup>a</sup> ±0,21          |
| <b>GF<sub>2PHE</sub></b> | 63,09 <sup>a</sup> ±1,92 | 11,92 <sup>c</sup> ±0,91 | 33,14 <sup>b</sup> ±2,74  | 1,77 <sup>a</sup> ±0,21          |
| <b>GF<sub>4PHE</sub></b> | 58,01 <sup>b</sup> ±0,94 | 14,38 <sup>b</sup> ±0,45 | 36,95 <sup>a</sup> ±0,80  | 1,78 <sup>a</sup> ±0,23          |
| <b>GF<sub>6PHE</sub></b> | 54,20 <sup>c</sup> ±0,74 | 16,78 <sup>a</sup> ±1,27 | 39,89 <sup>a</sup> ±2,24  | 1,87 <sup>a</sup> ±0,09          |
| <b>PE</b>                |                          |                          |                           |                                  |
| <b>GF</b>                | 64,87 <sup>a</sup> ±1,73 | 10,92 <sup>b</sup> ±0,89 | 30,99 <sup>c</sup> ±1,31  | 2,20 <sup>a</sup> ±0,21          |
| <b>GF<sub>2PE</sub></b>  | 65,00 <sup>a</sup> ±1,08 | 10,69 <sup>b</sup> ±0,64 | 35,14 <sup>b</sup> ±1,09  | 2,06 <sup>a</sup> ±0,07          |
| <b>GF<sub>4PE</sub></b>  | 63,32 <sup>a</sup> ±1,45 | 11,59 <sup>b</sup> ±0,89 | 38,08 <sup>ab</sup> ±1,79 | 2,42 <sup>a</sup> ±0,14          |
| <b>GF<sub>6PE</sub></b>  | 60,39 <sup>b</sup> ±1,16 | 13,02 <sup>a</sup> ±0,61 | 40,63 <sup>a</sup> ±2,63  | 2,17 <sup>a</sup> ±0,13          |

GF - Filme comestível gelatina; GF<sub>2PHE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 2% PHE; GF<sub>4PHE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 4% PHE; GF<sub>6PHE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 6% PHE; GF<sub>2PE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 2% PE; GF<sub>4PE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 4% PE; GF<sub>6PE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 6% PE.

PHE - Extrato de casca de pinhão; PE - Extrato de própolis.

Média ± desvio padrão.

As diferentes letras sobrescritas na coluna para cada tipo de filme indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

FONTE: Autor (2024).

Com relação ao parâmetro  $L^*$ , há uma relação inversamente proporcional com a concentração de extratos, o que indica uma diminuição da luminosidade dos filmes controle. Este efeito é gerado pela presença de pigmentos (compostos fenólicos) nos extratos adicionados. Segundo Mir *et al.* (2018), os compostos fenólicos levam a vários tipos de interação com os biopolímeros e exibem uma variação na sua propriedade de cor. Neste sentido, Talón *et al.* (2017) identificaram filmes mais escuros ao incorporar extrato de tomilho em matrizes poliméricas à base de quitosana e amido e, conforme estes autores, os polifenóis são os principais componentes responsáveis por este efeito.

Já para os valores encontrados para o parâmetro  $a^*$  variaram de 10,92 (GF) a 16,78 (6% de PHE) e 13,02 (6% de PE), o que indicam uma coloração tendendo ao vermelho correlacionada aos pigmentos majoritários presentes na casca de pinhão e na própolis. Para o parâmetro  $b^*$ , houve uma variação de 30,99 (controle) a 39,89 (6% de PHE) e 40,63 (6% de PE), o que indica uma coloração tendendo ao amarelo. No geral, a incorporação de extratos para ambos os parâmetros levou um aumento à medida que a concentração de extrato foi aumentada. Esses resultados corroboram com os obtidos por Santos *et al.* (2022), que estudaram filmes de gelatina contendo extrato hidroetanólico do resíduo agroindustrial de acerola como aditivo. Os autores observaram aumento dos parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  nos filmes com adição dos extratos em relação ao filme de gelatina sem extrato.

Quanto a opacidade dos filmes, foi observada uma redução nos valores de opacidade dos filmes com PHE, e oscilação nos valores dos filmes com PE. No entanto, a adição dos extratos não apresentou efeito ( $p > 0,05$ ) na opacidade dos filmes de gelatina quando comparado ao tratamento GF.

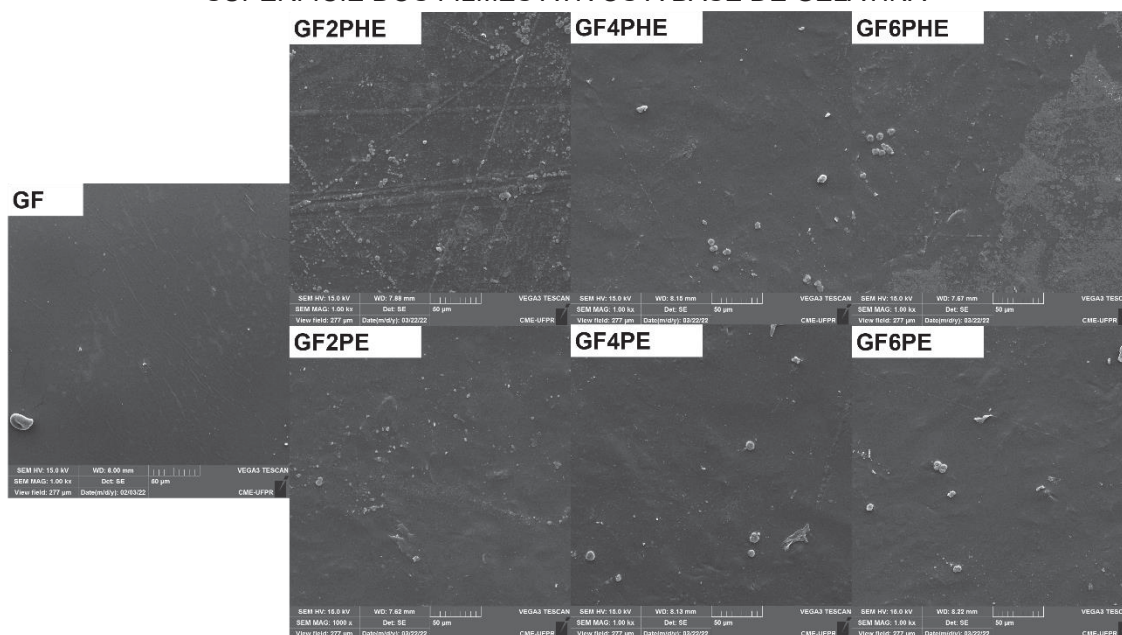
#### 6.3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura de todos os filmes foi avaliada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). De acordo com as micrografias (FIGURA 28), todos os filmes mostraram boa homogeneidade. Esta pode ser devido ao emaranhamento e interações intermoleculares entre a gelatina e os extratos, resultando em uma boa interação intermolecular na matriz dos filmes (Rasid *et al.*, 2018).

A incorporação dos extratos PHE e PE provocaram modificações na estrutura dos filmes de gelatina, como pode ser observado na FIGURA 28. Não foram

observados microporos ou fraturas nos filmes, no entanto as formulações com a adição dos extratos aos filmes foram observadas a presença de ranhuras (GF<sub>2PHE</sub>), bem como aumento na rugosidade da superfície dos filmes, quando comparadas ao filme base (GF).

FIGURA 28 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) (1000X) DA SUPERFÍCIE DOS FILMES ATIVOS À BASE DE GELATINA



GF - Filme comestível gelatina; GF<sub>2PHE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 2% PHE; GF<sub>4PHE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 4% PHE; GF<sub>6PHE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 6% PHE; GF<sub>2PE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 2% PE; GF<sub>4PE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 4% PE; GF<sub>6PE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 6% PE.

FONTES: Autor (2024).

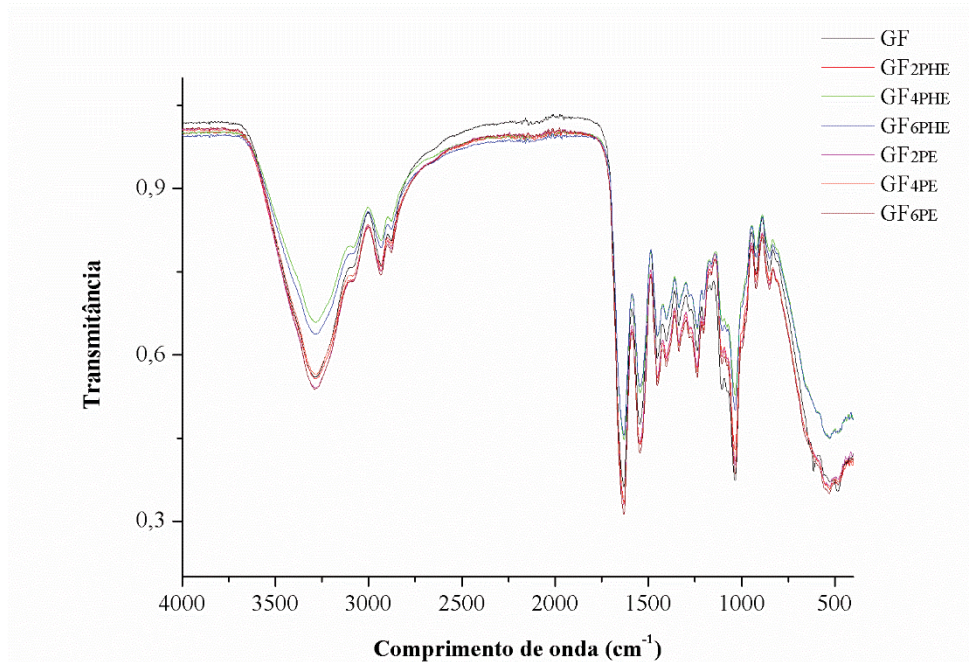
Esse aumento da rugosidade dos filmes com PHE e PE pode ser causado pela interação dos extratos com a solução filmogênica de gelatina (Barbosa *et al.*, 2022), possivelmente devido à formação de novas ligações de hidrogênio entre moléculas de fenólicos e cadeias de polímeros de gelatina (Yan *et al.*, 2022). As diferenças estruturais observadas nos filmes com adição dos extratos podem impactar significativamente as características do filme, como suas propriedades relacionadas à água, como o PVA e solubilidade (Bertolo *et al.*, 2022). Estruturas semelhantes foram encontradas por outros autores (Alexandre *et al.*, 2016; Bertolo *et al.*, 2022; Reyes; Landgraf; Sobral, 2021; Riahi *et al.*, 2021).

### 6.3.2.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de *Fourier* (FTIR)

Os espectros para os filmes de gelatina desenvolvidos com adição dos extratos PHE e PE são apresentados na FIGURA 29. Para os filmes à base de gelatina, foi identificado um pico na faixa de  $3291\text{ cm}^{-1}$ , onde estão correlacionados com o grupo -OH característico das ligações de hidrogênio (Daudt *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2022).

A adição dos extratos de pinhão e de própolis causou aumento e diminuição na intensidade de pico do filme à base de gelatina, respectivamente. A presença de compostos polares e complexos no extrato de própolis, incluindo flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, cumarinas, esteroides, aminoácidos e elementos minerais, podem ser os principais responsáveis por alterar as interações com gelatina e glicerol (principalmente por ligação de hidrogênio) (Xu *et al.*, 2019). Enquanto o alongamento C-O-C ocorre em  $1620\text{ cm}^{-1}$  e a flexão C-H é exibida em  $1460\text{ cm}^{-1}$  (Pinto *et al.*, 2015).

FIGURA 29 – ESPECTROS DE ATR-FTIR DOS FILMES ATIVOS À BASE DE GELATINA COM ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATOS DE PHE E PE



GF - Filme comestível gelatina; GF<sub>2PHE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 2% PHE; GF<sub>4PHE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 4% PHE; GF<sub>6PHE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 6% PHE; GF<sub>2PE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 2% PE; GF<sub>4PE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 4% PE; GF<sub>6PE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 6% PE.

FONTE: Autor (2024).

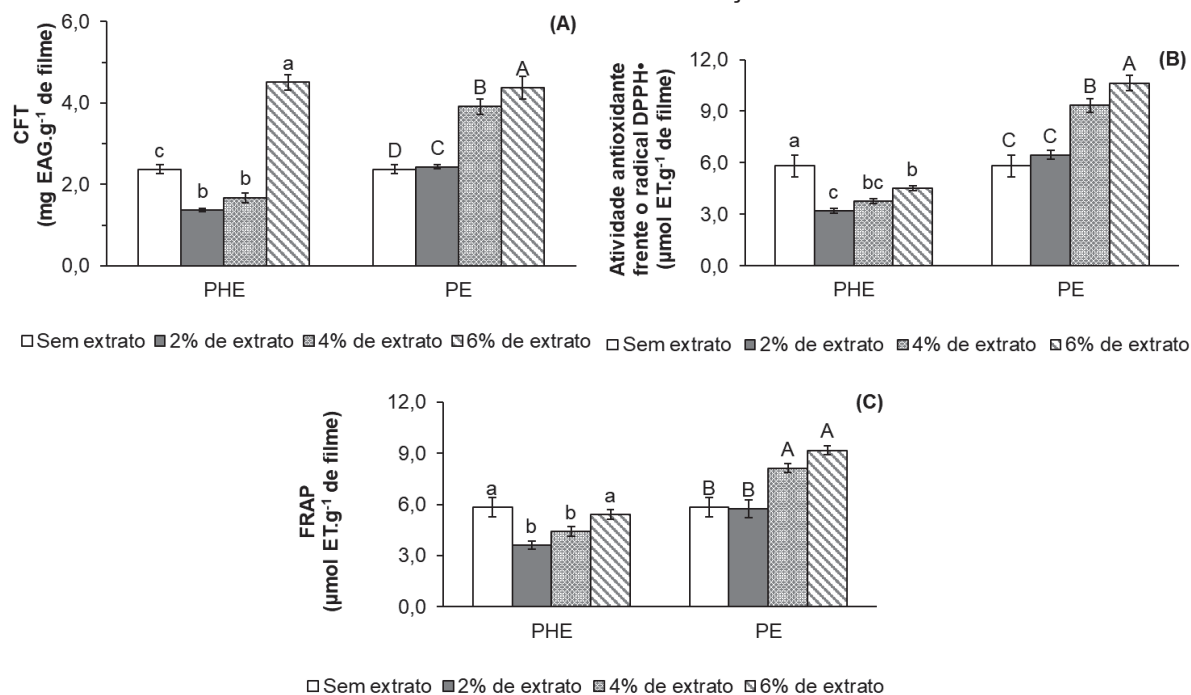
Os picos em  $1634\text{ cm}^{-1}$  (indicam a vibração amida-I do grupo C=O associado a COO na estrutura),  $1540\text{ cm}^{-1}$  (a vibração amida-II devido à flexão N–H e C–estiramento N),  $1403\text{ cm}^{-1}$  (vibrações de flexão de estiramento O–H),  $1230\text{ cm}^{-1}$  (vibração de amida-III que representa vibrações no plano dos grupos C–N e N–H da amida ligada),  $1110$  e  $1056\text{ cm}^{-1}$  são C- Vibrações de alongamento OH e C–O, respectivamente (Dai *et al.*, 2023; Khoshkalampour; Ghorbani; Ghasempour, 2023; Riahi *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2023). Para o pico em  $1056\text{ cm}^{-1}$  também se destaca, onde o filme GF apresentou maior intensidade. Isso significa a interação entre o plastificante (grupos OH do glicerol) e a estrutura da gelatina (Nurul Syahida *et al.*, 2020). Resultados semelhantes foram relatados para filmes de gelatina contendo aditivos (Haghighi *et al.*, 2021; Shankar; Wang; Rhim, 2019; Tavassoli *et al.*, 2021).

#### 6.3.2.6 Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos filmes ativos

A adição do extrato PHE teve um efeito significativo ( $p < 0,05$ ) no conteúdo de fenólicos totais (CFT) e na atividade antioxidante dos filmes de gelatina. Observou-se uma redução nos valores desses ensaios quando comparados ao filme base (GF). Os testes de compostos fenólicos e capacidade antioxidante realizados utilizando DPPH<sup>•</sup> e FRAP também mostraram a mesma tendência para as amostras dos filmes com extrato PHE (FIGURA 30).

O conteúdo de compostos fenólicos totais nos filmes PHE apresentou diferença significativa, com valores de CFT entre  $1,38$  e  $1,92\text{ mg EAG.g}^{-1}$  de filme, inferiores em  $19,91\%$  a  $41,71\%$  em comparação com o filme controle (GF), que apresentou um valor de CFT de  $2,37\text{ mg EAG.g}^{-1}$  de filme (FIGURA 30A). Além disso, os filmes com PHE mostraram valores de atividade antioxidante em relação ao sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> entre  $3,19$  e  $4,51\text{ }\mu\text{mol ET.g}^{-1}$  de filme, inferiores em  $22,41\%$  a  $45,16\%$  em comparação com o filme controle (GF), que apresentou um valor de DPPH<sup>•</sup> de  $5,81\text{ }\mu\text{mol ET.g}^{-1}$  de filme. Quanto ao FRAP, foram obtidos valores entre  $3,62$  e  $5,42\text{ }\mu\text{mol ET.g}^{-1}$  de filme, inferiores entre  $7,31\%$  e  $38,15\%$  em comparação com o filme GF ( $5,85\text{ }\mu\text{mol ET.g}^{-1}$  de filme) (FIGURAS 30B e 30C).

FIGURA 30 – TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT) (A), ATIVIDADE DE SEQUESTRO DO RADICAL DPPH• (B) E FRAP (C) OBTIDOS PARA OS FILMES ATIVOS À BASE DE GELATINA COM ADIÇÃO DE EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO (PHE) E PRÓPOLIS (PE) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES



Valores médios ± desvio padrão.

PHE - Extrato de casca de pinhão; PE - Extrato de própolis.

As diferentes letras minúsculas (comparação entre filmes incorporados com diferentes concentrações de PHE) indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey;

Diferentes letras maiúsculas (comparação entre filmes incorporados com diferentes concentrações de PE) indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

FONTE: Autor (2024).

Essa redução no conteúdo de fenólicos e na atividade antioxidante dos filmes com adição de PHE pode indicar que alguns compostos presentes no extrato podem estar envolvidos em interações com a matriz de gelatina, conforme relatado por Staroszczyk *et al.* (2020). No caso do extrato PHE uma classe importante dos fenólicos, como os taninos condensados, que, segundo Dorneles; Noreña (2020), estão presentes na casca de pinhão em alto teor e podem ter complexado com as proteínas de gelatina. Devido a essa possível reação entre os compostos presentes no PHE e a matriz, a adição do PHE não conferiu a atividade antioxidante esperada aos filmes de gelatina.

Quanto aos filmes incorporados com PE, foi observado o efeito contrário ao observado para os filmes PHE, sendo observada um incremento significativo ( $p < 0,05$ ) no conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos filmes. Para os testes de compostos fenólicos e capacidade antioxidante realizados utilizando

DPPH<sup>\*</sup> e FRAP mostraram a mesma tendência para as amostras: 6% de extrato > 4% de extrato > 2% de extrato = Controle (sem extrato) (FIGURA 30B e 30C).

Foram observados valores de CFT variando de 2,43 a 4,38 mg EAG.g<sup>-1</sup> de filme, resultado superior em até 84,98% (GF<sub>6PE</sub>) em comparação ao filme controle. Da mesma forma os filmes com PE apresentaram maior potencial antioxidante, resultando em um incremento de até 83,09% e 57,03% (filme GF<sub>6PE</sub>), na capacidade antioxidante em relação ao sequestro do radical DPPH<sup>\*</sup> e FRAP, respectivamente. A maior atividade antioxidante dos filmes com PE pode ser devido à presença e diversidade de compostos fenólicos no extrato de própolis (Capítulo 3). Essa atividade antioxidante pode ser decorrente do fato de que o anel fenólico que pode deslocar elétrons desemparelhados e doar hidrogênio dos grupos das hidroxilas fenólicas, eliminando assim os radicais livres formando grupos fenóxi (Adilah; Jamilah; Nur Hanani, 2018; Yan *et al.*, 2022). Na literatura são relatados comportamentos similares, de incremento no conteúdo e compostos fenólicos e atividade antioxidante, como o estudo realizado por Adilah; Jamilah; Nur Hanani (2018) em filmes à base de proteína isolada de soja e gelatina de peixe com diferentes concentrações de extrato de caroço de manga, e em estudo realizado por Chaari *et al.* (2022) em filmes à base de gelatina-alginato de sódio contendo extrato de casca de beterraba.

#### 6.3.2.7 Testes de migração

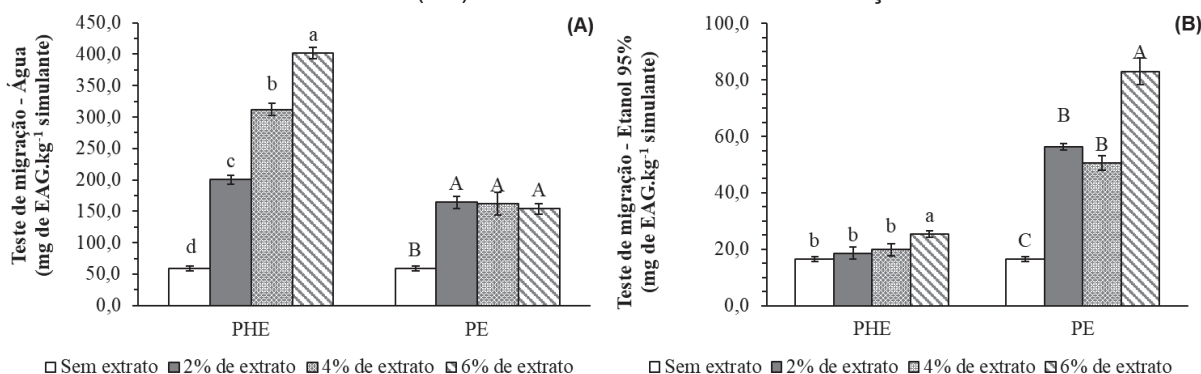
Uma propriedade de suma importância em materiais utilizados como embalagens ativas é a capacidade de liberar os compostos ativos nos alimentos (Adilah; Jamilah; Nur Hanani, 2018; Salević-Jelić *et al.*, 2023). Dessa forma, foi realizado um teste para avaliar o potencial de migração dos compostos fenólicos nos filmes de gelatina com PHE e PE. Os testes foram conduzidos utilizando meios simulados, incluindo água destilada e solução aquosa de etanol 95% (v/v) durante 7 dias, respectivamente.

Os filmes apresentaram maior liberação de compostos ativos em água quando comparados ao etanol. A migração dos compostos em água nos filmes adicionados de PHE apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ), enquanto os filmes com PE não apresentaram diferença significativa entre as diferentes concentrações estudadas ( $p > 0,05$ ), diferindo apenas do filme controle ( $p < 0,05$ ). Os filmes GF<sub>6PHE</sub> e GF<sub>2%PE</sub> foram

aqueles que apresentaram maiores valores de migração em água, com 402,23 e 164,35 mg de EAG.kg<sup>-1</sup> de simulante de alimento, respectivamente (FIGURA 31A).

Quanto à migração em etanol 95%, foi detectada uma menor quantidade de compostos fenólicos no simulante de alimentos gordurosos, o que permite afirmar que os compostos presentes no PHE e PE apresentaram maior afinidade com a matriz do que com o meio simulante utilizado, resultando em menor solubilidade e difusão dos fenólicos (FIGURA 31B). No entanto, os filmes incorporados com PE apresentaram maiores taxas de migração em etanol do que os filmes com PHE. De modo geral, os filmes com 6% de PHE e 6% de PE foram aqueles que apresentaram as maiores taxas de migração em etanol 95%, com valores de 25,28 e 83,07 mg de EAG.kg<sup>-1</sup> de simulante de alimento, respectivamente.

FIGURA 31 – TESTE DE MIGRAÇÃO EM ÁGUA (A) E ÁLCOOL (B) OBTIDOS PARA OS FILMES ATIVOS À BASE DE GELATINA COM ADIÇÃO DE EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO (PHE) E PRÓPOLIS (PE) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES



Valores médios ± desvio padrão.

PHE - Extrato de casca de pinhão; PE - Extrato de própolis.

As diferentes letras minúsculas (comparação entre filmes incorporados com diferentes concentrações de PHE) indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey;

Diferentes letras maiúsculas (comparação entre filmes incorporados com diferentes concentrações de PE) indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

FONTE: Autor (2024).

A maior taxa de migração de compostos fenólicos em meio aquoso em comparação com o meio gorduroso (etanol), é corroborado em estudos realizados por Adilah; Jamilah; Nur Hanani (2018), em filmes à base de proteína isolada de soja e gelatina de peixe com diferentes concentrações de extrato de caroço de manga; por Maryam Adilah *et al.* (2022), em filmes de nanocompósitos de gelatina/óxido de grafeno/óleo de casca de canela usando ácido ferúlico, e por Salević-Jelić *et al.* (2023), em filmes à base de gelatina e zeína incorporando extrato de sálvia.

A maior taxa de liberação de polifenóis em água pode ser explicada pela diferença na afinidade e suscetibilidade dos filmes em relação a meios com diferentes polaridades. Essa diferença é influenciada tanto pela polaridade do composto migrante quanto do meio, afetando a migração do composto ativo para o meio e resultando em distintas taxas de relaxamento das matrizes. Essa dinâmica leva a uma rápida difusão e penetração da água na estrutura do filme (devido à hidrofilicidade da gelatina) e à hidrólise do filme (Adilah; Jamilah; Nur Hanani, 2018; Maryam Adilah *et al.*, 2022; Salević-Jelić *et al.*, 2023), acelerando a liberação de compostos ativos no meio aquoso.

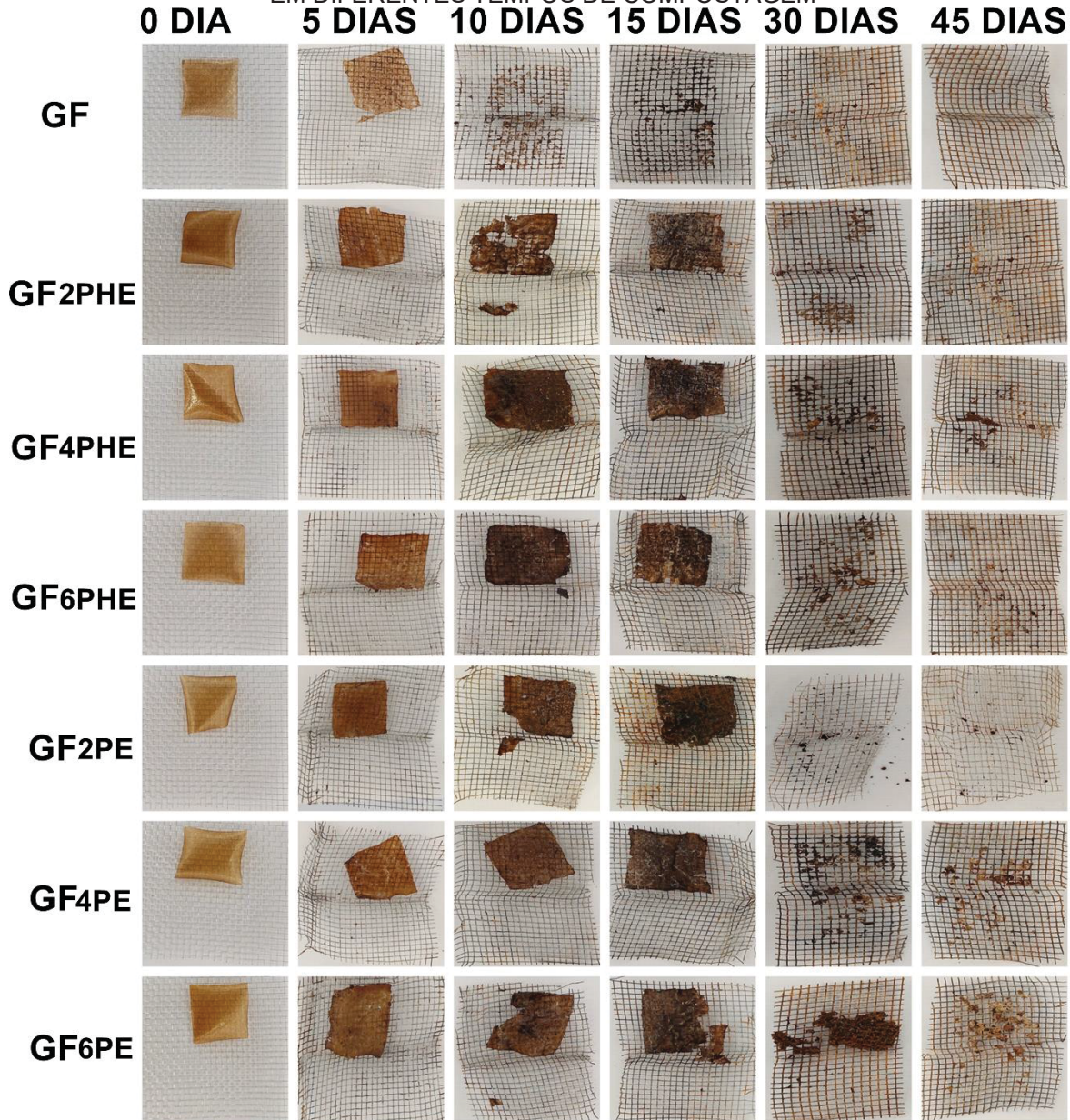
De modo geral, considerando os valores de CFT e atividade antioxidante, além dos resultados obtidos no teste de migração de compostos dos filmes de gelatina incorporados com PHE e PE, as formulações GF<sub>6PHE</sub> e GF<sub>6PE</sub> demonstraram potencial para aplicação em alimentos. Portanto, essas formulações foram selecionadas para avaliar a eficácia dos filmes na inibição da oxidação lipídica e proteica de hambúrgueres bovinos frescos armazenados em refrigeração.

#### 6.3.2.8 Degradabilidade em solo

Todos os filmes apresentaram boa degradabilidade no solo, sendo observada a evolução da biodesintegração dos filmes ativos de gelatina ao longo do tempo (FIGURA 32). Pôde-se observar que, a partir do 10º dia de estocagem no solo, o filme controle (GF) apresentou degradação quase total. É importante ressaltar que a incorporação dos extratos PHE e PE nos filmes de gelatina não reduziu a taxa de desintegração, uma vez que todas as formulações com extratos, exceto a GF<sub>6PE</sub> demonstraram elevada degradação dos filmes no 30º dia.

Avaliando a FIGURA 32, é possível afirmar que todos os filmes desenvolvidos neste estudo foram 100% biodegradáveis. Isso se deve ao fato de que um material é considerado biodegradável quando sofre uma degradação biológica de pelo menos 90% em um período inferior a 180 dias (Alves-Silva; Romani; Martins, 2022). Estudos anteriores demonstraram que a incorporação de extratos de sálvia em filmes de gelatina e zeína, bem como a adição de manga e abacaxi em filmes comestíveis à base de amido de milho e gelatina resultaram em degradação em 25 e 15 dias, respectivamente (Salević-Jelić *et al.*, 2023; Susmitha *et al.*, 2021).

FIGURA 32 – APARÊNCIA VISUAL DOS FILMES ATIVOS À BASE DE GELATINA RECUPERADOS EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM



GF - Filme comestível gelatina; GF<sub>2PHE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 2% PHE; GF<sub>4PHE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 4% PHE; GF<sub>6PHE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 6% PHE; GF<sub>2PE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 2% PE; GF<sub>4PE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 4% PE; GF<sub>6PE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 6% PE.

FONTE: Autor (2024).

Do ponto de vista ambiental, a biodegradabilidade é uma propriedade relevante no desenvolvimento de materiais de embalagens de base biológica em comparação com plásticos de origem fóssil. Os processos biológicos de degradação mais importantes para os biopolímeros são as reações de hidrólise, que são catalisadas por enzimas extracelulares produzidas por microrganismos (incluindo bactérias, fungos e protozoários, entre outros) que podem reproduzir condições

naturais e atuar sinergicamente durante a degradação (Florentino *et al.*, 2022; Sutay Kocabaş *et al.*, 2021).

Esses resultados confirmam que esses filmes são biodegradáveis em condições ambientais, sem a necessidade de produtos químicos ou outros métodos de degradação. Portanto, o curto tempo de desintegração no solo ressalta o potencial dos filmes de gelatina desenvolvidos, tornando-os altamente promissores como materiais biodegradáveis ecologicamente corretos, representando uma alternativa para substituir os polímeros sintéticos.

### 6.3.3 Aplicação dos filmes ativos para manutenção da qualidade de hambúrguer bovino

#### 6.3.3.1 Estabilidade da cor objetiva

Em relação à visão geral dos hambúrgueres bovinos revestidos e sua aparência durante o armazenamento, notou-se que o armazenamento afetou progressivamente a sua aparência (FIGURA 33). Essas alterações na aparência dos hambúrgueres bovinos revestidos foram avaliadas com base nos resultados de cor objetiva (FIGURA 34). De acordo com os resultados, foi observado que houve efeito significativo do tratamento (filmes), tempo de armazenamento e da interação entre os fatores ( $p < 0,05$ ) para os parâmetros de cor.

Para o parâmetro de luminosidade ( $L^*$ ), foi observada diferença significativa apenas entre os tratamentos (filmes). As amostras com PVC apresentaram aumento nos valores de  $L^*$ , possuindo os maiores valores em relação aos demais tratamentos (FIGURA 34A). Comportamento similar para  $L^*$  foi relatado por Venkatachalam; Lekjing (2020) em hambúrgueres de carne suína revestidos com filme à base de quitosana com óleo essencial de cravo e nisina. Estes autores atribuem esse aumento nos valores de  $L^*$  pode ser atribuída provavelmente devido à oxidação lipídica e deterioração microbiana.

FIGURA 33 – IMPACTO DE DIFERENTES TRATAMENTOS NA APARÊNCIA DE HAMBÚRGUERES BOVINOS AO LONGO DE 12 DIAS DE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO

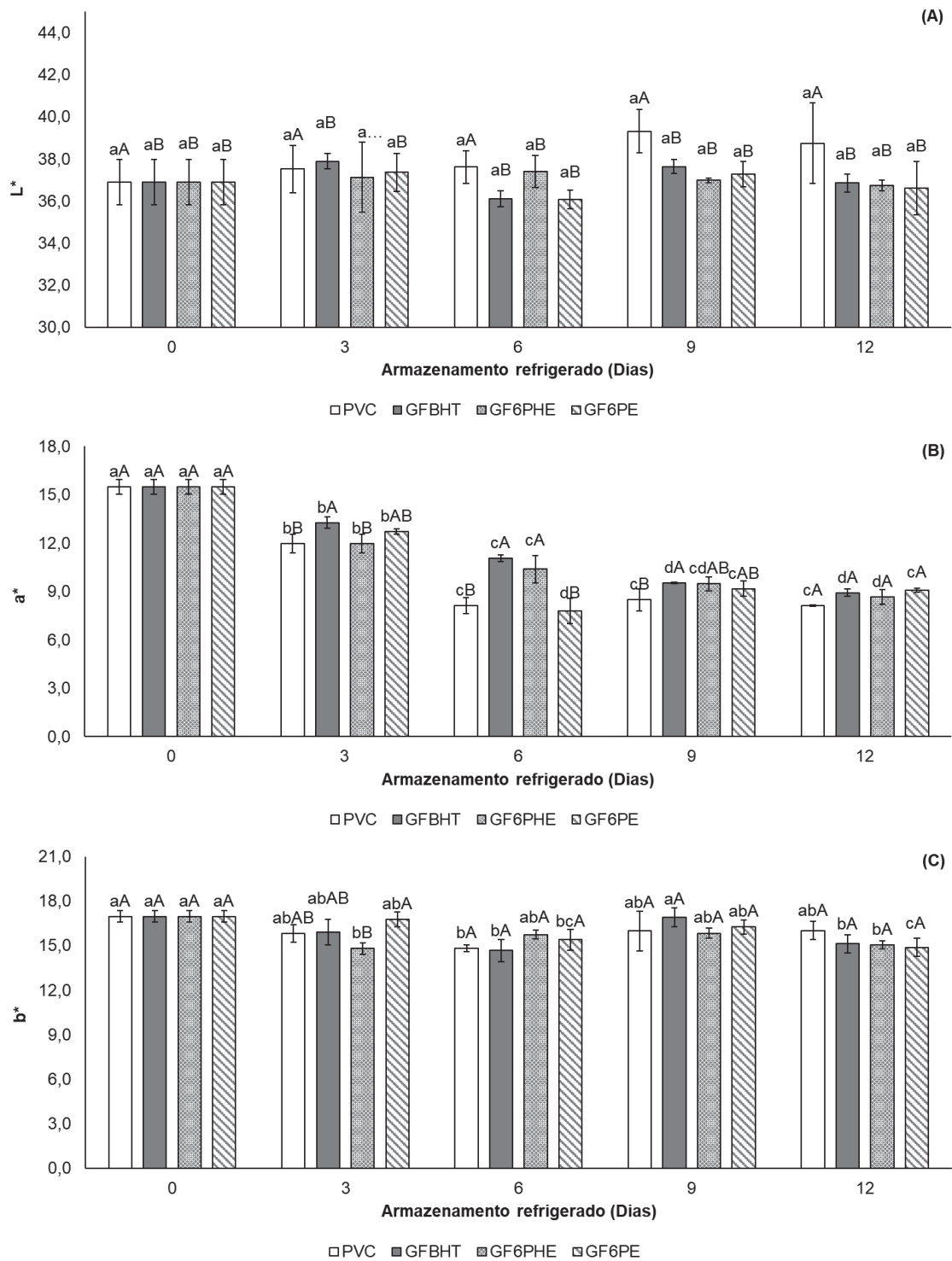


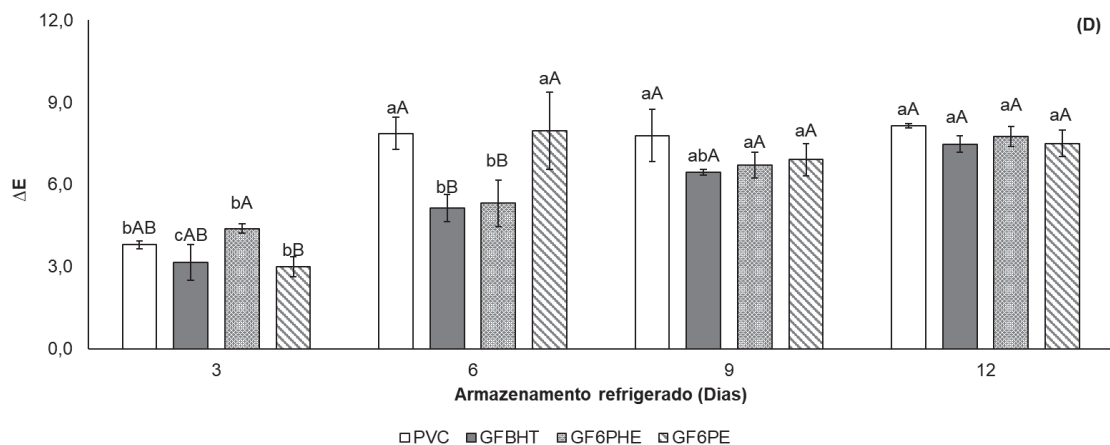
PVC - filme plástico PVC; GF<sub>BHT</sub> - filme comestível de gelatina com BHT (200 ppm); GF<sub>6PHE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 6% PHE; GF<sub>6PE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 6% PE.

FONTE: Autor (2024).

Com relação ao tom vermelho ( $a^*$ ), os valores de  $a^*$  em todas as amostras de hambúrguer bovino diminuíram durante o armazenamento, e no 12º dia, a amostra revestida com PVC apresentou o menor valor de  $a^*$  (8,12) (FIGURA 34B). Todas as amostras revestidas com filmes GF apresentaram valores de  $a^*$  mais altos ( $p < 0,05$ ) do que as amostras de filmes de controle. De fato, o uso dos filmes com adição de PHE e PE, bem como o filme base com adição de BHT, resultaram em menores valores de  $L^*$  da carne durante todo o armazenamento, enquanto foram capazes de preservar a cor vermelha das amostras durante o armazenamento até o 9º dia.

FIGURA 26 – EFEITO DO FILME À BASE DE GELATINA COM EXTRATOS DA CASCA DE PINHÃO (PHE) E PRÓPOLIS (PE) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NA ESTABILIDADE DA COR DE HAMBÚRGUER BOVINO DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO (12 DIAS A 4 ± 1 °C)





Valores médios  $\pm$  desvio padrão.

Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre períodos de armazenamento, diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamentos pelo teste de Tukey.

PVC - filme plástico PVC; GF<sub>BHT</sub> - filme comestível de gelatina com BHT (200 ppm); GF<sub>6PHE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 6% PHE; GF<sub>6PE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 6% PE.

FONTE: Autor (2024).

A maior manutenção da cor vermelha das amostras pode estar associada ao efeito protetor dos compostos fenólicos dos extratos PHE e PE sobre a mioglobina. Uma vez que a perda da cor vermelha das amostras de hambúrgueres bovinos durante o armazenamento refrigerado está associada à síntese de metamioglobina através da degradação da mioglobina e ao aumento da oxidação dos hambúrgueres (Barbosa *et al.*, 2022; Chaari *et al.*, 2022). Comportamento similar no tom de vermelho foram relatados por Liang *et al.* (2022) em amostras de hambúrgueres embalados com atmosfera modificada com alto teor de oxigênio, combinados com subprodutos do processamento de alimentos vegetais, e por Chaari *et al.* (2022) em amostras de carne moída crua embaladas com filmes ativos à base de gelatina-alginato de sódio contendo extrato de casca de beterraba sob refrigeração.

Com relação a intensidade da cor amarela ( $b^*$ ) dos hambúrgueres, houve diferença entre os tratamentos apenas no 3º dia (FIGURA 34C). Os valores de  $b^*$  dos hambúrgueres apresentaram flutuação durante o armazenamento, apresentando maiores valores para os filmes com PHE e PE, bem como o filme base com adição de BHT no 9º dia, sendo que ao final do armazenamento o maior valor obtido para a amostra PVC (16,02). De acordo com Santos *et al.* (2022), este aumento da variável  $b^*$  pode ser associado com a oxidação lipídica durante o armazenamento do produto.

A diferença colorimétrica total ( $\Delta E$ ) dos hambúrgueres em relação ao início do armazenamento foi afetada pelo tipo de filme e tempo de armazenamento, com efeito

da interação ( $p < 0,05$ ) (FIGURA 34D). Houve aumento nos valores de  $\Delta E$  dos hambúrgueres ao longo do armazenamento, e as amostras apresentaram diferença significativa no 3º dia ( $p < 0,05$ ), sendo a amostra GF<sub>6PE</sub> aquela que apresentou menor diferença de cor em relação ao início do armazenamento.

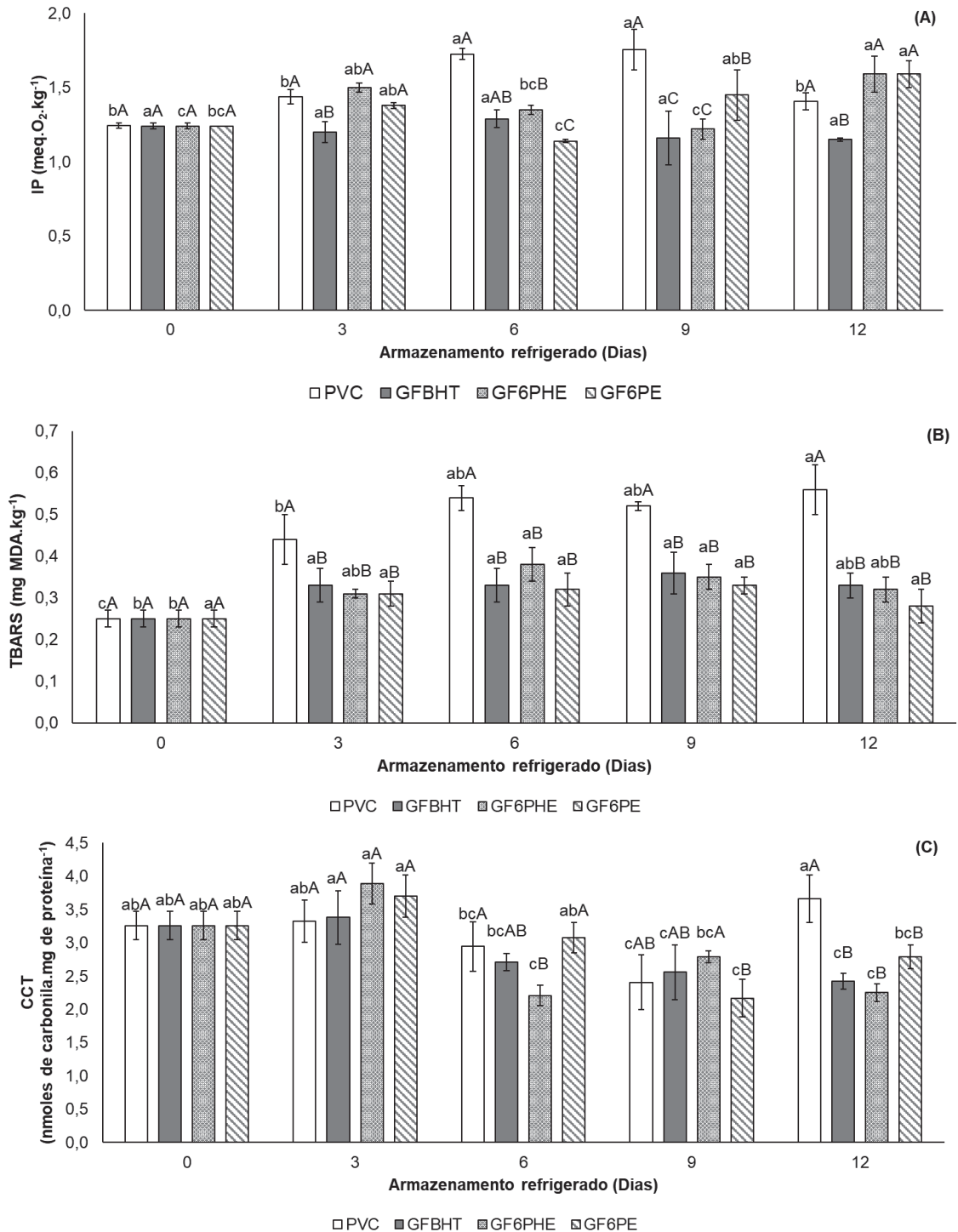
Todas as amostras apresentaram valores de  $\Delta E$  superiores a 2 a partir do 3º dia. As amostras de PVC mostraram elevados valores de  $\Delta E$  durante todo o armazenamento. Os maiores valores de  $\Delta E$  estão associados ao desenvolvimento de rancidez e à oxidação de heme-proteínas, que resultam na deterioração da cor da carne durante o armazenamento, o que tem um efeito importante na aceitabilidade do consumidor (Domínguez *et al.*, 2019). Os resultados obtidos neste estudo são corroborados por Santos *et al.* (2022), que constataram menores alterações nos atributos de cor ( $\Delta E$ ) em amostras de hambúrgueres bovinos revestidos com filme de gelatina incorporados com extrato de *Malpighia emarginata* quando comparadas ao filme de gelatina durante o armazenamento congelado

#### 6.3.3.2 Estabilidade da oxidação lipídica e proteica

Foi observado que o revestimento das amostras de hambúrgueres bovinos com filmes ativos à base de gelatina influenciou nos índices de oxidação lipídica e proteica durante o armazenamento refrigerado (FIGURA 35). Foi observado efeito significativo do tipo de filme, do armazenamento e da interação entre os fatores ( $p < 0,05$ ) para os parâmetros os parâmetros oxidativos de índice de peróxido (IP), TBARS e compostos carbonílicos totais (CCT).

Os valores de IP dos hambúrgueres revestidos com PVC apresentaram maiores valores, atingindo o pico na geração de peróxidos no 9º dia de armazenamento. Para as amostras de hambúrguer revestidas com os filmes ativos, foram observadas variações nos valores de IP durante o armazenamento, provavelmente devido à instabilidade dos hidroperóxidos. Os filmes GF<sub>6PHE</sub> e GF<sub>6PE</sub> foram capazes de promover a manutenção das amostras, apresentando valores de IP de 1,22 e 1,45 meq.O<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup> até o 9º dia, atingindo o pico na geração de IP no 12º dia, com valores de 1,59 e 1,59 meq.O<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>, respectivamente, indicando menor rancidez oxidativa nos hambúrgueres embalados (FIGURA 35A).

FIGURA 35 – RESULTADOS DOS ÍNDICES DE PERÓXIDOS (IP), TBARS E COMPOSTOS CARBONÍLICOS TOTAIS (CCT) DE HAMBÚRGUERES BOVINOS EMBALADOS REFRIGERADOS DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO (12 DIAS A  $4 \pm 1$  °C)



Valores médios  $\pm$  desvio padrão.

IP - Índice de Peróxido; TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; CCT - Compostos Carbonílicos totais.

Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre períodos de armazenamento, diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamentos pelo teste de Tukey.

PVC - filme plástico PVC; GF<sub>BHT</sub> - filme comestível de gelatina com BHT (200 ppm); GF<sub>6PHE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 6% PHE; GF<sub>6PE</sub> - Filme comestível gelatina incorporado com 6% PE.

FONTE: Autor (2024).

A taxa de auto-oxidação dos lipídios presentes nas carnes e produtos cárneos é influenciada pelo grau de hidrólise, a presença de antioxidantes e a disponibilidade de oxigênio, que são os três principais fatores que afetam a geração de compostos originados da oxidação lipídica (Khah *et al.*, 2021). Os hidroperóxidos que são considerados os primeiros produtos da oxidação, são inodoros e não contribuem com nenhum aroma (Gómez-Estaca *et al.*, 2014). O fato de as amostras revestidas com os filmes ativos GF<sub>6PHE</sub> e GF<sub>6PE</sub> terem apresentado menores valores de IP que a amostra controle (PVC) pode ser atribuído à diminuição da hidrólise como resultado da atividade antioxidante dos extratos PHE e PE, além de menor acesso ao oxigênio. Os produtos primários da oxidação, como os hidroperóxidos, são formados quando o oxigênio molecular e os ácidos graxos insaturados são combinados na presença de um catalisador, como ferro, luz ou calor, durante o estágio inicial (Gómez-Estaca *et al.*, 2014). Como foi observado, os filmes apresentaram capacidade de eliminação dos radicais livres e a capacidade de quelar metais, como o íon ferro (FRAP do PHE =  $5,42 \pm 0,28 \mu\text{mol ET.g}^{-1}$  filme; PE =  $9,18 \pm 0,27 \mu\text{mol ET.g}^{-1}$  filme), resultando na formação de complexos estáveis com os íons heme e não heme, o que inibiu a oxidação lipídica.

Estudos na literatura corroboram o comportamento obtido nesta pesquisa. Khah *et al.* (2021) verificaram menores valores de IP para amostras de filé de frango tratadas com filmes emulsionados de pectina-gelatina contendo azeite de oliva virgem, óleo de semente de uva e óleo essencial Savory, em relação à amostra controle durante o armazenamento refrigerado. Jonaidi Jafari *et al.* (2018) relataram que baixos valores de IP em filé de frango refrigerado revestido com quitosana incorporada com extrato etanólico de própolis, enquanto Chaari *et al.* (2022) relatam menores índices de peróxido em carne moída crua refrigerada em que amostras revestidas com filmes ativos à base de gelatina-alginato de sódio contendo extrato de casca de beterraba.

As amostras de hambúrgueres foram submetidas à quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Verificou-se o efeito do tipo de filme, do tempo de armazenamento e da interação entre os fatores ( $p < 0,05$ ). Durante o armazenamento dos hambúrgueres, foi observado o aumento de TBARS a partir do 3º dia para todas as amostras, sendo observada diferença significativa entre os tratamentos (FIGURA 35B).

Além disso, os tratamentos apresentaram valores significativamente menores de TBARS em comparação com o grupo controle ( $p < 0,05$ ). As amostras de PVC

exibiram uma variação de 0,25 a 0,56 mg MDA.kg<sup>-1</sup> de amostra, enquanto as amostras GF<sub>6PHE</sub> e GF<sub>6PE</sub> registraram valores máximos de TBARS de 0,32 e 0,28 mg MDA.kg<sup>-1</sup> ao longo dos 12 dias de armazenamento refrigerado. Os filmes GF<sub>6PHE</sub> e GF<sub>6PE</sub> foram capazes de inibir a formação de malonaldeído, com geração menor deste composto em comparação com o filme de PVC, reduzindo os valores de TBARS em 42,86% e 50%, respectivamente. Esses valores foram levemente superiores aos obtidos pelo filme base incorporado com BHT, que foi capaz de reduzir em 41,07% a geração de MDA.

Assim como o IP, as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico são compostos resultantes da decomposição dos hidroperóxidos, que leva à formação de uma ampla gama de compostos, incluindo o malonaldeído, um dos aldeídos mais importantes gerados durante a oxidação lipídica secundária de ácidos graxos poli-insaturados, que em pequenas quantidades produz aromas rançosos (Domínguez *et al.*, 2019; Khah *et al.*, 2021).

Comportamento similar para TBARS foi relatado na literatura em hambúrgueres de cordeiro revestidos com filme ativo de amido-gelatina contendo extratos de *Syzygium cumini* e *Origanum vulgare* ao final do armazenamento sob congelamento (Barbosa *et al.*, 2022), em carne moída crua refrigerada, em que amostras revestidas com filmes ativos à base de gelatina-alginato de sódio contendo extrato de casca de beterraba (Chaari *et al.*, 2022), e em hambúrgueres bovinos revestidos com filmes de gelatina incorporados com extrato do resíduo de *Malpighia emarginata* durante o armazenamento congelado (Santos *et al.*, 2022).

Além do efeito antioxidante dos filmes sobre a oxidação lipídica, foi avaliada ainda a ação dos filmes ativos de gelatina contra a oxidação proteica, avaliada através da determinação dos compostos carbonílicos totais (CCT), e o resultado encontra-se disposto na FIGURA 35C. Assim como observado para a oxidação lipídica, para o conteúdo de compostos carbonílicos foi observado efeito significativo do tratamento, tempo de armazenamento e a interação entre os fatores sobre a oxidação das proteínas ( $p < 0,05$ ).

Foi observada flutuação no conteúdo de CCT durante o armazenamento dos hambúrgueres. As amostras revestidas com filme comercial (PVC) apresentaram concentração de CCT variando de 2,41 (dia 0) a 3,66 (dia 12) durante o armazenamento refrigerado, sendo a amostra que apresentou maiores valores de oxidação. As amostras revestidas com os filmes GF<sub>6PHE</sub> e GF<sub>6PE</sub> apresentaram

menores valores de compostos carbonílicos (2,25 e 2,79 nmoles de carbonila.mg de proteína<sup>-1</sup>) ao final do armazenamento quando comparadas com a amostra PVC (3,66 nmoles de carbonila.mg de proteína<sup>-1</sup>), mostrando o potencial efeito antioxidante dos extratos adicionados, onde os compostos fenólicos com grupos hidroxila livres impedem a oxidação adicional de grupos sulfidríla de proteínas, reduzindo assim a oxidação das proteínas (Ansarian *et al.*, 2022). Estes filmes foram capazes de reduzir a geração de CCT em 38,52% e 23,77%, respectivamente, na produção de compostos carbonílicos, comparado à amostra PVC no final do armazenamento. Resultado similar ao obtido para o filme base adicionado de BHT, que foi capaz de reduzir a geração de CCT em 33,88%.

A oxidação proteica nas amostras de hambúrgueres bovinos pode ser influenciada pela presença de compostos de oxidação lipídica quando os hidroperóxidos são decompostos para a formação de uma ampla gama de compostos carbonílicos e outras substâncias (aldeídos), que oxidam facilmente constituintes de proteínas (Khah *et al.*, 2021; Santana Neto *et al.*, 2021). Dentre as principais consequências da oxidação proteica em carnes e derivados consiste na destruição de proteínas como a mioglobina e proteínas miofibrilares, diminuindo a qualidade e o valor nutricional da carne. O aumento no conteúdo de compostos carbonílicos na carne indica a oxidação das cadeias laterais de alguns aminoácidos, como resíduos de arginina, lisina, treonina e prolina, aminoácidos essenciais, diminuindo a qualidade e reduzindo a digestibilidade das proteínas presentes na carne (Ansarian *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2022).

Estudos utilizando filmes ativos contendo extratos para inibir/diminuir a taxa de oxidação de lipídios e proteínas têm sido relatados na literatura. Santos *et al.* (2022) relataram valores mais baixos para compostos carbonílicos totais em hambúrgueres bovinos revestidos com filmes de gelatina incorporados com extrato do resíduo de *Malpighia emarginata* durante o armazenamento congelado durante 60 dias de armazenamento, bem como Ansarian *et al.* (2022), que relataram menores teores de compostos carbonílicos em carne de camelo picada embalada com filmes de goma de semente de manjerição à base de nanoemulsão contendo resveratrol e óleo essencial de cravo durante 20 dias de armazenamento a 4 °C.

## 6.4 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos, foi possível afirmar que os extratos PHE e PE apresentam alto teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante. A adição dos extratos nos filmes de gelatina reforçados com pó da casca de pinhão influenciou nas propriedades mecânicas, que apresentaram valores próximos a de embalagens de alimentos, como o LDPE. A incorporação dos extratos, promoveram alterações na PVA, solubilidade, bem como microestruturais dos filmes. Os filmes mostraram relevantes teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante, com migração preferencial dos polifenóis para o simulante aquoso. A biodegradação em solo dos filmes também foi influenciada pelos extratos, com elevada degradação após 30 dias de compostagem.

Quanto ao uso dos filmes como embalagens ativas, os resultados deste estudo mostraram que a aplicação de filme à base de gelatina enriquecido com PHE e PE para hambúrgueres bovinos, foram capazes de manter/ estabilizar a coloração das amostras em relação ao início do armazenamento, quando comparados com o controle. Revelaram maior potencial para retardar a oxidação lipídica e proteica, prolongando assim a vida útil dos hambúrgueres. Esses efeitos são causados principalmente pelos compostos antioxidantes presentes nos filmes de gelatina incorporados com PHE e PE. Os filmes recém-desenvolvidos podem eventualmente ser utilizados para embalagens em carne e produtos cárneos, uma vez que são alternativas ecologicamente corretas e econômicas aos filmes plásticos padrão.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A casca do pinhão é uma fonte sustentável de antioxidantes naturais e compostos fenólicos, cujo processo de extração influenciou positivamente o teor de compostos bioativos e a atividade antioxidante. As condições otimizadas de extração resultaram em um extrato com valores superiores aos previstos, demonstrando a eficácia da metodologia utilizada. Isso torna a utilização do extrato da casca de pinhão, na indústria de alimentos, promissora.

Quanto aos extratos de própolis, os resultados indicam que ambos os métodos de extração (sonicação no final do processo e uso do disruptor de células) foram eficientes e demonstraram alto potencial antioxidante. O método de sonicação mostrou-se efetivo na extração dos compostos antioxidantes, possibilitando alto rendimento no processo de retirada, enquanto o método com disruptor de células foi o mais indicado quando se busca economia no tempo de extração. Esses extratos podem ser aplicados em alimentos e outros materiais, tanto diretamente nos produtos, quanto na produção de embalagens ativas, mostrando-se uma importante fonte de material bioativo.

No estudo sobre a casca de pinhão, como reforço em filmes à base de farinha da amêndoa de pinhão e gelatina, os resultados revelaram que a incorporação do pó da casca de pinhão foi tão eficiente quanto o polietileno de baixa densidade em relação as propriedades mecânicas. Portanto, esses filmes reforçados com casca de pinhão apresentam potencial para serem utilizados como embalagens comestíveis biodegradáveis, contribuindo para a redução do acúmulo de plásticos sintéticos no meio ambiente.

Em relação aos filmes ativos à base de farinha da amêndoa de pinhão e à base de gelatina com extratos PHE e PE, os mesmos mostraram propriedades mecânicas próximas aos filmes usados em embalagens de alimentos tradicionais. Os resultados deste estudo indicam que os filmes ativos desenvolvidos, incorporados com PHE e PE, podem ser utilizados como embalagens primárias para alimentos, prolongando a vida útil dos produtos através do controle das reações de oxidação lipídica e proteica. Além disso, esses representam uma alternativa ecologicamente correta e econômica aos filmes plásticos tradicionais. No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar o potencial desses filmes em relação às propriedades microbiológicas e sensoriais dos alimentos.

Em resumo, este estudo contribuiu para o conhecimento sobre o potencial antioxidante da casca de pinhão e dos extratos de própolis, bem como para o desenvolvimento de filmes ativos com propriedades mecânicas e antioxidantes relevantes para aplicações na indústria de alimentos. As descobertas desta pesquisa podem ter implicações significativas para a produção de embalagens mais sustentáveis e eficazes na preservação da qualidade dos alimentos, reduzindo assim os impactos negativos no meio ambiente e na saúde humana.

### 7.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em estudos futuros, sugere-se a realização de pesquisas que avaliem atividades biológicas dos extratos de pinhão e própolis, como atividade anti-hipertensiva, cicatrizante, hipocolesterolêmica, imunomoduladora, antiulcerativa, dentre outras. Além disso, também podem ser realizadas pesquisas que objetivem analisar o efeito da aplicação do filme à base de farinha da amêndoa de pinhão e à base de gelatina com adição dos extratos de pinhão e própolis frente aos parâmetros microbiológicos de produtos cárneos durante o armazenamento, bem como recomenda-se a avaliação da percepção dos consumidores quanto à aparência, textura, aroma, cor, dentre outros atributos dos produtos embalados com esses filmes ao longo de sua vida de prateleira.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, M. R. S. *et al.* Improving the sensory , physicochemical and microbiological quality of pastirma (A traditional dry cured meat product) using chitosan coating. **LWT - Food Science and Technology**, v. 86, p. 247–253, 2017.
- ADILAH, Z. A. M.; HANANI, Z. A. N. Active packaging of fish gelatin films with *Morinda citrifolia* oil. **Food Bioscience**, v. 16, p. 66–71, 2016.
- ADILAH, Z. A. M.; JAMILAH, B.; NUR HANANI, Z. A. Functional and antioxidant properties of protein-based films incorporated with mango kernel extract for active packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 207–218, 2018.
- AHMADI, A.; AHMADI, P.; EHSANI, A. Development of an active packaging system containing zinc oxide nanoparticles for the extension of chicken fillet shelf life. **Food Science and Nutrition**, v. 8, n. 10, p. 5461–5473, 2020.
- AKCAN, T.; ESTÉVEZ, M.; SERDAROĞLU, M. Antioxidant protection of cooked meatballs during frozen storage by whey protein edible films with phytochemicals from *Laurus nobilis* L. and *Salvia officinalis*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 323–331, 2017.
- AL-HASSAN, A. A.; NORZIAH, M. H. Starch–gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 108–117, 2012.
- ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; OLALERE, O. A. Ethanolic extraction of flavonoids, phenolics and antioxidants from *Vernonia amygdalina* leaf using two-level factorial design. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 1, p. 7–16, 2020.
- ALCÂNTARA, M. A. *et al.* Effect of the solvent composition on the profile of phenolic compounds extracted from chia seeds. **Food Chemistry**, v. 275, p. 489–496, 2019.
- ALEXANDRE, E. M. C. *et al.* Gelatin-based films reinforced with montmorillonite and activated with nanoemulsion of ginger essential oil for food packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 10, p. 87–96, 2016.
- ALFARO, A. T. *et al.* African catfish (*Clarias gariepinus*) skin gelatin: Extraction optimization and physical–chemical properties. **Food Research International**, v. 65, n. PC, p. 416–422, 2014.
- ALVES-SILVA, G. F.; ROMANI, V. P.; MARTINS, V. G. Jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*) pulp films: Properties, antioxidant potential and biodegradability. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 34, p. 100923, 2022.
- AMARAL, L. *et al.* Reinforcement of starch film with *Castanea sativa* shells polysaccharides: Optimized formulation and characterization. **Food Chemistry**, v. 396, p. 133609, 2022.

- AMARIZ, A.; LIMA, M. A. C. de; ALVES, R. E. Quality and antioxidant potential of byproducts from refining of fruit pulp. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 2, p. 203–209, 2018.
- AMIRI, E. *et al.* Combined antioxidant and sensory effects of corn starch films with nanoemulsion of *Zataria multiflora* essential oil fortified with cinnamaldehyde on fresh ground beef patties. **Meat Science**, v. 153, p. 66–74, 2019.
- ANDRADE, J. K. S. *et al.* Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129–138, 2017.
- ANDREASEN, M. F. *et al.* Antioxidant Effects of Phenolic Rye (*Secale cereale* L.) Extracts, Monomeric Hydroxycinnamates, and Ferulic Acid Dehydromers on Human Low-Density Lipoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 4090–4096, 2001.
- ANSARIAN, E. *et al.* Nanoemulsion-based basil seed gum edible film containing resveratrol and clove essential oil: In vitro antioxidant properties and its effect on oxidative stability and sensory characteristic of camel meat during refrigeration storage. **Meat Science**, v. 185, p. 108716, 2022.
- AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg: AOAC International, 2005.
- ARANHA, J. B. *et al.* Efeito da radiação gama nos parâmetros microbiológicos, físico-químicos e compostos fenólicos de farinha de resíduos de frutas durante armazenamento. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, p. e2016123, 2017.
- ARBELÁEZ, D. P. ; *et al.* Synthesis, Characterization, and Optimization Studies of Starch/Chicken Gelatin Composites for Food-Packaging Applications. **Molecules** **2022**, Vol. **27**, Page **2264**, v. 27, n. 7, p. 2264, 2022.
- ARCIELLO, A. *et al.* Development and characterization of antimicrobial and antioxidant whey protein-based films functionalized with Pecan (*Carya illinoensis*) nut shell extract. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 29, n. June, p. 100710, 2021.
- ARDJOURN, N. *et al.* Incorporation of *Thymus vulgaris* essential oil and ethanolic extract of propolis improved the antibacterial, barrier and mechanical properties of corn starch-based films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 224, p. 578–583, 2023.
- ARRIOLA, N. A. *et al.* Potential of nanofiltration for the concentration of bioactive compounds from watermelon juice. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 9, p. 2052–2060, 2014.
- ASEM, N. *et al.* Correlation between total phenolic and flavonoid contents with antioxidant activity of Malaysian stingless bee propolis extract. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 4, p. 437–442, 2020.

ASTM. **ASTM D882-18: Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting**. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2018.

ASTM. **ASTM E96/E96M-16. Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials**. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2016.

ASTM. **ASTM D6400-12. Standard Specification for Labeling of Plastics Designed to be Aerobically Composted in Municipal or Industrial Facilities**. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2012.

BADALAMENTI, N. *et al.* Chemical Compositions and Antioxidant Activities of Essential Oils, and Their Combinations, Obtained from Flavedo By-Product of Seven Cultivars of Sicilian *Citrus aurantium* L. **Molecules** **2022**, Vol. **27**, Page **1580**, v. 27, n. 5, p. 1580, 2022.

BAIANO, A. Recovery of Biomolecules from Food Wastes — A Review. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14821–14842, 2014.

BAKKALOGLU, Z.; ARICI, M.; KARASU, S. Optimization of ultrasound-assisted extraction of turkish propolis and characterization of phenolic profile, antioxidant and antimicrobial activity. **Food Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 687–695, 2021.

BANKOVA, V.; TRUSHEVA, B.; POPOVA, M. Propolis extraction methods: a review. **Journal of Apicultural Research**, v. 60, n. 5, p. 734–743, 2021.

BANSKOTA, A. H. *et al.* Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1–2, p. 239–246, 2000.

BARBI, R. C. T. *et al.* *Eriobotrya japonica* seed as a new source of starch : Assessment of phenolic compounds , antioxidant activity , thermal , rheological and morphological properties. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 646–658, 2018.

BARBOSA-PEREIRA, L. *et al.* Development of new active packaging films coated with natural phenolic compounds to improve the oxidative stability of beef. **Meat Science**, v. 97, n. 2, p. 249–254, 2014.

BARBOSA, T. C. M. *et al.* Effect of active gelatin-starch film containing *Syzygium cumini* and *Origanum vulgare* extract on the preservation of lamb burgers. **Meat Science**, v. 191, n. April, p. 108844, 2022.

BARRETO, A. G. *et al.* Contribuição da película na qualidade Nutricional de amêndoas de pinhão (*Araucária Angustifolia*). In: , 2016, Gramado/RS. **XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**. Gramado/RS: 2016. p. 50–55. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/sbctars-eventos/xxvcbcta/anais/>.

BARRETO, A. G. *et al.* Moisture sorption isotherms and shelf-life evaluation of pinhão (*Araucaria angustifolia*) flour. In: , 2017, Liège, Belgium. **6th European Drying Conference**. Liège, Belgium: 2017. p. 19–21.

BARRIUSO, B.; ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. **European Food Research and Technology**, v. 236, p. 1–15, 2013.

BARROS, M. de *et al.* Estudo da ação antioxidante da farinha de pinhão em biscoitos tipo cookie. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 6, p. 16166–16185, 2020.

BARROS, S. de S. *et al.* Value aggregation of pine (*Araucaria angustifolia*) nuts agro-industrial waste by cellulose extraction. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e270101018836, 2021.

BELLATTO, G. A.; BRAGUINI, W. L. Assessment of the use of cooked *Araucaria angustifolia* seed coats extract as food for brine shrimp. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 55, n. 9, p. 813–819, 2020.

BENBETTAÏEB, N.; DEBEAUFORT, F.; KARBOWIAK, T. Bioactive edible films for food applications: mechanisms of antimicrobial and antioxidant activity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 21, p. 3431–3455, 2019.

BENELLI, G. *et al.* The essential oil from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) by-products as an effective tool for insect pest management in organic crops. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 308–315, 2018.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BERMÚDEZ-ORIA, A. *et al.* Effect of edible pectin-fish gelatin films containing the olive antioxidants hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol on beef meat during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 148, n. July 2018, p. 213–218, 2019.

BERTOLO, M. R. V. *et al.* Central composite design optimization of active and physical properties of food packaging films based on chitosan/gelatin/pomegranate peel extract. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 34, p. 100986, 2022.

BILCK, A. P.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Biodegradable mulch films for strawberry production. **Polymer Testing**, v. 29, n. 4, p. 471–476, 2010.

BONILLA, J. *et al.* Effect of Chitosan Essential Oil Films on the Storage-Keeping Quality of Pork Meat Products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 8, p. 2443–2450, 2014.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

CAGDAS, E.; KUMCUOGLU, S. Effect of grape seed powder on oxidative stability of precooked chicken nuggets during frozen storage. **Journal of Food Science and**

**Technology**, v. 52, n. 5, p. 2918–2925, 2015.

CALVETE, T. *et al.* Application of carbon adsorbents prepared from Brazilian-pine fruit shell for the removal of reactive orange 16 from aqueous solution: Kinetic, equilibrium, and thermodynamic studies. **Journal of Environmental Management**, v. 91, n. 8, p. 1695–1706, 2010.

CALVETE, T. *et al.* Application of carbon adsorbents prepared from the Brazilian pine-fruit-shell for the removal of Procion Red MX 3B from aqueous solution—Kinetic, equilibrium, and thermodynamic studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 155, n. 3, p. 627–636, 2009.

CAPELLA, A. C. D. V.; PENTEADO, P. T. P. D. S.; BALBI, M. E. Semente de *Araucaria angustifolia*: aspectos morfológicos e composição química da farinha. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 135-142, 2009.

CARISSIMI, M.; FLÔRES, S. H.; RECH, R. Effect of microalgae addition on active biodegradable starch film. **Algal Research**, v. 32, p. 201–209, 2018.

CASAGRANDE, M. *et al.* Optimization of the extraction of antioxidant phenolic compounds from grape pomace using response surface methodology. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, n. 2, p. 1120–1129, 2019.

CAVALARO, R. I. *et al.* In vitro and in vivo antioxidant properties of bioactive compounds from green propolis obtained by ultrasound-assisted extraction. **Food Chemistry: X**, v. 4, p. 100054, 2019.

CERRUTI, P. *et al.* Effect of a natural polyphenolic extract on the properties of a biodegradable starch-based polymer. **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, n. 5, p. 839–846, 2011.

CHAARI, M. *et al.* Novel Active Food Packaging Films Based on Gelatin-Sodium Alginate Containing Beetroot Peel Extract. **Antioxidants**, v. 11, n. 11, p. 2095, 2022.

CHAMBI, H. N. M.; GROSSO, C. R. F. Mechanical and water vapor permeability properties of biodegradable films based on methylcellulose, glucomannan, pectin and gelatin. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 739–746, 2011.

CHEW, K. K. *et al.* Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 4, p. 1427–1435, 2011.

CHIRINOS, R. *et al.* Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers. **Separation and Purification Technology**, v. 55, n. 2, p. 217–225, 2007.

CHOI, I. *et al.* Effect of oxidized phenolic compounds on cross-linking and properties of biodegradable active packaging film composed of turmeric and gelatin. **LWT**, v.

93, p. 427–433, 2018.

CHOULITOU, E. *et al.* Edible coating enriched with rosemary extracts to enhance oxidative and microbial stability of smoked eel fillets. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 12, n. December 2016, p. 107–113, 2017.

CIANNAMEA, E. M.; STEFANI, P. M.; RUSECKAITE, R. A. Physical and mechanical properties of compression molded and solution casting soybean protein concentrate based films. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 193–204, 2014.

ÇOBAN, M. Z. Effectiveness of chitosan/propolis extract emulsion coating on refrigerated storage quality of crayfish meat (*Astacus leptodactylus*). **CYTA - Journal of Food**, v. 19, n. 1, p. 212–219, 2021.

CORDENUNSI, B. R. *et al.* Chemical composition and glycemic index of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3412–3416, 2004.

COSTA, B. P. *et al.* Thermal, structural, morphological and bioactive characterization of acid and neutral modified loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) seed starch and its by-products. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 147, n. 12, p. 6721–6737, 2022.

COUTINHO, F. M. B.; MELLO, I. L.; MARIA, L. C. de S. Polietileno: Principais Tipos, Propriedades e Aplicações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2003.

CRUZ, E. P. da *et al.* Pinhão coat extract encapsulated in starch ultrafine fibers: Thermal, antioxidant, and antimicrobial properties and in vitro biological digestion. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 7, p. 2886–2897, 2021.

CUNHA, G. F. *et al.* Cassava-starch-based films supplemented with propolis extract: Physical, chemical, and microstructure characterization. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 12149–12158, 2021.

DA COSTA, F. J. O. G. *et al.* Characterisation of native starches of seeds of *Araucaria angustifolia* from four germplasm collections. **Thermochimica Acta**, v. 565, p. 172–177, 2013.

DA NÓBREGA SANTOS, E. *et al.* From waste to wonder: Unleashing the antimicrobial and antioxidant potential of acerola residue using a central composite rotatable design. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, n. 6, 2023.

DA SILVA, D. C. *et al.* Physical properties of films based on pectin and babassu coconut mesocarp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 419–428, 2019.

DAI, H. *et al.* Gelatin films functionalized by lignocellulose nanocrystals-tannic acid stabilized Pickering emulsions: Influence of cinnamon essential oil. **Food Chemistry**,

v. 401, p. 134154, 2023.

DALPONTE DALLABONA, I. *et al.* Development of alginate beads with encapsulated jabuticaba peel and propolis extracts to achieve a new natural colorant antioxidant additive. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1421–1432, 2020.

DAUDT, R. M. *et al.* Comparative study on properties of edible films based on pinhão (*Araucaria angustifolia*) starch and flour. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 279–287, 2016.

DAUDT, R. M. *et al.* Development of edible films based on Brazilian pine seed (*Araucaria angustifolia*) flour reinforced with husk powder. **Food Hydrocolloids**, v. 71, p. 60–67, 2017.

DE CARVALHO, F. M. de A. *et al.* Brazilian red propolis: Extracts production, physicochemical characterization, and cytotoxicity profile for antitumor activity. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, p. 726, 2020.

DE CARVALHO, G. R. *et al.* Cassava bagasse as a reinforcement agent in the polymeric blend of biodegradable films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, n. 12, p. 1–7, 2019.

DE CARVALHO, G. R. *et al.* Effect of the addition of cassava fibers on the properties of cassava starch composite films. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 38, n. 2, p. 341–349, 2021.

DE LIMA, G. G. *et al.* Characterisation and in vivo evaluation of *Araucaria angustifolia* pinhão seed coat nanosuspension as a functional food source. **Food and Function**, v. 11, n. 11, p. 9820–9832, 2020.

DE MELO, A. M. *et al.* Thermal, antioxidant, morphological and bioactive properties of starchy material extracted from the bacupari (*Garcinia brasiliensis* (Mart.)) seed using aqueous and alkaline maceration. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 147, n. 22, p. 12313–12328, 2022.

DE SANTANA NETO, D. C. *et al.* A comparison of the antioxidant properties of two different Brazilian propolis. **Microchemical Journal**, v. 200, p. 110352, 2024.

DE SANTANA NETO, D. C. *et al.* Potential of Pinhão husk (*Araucaria angustifolia*) as a structural reinforcement agent in the properties of edible films of Pinhão flour and gelatin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 141, n. 15, p. 1–20, 2024.

DE SOUZA, K. C. *et al.* Soy Protein Isolate Films Incorporated with Pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) Extract for Potential Use as Edible Oil Active Packaging. **Food and Bioprocess Technology**, v. 13, n. 6, p. 998–1008, 2020.

DEMICHELIS, F. *et al.* Technical and economic assessment of food waste valorization through a biorefinery chain. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 94, p. 38–48, 2018.

DOMÍNGUEZ, R. *et al.* A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. **Antioxidants**, v. 8, n. 10, p. 1–31, 2019.

DORNELES, M. S.; NOREÑA, C. P. Z. Extraction of bioactive compounds from *Araucaria angustifolia* bracts by microwave-assisted extraction. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 6, p. e14481, 2020.

DORNELES, M. S.; NOREÑA, C. P. Z. Microwave-assisted extraction of bioactive compounds from *Araucaria angustifolia* bracts followed by encapsulation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 6, p. 1–15, 2020.

DOS SANTOS, R. W. S. *et al.* Buriti oil and natural surfactant improve the properties of cassava starch and carboxymethylcellulose films. **Packaging Technology and Science**, v. 36, n. 4, p. 281–292, 2023.

DU, H. *et al.* Multifunctional film based on gelatin with titanium dioxide and thymol@ $\beta$ -cyclodextrins for fresh-keeping packaging. **Food Bioscience**, v. 50, p. 102168, 2022.

DUARTE, W. de J. B. LIXO PLÁSTICO: UMA AMEAÇA À VIDA MARINHA. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 8, n. 8, p. 22–31, 2022.

EMIROĞLU, Z. K. *et al.* Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, v. 86, n. 2, p. 283–288, 2010.

ERGEZER, H.; SERDAROĞLU, M. Antioxidant potential of artichoke (*Cynara scolymus* L.) byproducts extracts in raw beef patties during refrigerated storage. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 2, p. 982–991, 2018.

ERICKSON, M. C. Lipid oxidation of muscle foods. *In*: AKOH, C. C.; MIN, D. B. (org.). **Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology**. New York, USA.: Marcel Dekker, 2002. p. 384–430.

ESCRICHE, I.; JUAN-BORRÁS, M. Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. **Food Research International**, v. 106, p. 834–841, 2018.

ESKANDARINIA, A. *et al.* Physicochemical, Antimicrobial and Cytotoxic Characteristics of Corn Starch Film Containing Propolis for Wound Dressing. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 8, p. 3345–3351, 2018.

ESPARZA-MARTÍNEZ, F. J. *et al.* Extractable and Non-Extractable Phenolics and Antioxidant Capacity of Mandarin Waste Dried at Different Temperatures. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 71, n. 3, p. 294–300, 2016.

ESPARZA-MARTÍNEZ, F. J.; MIRANDA-LÓPEZ, R.; GUZMAN-MALDONADO, S. H. Effect of air-drying temperature on extractable and non-extractable phenolics and

antioxidant capacity of lime wastes. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 1–6, 2016.

ESTÉVEZ, M. Oxidative damage to poultry: From farm to fork. **Poultry Science**, v. 94, n. 6, p. 1368–1378, 2015.

ESTÉVEZ, M. Protein carbonyls in meat systems: A review. **Meat Science**, v. 89, n. 3, p. 259–279, 2011.

ESTÉVEZ, M.; LUNA, C. Dietary protein oxidation: A silent threat to human health?. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 17, p. 3781–3793, 2017.

ESTÉVEZ, M.; MORCUENDE, D.; VENTANAS, S. Determination of Oxidation. *In*: NOLLET, L. M. L.; TOLDRÁ, F. (org.). **Handbook of processed meats and poultry analysis**. 1. ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2008. p. 141–162.

ESTÉVEZ, M.; XIONG, Y. L. Protein Oxidation in Foods: Mechanisms, Consequences, and Antioxidant Solutions. **Foods 2021, Vol. 10, Page 2346**, v. 10, n. 10, p. 2346, 2021.

FATIMA, S. *et al.* The Optimization of Gelatin Extraction from Chicken Feet and the Development of Gelatin Based Active Packaging for the Shelf-Life Extension of Fresh Grapes. **Sustainability**, v. 14, n. 13, p. 7881, 2022.

FAVARETO, R. *et al.* Extraction of bioactive compounds of leaves of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae) using green and organic solvents. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 1, p. 549–556, 2019.

FAZELI, M.; KELEY, M.; BIAZAR, E. Preparation and characterization of starch-based composite films reinforced by cellulose nanofibers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 272–280, 2018.

FERREIRA, V. C. S. *et al.* Effect of pre-cooking methods on the chemical and sensory deterioration of ready-to-eat chicken patties during chilled storage and microwave reheating. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 6, p. 2760–2769, 2016.

FERREIRA, V. C. S. *et al.* Role of protein oxidation in the nutritional loss and texture changes in ready-to-eat chicken patties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1518–1526, 2018.

FLORENTINO, G. I. B. *et al.* Characterization of a new food packaging material based on fish by-product proteins and passion fruit pectin. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 33, p. 100920, 2022.

FONSECA, L. M. *et al.* Electrospun Starch Fibers Loaded with Pinhão (*Araucaria angustifolia*) Coat Extract Rich in Phenolic Compounds. **Food Biophysics**, v. 15, n. 3, p. 355–367, 2020.

FREITAS, T. B. De *et al.* Antioxidants extraction from Pinhão (*Araucaria angustifolia*

(Bertol.) Kuntze) coats and application to zein films. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 15, n. April, p. 28–34, 2018.

FREITAS, A. M. *et al.* Antiviral activity-guided fractionation from *Araucaria angustifolia* leaves extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 3, p. 512–517, 2009.

FREITAS, P. A. V.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A. Active Poly (Lactic Acid) Films with Rice Straw Aqueous Extracts for Meat Preservation Purposes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, p. 1–16, 2023.

GALLEGO, M. G. *et al.* Gelatine-based antioxidant packaging containing *Caesalpinia decapetala* and tara as a coating for ground beef patties. **Antioxidants**, v. 5, n. 2, 2016.

GANHÃO, R.; MORCUENDE, D.; ESTÉVEZ, M. Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage. **Meat Science**, v. 85, n. 3, p. 402–409, 2010.

GARAVAND, Y. *et al.* Starch-Polyvinyl Alcohol-Based Films Reinforced with Chitosan Nanoparticles: Physical, Mechanical, Structural, Thermal and Antimicrobial Properties. **Applied Sciences**, v. 12, n. 3, p. 1111, 2022.

GARCÍA-LOMILLO, J. *et al.* Antioxidant effect of seasonings derived from wine pomace on lipid oxidation in refrigerated and frozen beef patties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 85–91, 2017.

GAVAHIAN, M. *et al.* A critical analysis of the cold plasma induced lipid oxidation in foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 77, p. 32–41, 2018.

GE, L. *et al.* Development of active rosmarinic acid-gelatin biodegradable films with antioxidant and long-term antibacterial activities. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 308–316, 2018.

GHADIRI ALAMDARI, N.; SALMASI, S.; ALMASI, H. Tomato Seed Mucilage as a New Source of Biodegradable Film-Forming Material: Effect of Glycerol and Cellulose Nanofibers on the Characteristics of Resultant Films. **Food and Bioprocess Technology**, v. 14, n. 12, p. 2380–2400, 2021.

GIORGIO, L. Di; SALGADO, P. R.; MAURI, A. N. Flavored oven bags for cooking meat based on proteins. **LWT - Food Science and Technology**, v. 101, p. 374–381, 2019.

GIRARD, A. L.; AWIKA, J. M. Effects of edible plant polyphenols on gluten protein functionality and potential applications of polyphenol–gluten interactions. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 2164–2199, 2020.

GOGOI, P. *et al.* Effect of optimized ultrasound-assisted aqueous and ethanolic extraction of *Pleurotus citrinopileatus* mushroom on total phenol, flavonoids and

antioxidant properties. **Journal of Food Process Engineering**, v. 42, n. 6, p. e13172, 2019.

GOMES, S. *et al.* Evaluation of mature banana peel flour on physical, chemical, and texture properties of a gluten-free *Rissol*. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 8, p. e14441, 2022.

GÓMEZ-ESTACA, J. *et al.* Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science and Technology**, v. 35, n. 1, p. 42–51, 2014.

GOUDARZI, J.; MOSHTAGHI, H.; SHAHBAZI, Y. Kappa-carrageenan-poly(vinyl alcohol) electrospun fiber mats encapsulated with *Prunus domestica* anthocyanins and epigallocatechin gallate to monitor the freshness and enhance the shelf-life quality of minced beef meat. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 35, n. June 2022, 2023.

GUIDOLIN, M. E. B. Z. **Caracterização da estrutura fina do amido de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze (Pinhão) e produção de extrusados**. 2016. 160 f. 160 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

GUIMARÃES, M. *et al.* Starch/PVA-based nanocomposites reinforced with bamboo nanofibrils. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 72–83, 2015.

GUYON, C.; MEYNIER, A.; DE LAMBALLERIE, M. Protein and lipid oxidation in meat: A review with emphasis on high-pressure treatments. **Trends in Food Science and Technology**, v. 50, p. 131–143, 2016.

HAGHIGHI, H. *et al.* Characterization of bio-nanocomposite films based on gelatin/polyvinyl alcohol blend reinforced with bacterial cellulose nanowhiskers for food packaging applications. **Food Hydrocolloids**, v. 113, p. 106454, 2021.

HASHEMINYA, S. M. *et al.* Development and characterization of biocomposite films made from kefiran, carboxymethyl cellulose and *Satureja Khuzestanica* essential oil. **Food Chemistry**, v. 289, n. March, p. 443–452, 2019.

HASSAN, B. *et al.* Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1095–1107, 2018.

HAZROL, M. D. *et al.* Effect of Kenaf Fibre as Reinforcing Fillers in Corn Starch-Based Biocomposite Film. **Polymers**, v. 14, n. 8, p. 1590, 2022.

HELM, C. V. *et al.* **Produção de farinha de pinhão funcional com compostos bioativos**. [S. l.: s. n.], Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1124119/1/CT-452-1811-final.pdf>>.

HERNÁNDEZ-CARMONA, F.; MORALES-MATOS, Y.; LAMBIS-MIRANDA, H. Starch extraction potential from plantain peel wastes. **Journal of Environmental**

**Chemical Engineering**, v. 5, n. 5, p. 4980–4985, 2017.

HOCHHEIM, S. *et al.* Determination of phenolic profile by HPLC–ESI-MS/MS, antioxidant activity, in vitro cytotoxicity and anti-herpetic activity of propolis from the Brazilian native bee *Melipona quadrifasciata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 339–350, 2019.

HUANG, L. *et al.* Microplastic contamination in coral reef fishes and its potential risks in the remote Xisha areas of the South China Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 186, p. 114399, 2023.

I IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura**. 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9105-producao-da-extracao-vegetal-e-da-silvicultura.html?=&t=resultados>. Acesso em: 17 nov. 2023.

IDF – International Dairy Federation. **Determination of the Peroxide Value. Standard 74A**:1991. Brussels, Belgium: IDF, 1991.

JANSEN-ALVES, C. *et al.* Microencapsulation of Propolis in Protein Matrix Using Spray Drying for Application in Food Systems. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 7, p. 1422–1436, 2018.

JANSEN-ALVES, C. *et al.* Production of Propolis Extract Microparticles with Concentrated Pea Protein for Application in Food. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 5, p. 729–740, 2019.

JANSEN-ALVES, C. *et al.* Propolis microparticles produced with pea protein: Characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 703–711, 2019.

JARAMILLO, C. M. *et al.* Biodegradability and plasticizing effect of *yerba mate* extract on cassava starch edible films. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 150–159, 2016.

JI, M. *et al.* A biodegradable chitosan-based composite film reinforced by ramie fibre and lignin for food packaging. **Carbohydrate Polymers**, v. 281, p. 119078, 2022.

JONAIIDI JAFARI, N. *et al.* The effect of chitosan coating incorporated with ethanolic extract of propolis on the quality of refrigerated chicken fillet. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 1, p. 1–8, 2018.

JORGE, T. *et al.* Physicochemical study of pinhão flour as source of adjunct in beer production. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 124, n. 4, p. 365–373, 2018.

JOVANOVIĆ, A. A. *et al.* Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. **Separation and Purification Technology**, v. 179, p. 369–380, 2017.

JRIDI, M. *et al.* Effects of active gelatin coated with henna (*L. inermis*) extract on beef meat quality during chilled storage. **Food Control**, v. 84, p. 238–245, 2018.

JRIDI, M. *et al.* Physicochemical, antioxidant and antibacterial properties of fish gelatin-based edible films enriched with orange peel pectin: Wrapping application. **Food Hydrocolloids**, v. 103, p. 105688, 2020.

KAMIYA, T. *et al.* Ethanol extract of Brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 44, p. 11065–11070, 2012.

KANATT, S. R. Development of active/intelligent food packaging film containing Amaranthus leaf extract for shelf life extension of chicken/fish during chilled storage. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 24, n. April, p. 100506, 2020.

KANG, J. H.; SONG, K. Bin. Characterization of Job's tears (*Coix lachryma-jobi* L.) starch films incorporated with clove bud essential oil and their antioxidant effects on pork belly during storage. **Lwt**, v. 111, n. May, p. 711–718, 2019.

KANMANI, P.; RHIM, J. W. Development and characterization of carrageenan/grapefruit seed extract composite films for active packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 68, p. 258–266, 2014.

KASOTE, D. M. *et al.* Chemical profiling, antioxidant, and antimicrobial activities of Indian stingless bees propolis samples. **Journal of Apicultural Research**, v. 58, n. 4, p. 617–625, 2019.

KASOTE, D.; BANKOVA, V.; VILJOEN, A. M. Propolis: chemical diversity and challenges in quality control. **Phytochemistry Reviews**, v. 21, n. 6, p. 1887–1911, 2022.

KHAH, M. D. *et al.* Effects of virgin olive oil and grape seed oil on physicochemical and antimicrobial properties of pectin-gelatin blend emulsified films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 171, p. 262–274, 2021.

KHOSHKALAMPOUR, A.; GHORBANI, M.; GHASEMPOUR, Z. Cross-linked gelatin film enriched with green carbon quantum dots for bioactive food packaging. **Food Chemistry**, v. 404, p. 134742, 2023.

KODAL COŞKUN, B. *et al.* Antioxidant active packaging with soy edible films and oregano or thyme essential oils for oxidative stability of ground beef patties. **Journal of Food Quality**, v. 37, n. 3, p. 203–212, 2014.

KOEHNLEIN, E. A. *et al.* Antioxidant activities and phenolic compounds of raw and cooked Brazilian pinhão (*Araucaria angustifolia*) seeds. **African Journal of Food Science**, v. 6, n. 21, p. 512–518, 2012.

KONUĞ TAKMA, D.; KOREL, F. Active packaging films as a carrier of black cumin essential oil: Development and effect on quality and shelf-life of chicken breast meat. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 19, p. 210–217, 2019.

KUMAR, Y. *et al.* Recent Trends in the Use of Natural Antioxidants for Meat and Meat Products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 6, p. 796–812, 2015.

KUMARI, M.; JAIN, S. Tannin: An Antinutrient with Positive Effect to Manage Diabetes. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 1, n. 12, p. 1–8, 2012.

KUSUMASTUTI, Y. *et al.* Effect of chitosan addition on the properties of low-density polyethylene blend as potential bioplastic. **Heliyon**, v. 6, n. 11, p. e05280, 2020.

LAUREANTI, E. J. G. *et al.* Development of active cassava starch films reinforced with waste from industrial wine production and enriched with pink pepper extract. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 138, n. 36, p. 1–16, 2021.

LEHMAN, N.; PHENGTHAI, R.; CHINPA, W. Effect of *Moringa oleifera* Pod Husk Fibers on the Properties of Gelatin-Based Biocomposite. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 4, p. 1405–1414, 2018.

LEITE, L. S. F. *et al.* Scaled-up production of gelatin-cellulose nanocrystal bionanocomposite films by continuous casting. **Carbohydrate Polymers**, v. 238, p. 116198, 2020.

LI, T. *et al.* Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives. **Food Chemistry**, v. 138, p. 821–826, 2013.

LIANG, Z. *et al.* Combined effects of plant food processing by-products and high oxygen modified atmosphere packaging on the storage stability of beef patties. **Food Control**, v. 133, p. 108586, 2022.

LIAO, J. *et al.* Investigation of Potential Use of Soybean Protein Isolate–Chinese Bayberry Tannin Extract Cross-Linked Films in Packaging Applications. **Materials**, v. 15, n. 15, 2022.

LIN, J. *et al.* The modification of gelatin films: Based on various cross-linking mechanism of glutaraldehyde at acidic and alkaline conditions. **Food Science & Nutrition**, v. 7, n. 12, p. 4140–4146, 2019.

LIU, Y. *et al.* Effect of gelatin type on the structure and properties of microfibrillated cellulose reinforced gelatin edible films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 139, n. 19, p. 52119, 2022.

LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C. *et al.* Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1376–1384, 2012.

LÓPEZ-PALESTINA, C. U. *et al.* Physicochemical and antioxidant properties of gelatin-based films containing oily tomato extract (*Solanum lycopersicum* L.). **CYTA - Journal of Food**, v. 17, n. 1, p. 142–150, 2019.

LOPEZ, B. G.-C. *et al.* Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert for its safe use. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 677–687, 2015.

LORENZO, J. M.; BATLLE, R.; GÓMEZ, M. Extension of the shelf-life of foal meat with two antioxidant active packaging systems. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 181–188, 2014.

LUCHESE, C. L. *et al.* Avaliação da influência da incorporação de diferentes resíduos agroindustriais em filmes à base de amido de mandioca. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 2, n. 2, p. 168–178, 2019.

LUCHESE, C. L. *et al.* Synthesis and characterization of biofilms using native and modified pinhão starch. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 203–210, 2015.

LUCHESE, C. L.; SPADA, J. C.; TESSARO, I. C. Starch content affects physicochemical properties of corn and cassava starch-based films. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 619–626, 2017.

LUND, M. N. *et al.* Protein oxidation in muscle foods: A review. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 55, p. 83–95, 2011.

LUSTOSA, S. R. *et al.* Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447–454, 2008.

MALEKI, S. J.; CRESPO, J. F.; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 299, p. 125124, 2019.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, L. P. C.; REIS, M. S. dos. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Brazilian Journal of Botany**, v. 27, n. 4, p. 787–796, 2004.

MARANGONI JÚNIOR, L. *et al.* Preparation and characterization of sodium alginate films with propolis extract and nano-SiO<sub>2</sub>. **Food Hydrocolloids for Health**, v. 2, p. 100094, 2022.

MARQUES, G. S. *et al.* Production and characterization of starch-based films reinforced by ramie nanofibers (*Boehmeria nivea*). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, n. 36, p. 1–11, 2019.

MARTIN-RIOS, C. *et al.* Food waste management innovations in the foodservice industry. **Waste Management**, v. 79, p. 196–206, 2018.

MARYAM ADILAH, Z. A. *et al.* Enhancing the physicochemical and functional properties of gelatin/graphene oxide/cinnamon bark oil nanocomposite packaging films using ferulic acid. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 34, n. October, p. 100960, 2022.

MAYWORM, M. A. S. *et al.* Does propolis contain tannins?. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 613647, 2014.

MEHDIZADEH, T.; LANGROODI, A. M. Chitosan coatings incorporated with propolis extract and *Zataria multiflora* Boiss oil for active packaging of chicken breast meat. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141, p. 401–409, 2019.

MEHTA, B. M.; DARJI, V. B.; APARNATHI, K. D. Comparison of five analytical methods for the determination of peroxide value in oxidized ghee. **Food Chemistry**, v. 185, p. 449–453, 2015.

MELO, A. M. de *et al.* Valorization of the agro-industrial by-products of bacupari (*Garcinia brasiliensis* (Mart.)) through production of flour with bioactive properties. **Food Bioscience**, v. 45, p. 101343, 2022.

MICHELON, F. *et al.* *Araucaria Angustifolia*: A Potential Nutraceutical with Antioxidant and Antimutagenic Activities. **Current Nutrition & Food Science**, v. 8, n. 3, p. 155–159, 2012.

MIR, S. A. *et al.* Effect of plant extracts on the techno-functional properties of biodegradable packaging films. **Trends in Food Science and Technology**, v. 80, p. 141–154, 2018.

MOHAN, C. C. *et al.* Active compound diffusivity of particle size reduced *S. aromaticum* and *C. cassia* fused starch edible films and the shelf life of mutton (*Capra aegagrus hircus*) meat. **Meat Science**, v. 128, p. 47–59, 2017.

MOHAN, C. C. *et al.* Quorum quenching effect and kinetics of active compound from *S. aromaticum* and *C. cassia* fused packaging films in shelf life of chicken meat. **LWT**, v. 105, p. 87–102, 2019.

MONTEIRO, P. I. *et al.* Anaerobic digestion of food waste for biogas production in glass bottles. **Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana**, v. 21, n. 4, p. 1798–1817, 2023.

MORADI, D. *et al.* Plasma-treated LDPE film incorporated with onion and potato peel extract – A food packaging for shelf life extension on chicken thigh. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 35, p. 101012, 2023.

MRKONJIĆ, Ž. *et al.* Optimization of antioxidants recovery from wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) by ultrasound-assisted extraction: Multi-response approach. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 24, p. 100333, 2021.

MÜLLER, P. S. *et al.* Influence of pinhão starch and natural extracts on the performance of thermoplastic cassava starch/PBAT extruded blown films as a technological approach for bio-based packaging material. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 9, p. 2832–2842, 2020.

MURALIDHARAN, V. *et al.* Influence of preparation techniques of cellulose II nanocrystals as reinforcement for tannery solid waste–based gelatin composite films. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 1, p. 1–20, 2022.

NAKTHONGA, N.; WONGSAGONSUP, R.; AMORNSAKCHAI, T. Characteristics and potential utilizations of starch from pineapple stem waste. **Industrial Crops & Products**, v. 105, p. 74–82, 2017.

NASCIMENTO FILHO, W. B. do; FRANCO, C. R. Avaliação do Potencial dos Resíduos Produzidos Através do Processamento Agroindustrial no Brasil. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1968–1987, 2015.

NAVIKAITE-SNIPAITIENE, V. *et al.* Development of antioxidant food packaging materials containing eugenol for extending display life of fresh beef. **Meat Science**, v. 145, n. July 2017, p. 9–15, 2018.

NAYAK, G. *et al.* A comparative study on antioxidant activity of propolis ethanolic extract and oil from different agroclimatic regions of Eastern India. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 50, p. 102685, 2023.

NAZURAH, R. N. F.; NUR HANANI, Z. A. Physicochemical characterization of kappa-carrageenan (*Eucheima cottoni*) based films incorporated with various plant oils. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1479–1487, 2017.

NORI, M. P. *et al.* Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 429–435, 2011.

NURUL SYAHIDA, S. *et al.* Effects of palm wax on the physical, mechanical and water barrier properties of fish gelatin films for food packaging application. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 23, p. 100437, 2020.

OJAGH, S. M. *et al.* Lessening of high-pressure-induced changes in Atlantic salmon muscle by the combined use of a fish gelatin–lignin film. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 595–606, 2011.

OKIYAMA, D. C. G. *et al.* Pressurized liquid extraction of flavanols and alkaloids from cocoa bean shell using ethanol as solvent. **Food Research International**, v. 114, p. 20–29, 2018.

OLDONI, T. L. C. *et al.* Chemical characterization and optimization of the extraction process of bioactive compounds from propolis produced by selected bees *Apis mellifera*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 10, p. 2054–2062, 2015.

OLIVEIRA, W. Q. de *et al.* Food packaging wastes amid the COVID-19 pandemic: Trends and challenges. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p. 1195–1199, 2021.

OROIAN, M.; DRANCA, F.; URSACHI, F. Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 70–78, 2020.

OU, B. *et al.* Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power

(FRAP) assays: A comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 3122–3128, 2002.

PACKER, V. G. *et al.* Chemical characterization, antioxidant activity and application of beetroot and guava residue extracts on the preservation of cooked chicken meat. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 11, p. 7409–7416, 2015.

PALSIKOWSKI, P. A. *et al.* Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *B. forficata* subsp. *Pruinosa*. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 98, n. 10, p. 2214–2226, 2020.

PALUDO, M. *et al.* Optimizing the Extraction of Anthocyanins from the Skin and Phenolic Compounds from the Seed of Jabuticaba Fruits (*Myrciaria jabuticaba* (Vell.) O. Berg) with Ternary Mixture Experimental Designs. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 7, p. 1506–1514, 2019.

PAPARGYROPOULOU, E. *et al.* Conceptual framework for the study of food waste generation and prevention in the hospitality sector. **Waste Management**, n. 49, p. 326–336, 2016.

PARVEEN, S. *et al.* Biodegradable protein films from gallic acid and the cataractous eye protein isolate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 12–20, 2019.

PASUPULETI, V. R. *et al.* Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–21, 2017.

PAZIN, W. M. *et al.* Antioxidant activities of three stingless bee propolis and green propolis types. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 1, p. 40–49, 2017.

PERALTA, R. M. *et al.* Biological activities and chemical constituents of *Araucaria angustifolia*: An effort to recover a species threatened by extinction. **Trends in Food Science & Technology**, v. 54, p. 85–93, 2016.

PERON-SCHLOSSER, B. *et al.* Optimization of wheat flour by product films: A technological and sustainable approach for bio-based packaging material. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 10, p. 4522–4538, 2021.

PIGOZZI, L. *et al.* Evaluation of Cooking Methods in the Phenolic Content and Antioxidant Activity in *Araucaria angustifolia* Seeds. **Chemical Engineering Transactions**, v. 75, p. 145–150, 2019.

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

PINTO, V. Z. *et al.* Molecular structure and granule morphology of native and heat-moisture-treated pinhão starch. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 2, p. 282–289, 2015.

PLASTICS EUROPE. **Plastics – the Facts 2022**. Disponível em: <  
<https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/>>. Acesso em: 03  
jun. 2023.

PORTER, L. J.; HRSTICH, L. N.; CHAN, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, v. 25, n. 1, p. 223–230, 1985.

PRITHIVIRAJ, M. *et al.* Characterization and qualitative evaluation of cassava starch-chitosan edible food wrap enriched with culinary leaf powders for eco-friendly food packaging applications. **Food Science and Technology International**, p. 108201322311794, 2023.

QIN, Y. *et al.* Preparation and characterization of active and intelligent packaging films based on cassava starch and anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 80–90, 2019.

QIU, L. *et al.* Effects of nanoemulsion-based chicken bone gelatin-chitosan coatings with cinnamon essential oil and rosemary extract on the storage quality of ready-to-eat chicken patties. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 34, p. 100933, 2022.

QUEIRÓS, C. S. G. P. *et al.* Characterization of walnut, almond, and pine nut shells regarding chemical composition and extract composition. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 10, n. 1, p. 175–188, 2020.

RADHA KRISHNAN, K. *et al.* Potential application of corn starch edible films with spice essential oils for the shelf life extension of red meat. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 6, p. 1613–1623, 2015.

RAHMASARI, Y.; YEMIŞ, G. P. Characterization of ginger starch-based edible films incorporated with coconut shell liquid smoke by ultrasound treatment and application for ground beef. **Meat Science**, v. 188, p. 108799, 2022.

RAJAN, M. *et al.* Optimization of solvent extraction and HPLC-DAD method parameters for determination of phenolic compounds in various Brazilian propolis. **Journal of Apicultural Research**, v. 63, n. 3, p. 556–569, 2024.

RAMOS, Ó. L. *et al.* Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 110–122, 2013.

RASID, N. A. M. *et al.* Rheological, functional and antioxidant properties of films forming solution and active gelatin films incorporated with *Centella asiatica* (L.) urban extract. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 18, p. 115–124, 2018.

RATTAYA, S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Properties of fish skin gelatin film incorporated with seaweed extract. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 1, p. 151–157, 2009.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 58–69, 2016.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

REGUENGO, L. M. *et al.* Agro-industrial by-products: Valuable sources of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 152, p. 110871, 2022.

REIS, A. S. dos *et al.* Physico-chemical characteristics of microencapsulated propolis co-product extract and its effect on storage stability of burger meat during storage at  $-15^{\circ}\text{C}$ . **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 306–313, 2017.

REYES, L. M.; LANDGRAF, M.; SOBRAL, P. J. A. Gelatin-based films activated with red propolis ethanolic extract and essential oils. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 27, p. 100607, 2021.

REZENDE, Y. R. R. S.; NOGUEIRA, J. P.; NARAIN, N. Comparison and optimization of conventional and ultrasound assisted extraction for bioactive compounds and antioxidant activity from agro-industrial acerola (*Malpighia emarginata* DC) residue. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 158–169, 2017.

RIAHI, Z. *et al.* Gelatin-based functional films integrated with grapefruit seed extract and  $\text{TiO}_2$  for active food packaging applications. **Food Hydrocolloids**, v. 112, p. 106314, 2021.

RIAZ, A. *et al.* Preparation and Characterization of Chitosan/Gelatin-Based Active Food Packaging Films Containing Apple Peel Nanoparticles. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, n. 2, p. 411–420, 2020.

RIBEIRO, J. S. *et al.* Natural antioxidants used in meat products: A brief review. **Meat Science**, v. 148, n. October 2018, p. 181–188, 2019.

RODRIGUES, F. A. M. *et al.* Antioxidant films and coatings based on starch and phenolics from *Spondias purpurea* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 354–365, 2021.

RODRÍGUEZ, F. J. *et al.* Modification of cellulose acetate films using nanofillers based on organoclays. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 2, p. 262–268, 2012.

ROSMINI, M. R. *et al.* TBA test by an extractive method applied to 'paté'. **Meat Science**, v. 42, n. 1, p. 103–110, 1996.

ROSSI, R. C. *et al.* Assessment of compounds and cytotoxicity of *Citrus deliciosa* Tenore essential oils: From an underexploited by-product to a rich source of high-value bioactive compounds. **Food Bioscience**, v. 38, p. 100779, 2020.

ROUT, R. K.; KUMAR, A.; RAO, P. S. A multivariate optimization of bioactive

compounds extracted from oregano (*Origanum vulgare*) leaves using pulsed mode sonication. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, n. 4, p. 3111–3122, 2021.

RUBILAR, J. F. *et al.* Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 4, p. 466–474, 2013.

RUIZ-MARTÍNEZ, I. G. *et al.* Production and Characterization of Gelatin Biomaterials Based on Agave Microfibers and Bentonite as Reinforcements. **Foods**, v. 11, n. 11, p. 1573, 2022.

RUIZ-MARTÍNEZ, I. G.; RODRIGUE, D.; SOLORZA-FERIA, J. Production and characterization of films based on gelatin, agave microfibers and nanoclays. **Polymer Bulletin**, v. 79, n. 3, p. 1437–1466, 2022.

SAFAEI, M.; ROOSTA AZAD, R. Preparation and characterization of poly-lactic acid based films containing propolis ethanolic extract to be used in dry meat sausage packaging. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 4, p. 1242–1250, 2020.

SAFDAR, M. N. *et al.* Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 3, p. 488–500, 2017.

SAITO, É. *et al.* Conventional and supercritical extraction of phenolic compounds from Brazilian red and green propolis. **Separation Science and Technology**, v. 56, n. 18, p. 3119–3126, 2021.

SALEVIĆ-JELIĆ, A. *et al.* Biodegradable and active zein-gelatin-based electrospun mats and solvent-cast films incorporating sage extract: Formulation and comparative characterization. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 35, p. 101027, 2023.

SAMBOU, M. *et al.* Extraction, Antioxidant Capacity, 5-Lipoxygenase Inhibition, and Phytochemical Composition of Propolis from Eastern Canada. **Molecules**, v. 25, n. 10, p. 2397, 2020.

SANT'ANNA, V. *et al.* Effect of cooking on polyphenols and antioxidant activity of *Araucaria angustifolia* seed coat and evaluation of phytochemical and microbiological stability over storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 8, p. 1932–1936, 2016.

SANTANA-MÉRIDAS, O.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; SÁNCHEZ-VIOQUE, R. Agricultural residues as a source of bioactive natural products. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 447–466, 2012.

SANTANA NETO, D. C. de *et al.* Inhibition of protein and lipid oxidation in ready-to-eat chicken patties by a *Spondias mombin* L. bagasse phenolic-rich extract. **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1338, 2021.

SANTANA NETO, D. C. de *et al.* Solid–liquid extraction of bioactive compounds from *Spondias mombin* L. by-products: optimization and identification of phenolic profile. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 39, n. 2, p. 511–525, 2022.

SANTI-GADELHA, T. *et al.* Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, n. 4, p. 1050–1055, 2006.

SANTOS, D. A. dos *et al.* Brazilian red propolis extracts: study of chemical composition by ESI-MS/MS (ESI+) and cytotoxic profiles against colon cancer cell lines. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 1, p. 120–130, 2019.

SANTOS, E. da N. *et al.* Edible active film based on gelatin and *Malpighia emarginata* waste extract to inhibit lipid and protein oxidation in beef patties. **LWT**, v. 154, p. 112837, 2022.

SANTOS, M. S. *et al.* Probiotic Yogurt with Brazilian Red Propolis: Physicochemical and Bioactive Properties, Stability, and Shelf Life. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 12, p. 3429–3436, 2019.

SANTOS, C. H. K. *et al.* Systematic study on the extraction of antioxidants from pinhão (*Araucaria angustifolia* (bertol.) Kuntze) coat. **Food Chemistry**, v. 261, n. February, p. 216–223, 2018.

SARANTI, T. F. d. S. *et al.* Performance of Gelatin Films Reinforced with Cloisite Na<sup>+</sup> and Black Pepper Essential Oil Loaded Nanoemulsion. **Polymers**, v. 13, n. 24, p. 4298, 2021.

SARRAF, M.; BEIG-BABAEI, A.; NAJI-TABASI, S. Optimizing extraction of berberine and antioxidant compounds from barberry by maceration and pulsed electric field-assisted methods. **Journal of Berry Research**, v. 11, n. 1, p. 133–149, 2021.

SEAB/DERAL - SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO/DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL. **Valor Bruto da Produção**. Disponível em: < <https://www.agricultura.pr.gov.br/vbp>>. Acesso em: 1 set. 2023.

SEMB, T. N. **Analytical Methods for Determination of the Oxidative Status in Oils**. Norwegian University of Science and Technology, 2012. Disponível em: [https://ntnuopen.ntnu.no/ntnuxmlui/bitstream/handle/11250/245799/536470\\_FULLTEXT01.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ntnuopen.ntnu.no/ntnuxmlui/bitstream/handle/11250/245799/536470_FULLTEXT01.pdf?sequence=2&isAllowed=y). Acesso em: 7 de nov. de 2020

SGANZERLA, W. G. *et al.* Bioactive food packaging based on starch, citric pectin and functionalized with *Acca sellowiana* waste by-product: Characterization and application in the postharvest conservation of apple. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 147, p. 295–303, 2020.

SHADKAMI, F.; ESTEVEZ, S.; HELLEUR, R. Analysis of catechins and condensed tannins by thermally assisted hydrolysis/methylation-GC/MS and by a novel two step methylation. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 85, n. 1–2, p. 54–65,

2009.

SHAHABI, N.; SOLEIMANI, S.; GHORBANI, M. Investigating functional properties of halloysite nanotubes and propolis used in reinforced composite film based on soy protein/basil seed gum for food packaging application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 231, p. 123350, 2023.

SHAMSUDIN, S. *et al.* Influence of origins and bee species on physicochemical, antioxidant properties and botanical discrimination of stingless bee honey. **International Journal of Food Properties**, v. 22, n. 1, p. 238–263, 2019.

SHANKAR, S.; WANG, L. F.; RHIM, J. W. Effect of melanin nanoparticles on the mechanical, water vapor barrier, and antioxidant properties of gelatin-based films for food packaging application. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 21, p. 100363, 2019.

SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, n. Article ID 206439, p. 1–29, 2015.

SILVA-RODRIGUES, H. C. *et al.* Gluten free edible film based on rice flour reinforced by guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa*) pulp. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 137, n. 41, p. 1–11, 2020.

SILVA, T. B. V. da *et al.* *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze extract as a source of phenolic compounds in TPS/PBAT active films. **Food and Function**, v. 10, n. 12, p. 7697–7706, 2019.

SILVA JÚNIOR, M. E. *et al.* Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from ciriguela (*Spondias purpurea* L.) peel: Optimization and comparison with conventional extraction and microwave. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 8, p. 103260, 2021.

SILVEIRA, M. P. *et al.* Development of active cassava starch cellulose nanofiber-based films incorporated with natural antimicrobial tea tree essential oil. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 137, n. 21, p. 48726, 2019.

SKABA, D. *et al.* Influence of the toothpaste with brazilian ethanol extract propolis on the oral cavity health. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n. Article ID 215391, p. 1–12, 2013.

SKOWRON, K. *et al.* Antilisterial Activity of Polypropylene Film Coated with Chitosan with Propolis and/or Bee Pollen in Food Models. **BioMed Research International**, v. 2019, n. Article ID 7817063, p. 1–12, 2019.

SOCAS-RODRÍGUEZ, B. *et al.* Food by-products and food wastes: are they safe enough for their valorization?. **Trends in Food Science & Technology**, v. 114, p. 133–147, 2021.

SOGUT, E.; CAKMAK, H. Utilization of carrot (*Daucus carota* L.) fiber as a filler for

chitosan based films. **Food Hydrocolloids**, v. 106, p. 105861, 2020.

SOGUT, E.; SEYDIM, A. C. The effects of Chitosan and grape seed extract-based edible films on the quality of vacuum packaged chicken breast fillets. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 18, n. August, p. 13–20, 2018.

SOLADOYE, O. P. *et al.* Protein oxidation in processed meat: mechanisms and potential implications on human health. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, p. 106–122, 2015.

SOLDADO, D.; BESSA, R. J. B.; JERÓNIMO, E. Condensed tannins as antioxidants in ruminants—effectiveness and action mechanisms to improve animal antioxidant status and oxidative stability of products. **Animals**, v. 11, n. 11, p. 3243, 2021.

SONG, G. *et al.* Emulsifier free fish gelatin based films with excellent antioxidative and antibacterial activity: Preparation, characterization and application in coating preservation of fish fillets. **Journal of Food Engineering**, v. 343, p. 111362, 2023.

SOO, P. Y.; SARBON, N. M. Preparation and characterization of edible chicken skin gelatin film incorporated with rice flour. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 15, p. 1–8, 2018.

SOUZA, M. O. *et al.* Antioxidant and Antigenotoxic Activities of the Brazilian Pine *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Antioxidants**, v. 3, p. 24–37, 2014.

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

SOUZA, F. T. C. *et al.* Production of nutritious flour from residue custard apple (*Annona squamosa* L.) for the development of new products. **Journal of Food Quality**, v. 2018, 2018.

SPADA, J. C.; DA SILVA, E. M.; TESSARO, I. C. Production and characterization of pinhão starch biofilms. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 3, p. 365–369, 2014.

SPADA, J. C.; LUCHESE, C. L.; TESSARO, I. C. Potential of pinhão Coat as Constituents of Starch Based Films Using Modification Techniques. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 7, p. 2686–2697, 2018.

STAROSZCZYK, H. *et al.* Fish gelatin films containing aqueous extracts from phenolic-rich fruit pomace. **LWT**, v. 117, p. 108613, 2020.

STORCK, C. R. *et al.* Qualidade microbiológica e composição de farinhas de resíduos da produção de suco de frutas em diferentes granulometrias Microbiological quality and composition of flour from fruit juice production. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 277–284, 2015.

SUDERMAN, N.; ISA, M. I. N.; SARBON, N. M. The effect of plasticizers on the

functional properties of biodegradable gelatin-based film: A review. **Food Bioscience**, v. 24, p. 111–119, 2018.

SUN, C. *et al.* Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

SUREK, M. *et al.* Propolis authentication of stingless bees by mid-infrared spectroscopy and chemometric analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 161, p. 113370, 2022.

SUSMITHA, A. *et al.* Development and characterization of corn starch-gelatin based edible films incorporated with mango and pineapple for active packaging. **Food Bioscience**, v. 41, p. 100977, 2021.

SUTAY KOCABAŞ, D. *et al.* Bulgur bran as a biopolymer source: Production and characterization of nanocellulose-reinforced hemicellulose-based biodegradable films with decreased water solubility. **Industrial Crops and Products**, v. 171, p. 113847, 2021.

SZABO, K. *et al.* Active packaging-poly (vinyl alcohol) films enriched with tomato by-products extract. **Coatings**, v. 10, n. 2, p. 1–18, 2020.

TAGHAVI KEVIJ, H. *et al.* Mechanical, physical, and bio-functional properties of biopolymer films based on gelatin as affected by enriching with orange peel powder. **Polymer Bulletin**, v. 78, n. 8, p. 4387–4402, 2021.

TALÓN, E. *et al.* Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1153–1161, 2017.

TANWAR, R. *et al.* Development and characterization of PVA-starch incorporated with coconut shell extract and sepiolite clay as an antioxidant film for active food packaging applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 185, p. 451–461, 2021.

TAVALLALI, H. *et al.* Essential Oil Composition, Antioxidant Activity, Phenolic Compounds, Total Phenolic and Flavonoid Contents from Pomace of Citrus aurantifolia. **Journal of Medicinal Plants and By-products**, v. 1, p. 103–116, 2021.

TAVASSOLI, M. *et al.* Multifunctional nanocomposite active packaging materials: Immobilization of quercetin, lactoferrin, and chitosan nanofiber particles in gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 118, p. 106747, 2021.

TIMM, T. G. *et al.* Nanosuspension of pinhão seed coat development for a new high-functional cereal bar. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 6, 2020.

TROJAIKE, G. H. *et al.* Antimicrobial Activity of *Araucaria angustifolia* seed (pinhão) coat extract and its synergism with thermal treatment to inactivate *Listeria*

*monocytogenes*. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 1, p. 193–197, 2019.

UMARAW, P. *et al.* Edible films/coating with tailored properties for active packaging of meat, fish and derived products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 98, p. 10–24, 2020.

UYSAL, S. *et al.* Optimization of Maceration Conditions for Improving the Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidant Effects of *Momordica Charantia* L. Leaves Through Response Surface Methodology (RSM) and Artificial Neural Networks (ANNs). **Analytical Letters**, v. 52, n. 13, p. 2150–2163, 2019.

VARGAS-SÁNCHEZ, R. D. *et al.* Propolis extract as antioxidant to improve oxidative stability of fresh patties during refrigerated storage. **Foods**, v. 8, n. 12, p. 614, 2019.

VENKATACHALAM, K.; LEKJING, S. A chitosan-based edible film with clove essential oil and nisin for improving the quality and shelf life of pork patties in cold storage. **RSC Advances**, v. 10, n. 30, p. 17777–17786, 2020.

VENKATACHALAM, K.; RAKKAPAO, N.; LEKJING, S. Physicochemical and Antimicrobial Characterization of Chitosan and Native Glutinous Rice Starch-Based Composite Edible Films: Influence of Different Essential Oils Incorporation. **Membranes**, v. 13, n. 2, p. 161, 2023.

WANG, Z. *et al.* Effects of malondialdehyde as a byproduct of lipid oxidation on protein oxidation in rabbit meat. **Food Chemistry**, v. 288, p. 405–412, 2019.

WANG, D. *et al.* Incorporation of apricot (*Prunus armeniaca*) kernel essential oil into chitosan films displaying antimicrobial effect against *Listeria monocytogenes* and improving quality indices of spiced beef. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 838–844, 2020.

WATERHOUSE, A. L. Determination of Total Phenolics. *In*: CURRENT PROTOCOLS IN FOOD ANALYTICAL CHEMISTRY. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2002. v. 6, p. I1.1.1-I1.1.8.

WEGRZYNOWSKA-DRZYMALSKA, K. *et al.* Chitosan-Gelatin Films Cross-Linked with Dialdehyde Cellulose Nanocrystals as Potential Materials for Wound Dressings. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 9700, 2022.

WENG, W.; ZHENG, H.; SU, W. Characterization of edible films based on tilapia (*Tilapia zillii*) scale gelatin with different extraction pH. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 19–26, 2014.

WU, H. *et al.* Development and characterization of antioxidant composite films based on starch and gelatin incorporating resveratrol fabricated by extrusion compression moulding. **Food Hydrocolloids**, v. 139, p. 108509, 2023.

WU, J. *et al.* The preparation, characterization, antimicrobial stability and invitro release evaluation of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil nanoliposomes. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 427–435, 2015.

XU, X. *et al.* Chemical compositions of propolis from China and the United States and their antimicrobial activities against penicillium notatum. **Molecules**, v. 24, n. 19, p. 3576, 2019.

YAHAYA, W. A. W. *et al.* Antioxidant Activities and Total Phenolic Content of Malaysian Herbs as Components of Active Packaging Film in Beef Patties. **Antioxidants**, v. 8, n. 7, p. 204, 2019.

YAN, J. *et al.* Effects of anthocyanin-rich *Kadsura coccinea* extract on the physical, antioxidant, and pH-sensitive properties of biodegradable film. **Food Biophysics**, v. 1, p. 1–11, 2022.

YILDIRIM, H. K. Assessment of Propolis Treated by Different Extraction Methods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 65, p. e22210251, 2022.

ZARDO, I. *et al.* Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Sunflower Seed Cake Using Response Surface Methodology. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 1, p. 33–44, 2019.

ZHANG, Q. *et al.* Development, Physicochemical Properties, and Antibacterial Activity of Propolis Microcapsules. **Foods**, v. 12, n. 17, p. 3191, 2023.

ZHANG, X. *et al.* Physico-mechanical and antioxidant properties of gelatin film from rabbit skin incorporated with rosemary acid. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 19, p. 121–130, 2019.

ZHANG, X. *et al.* Plant extracts such as pine nut shell, peanut shell and jujube leaf improved the antioxidant ability and gas permeability of chitosan films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 148, p. 1242–1250, 2020.

ZHAO, P. *et al.* Effect of Pickering emulsion on the physical properties, microstructure and bioactivity of corn starch/cassia gum composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 141, p. 108713, 2023.