

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Desenvolvimento e Otimização de um Filme Biodegradável à
base de Proteína do Tremoço (*Lupinus angustifolius*)

Ana Margarida Calvinho Cerveira Almiro e Castro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Molecular e Microbiana

Dissertação orientada por:

Professora Doutora Maria Margarida Cortez Vieira

Professor Doutor Rui Cruz

Faro, 2015

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Desenvolvimento e Otimização de um Filme Biodegradável à
base de Proteína do Tremoço (*Lupinus angustifolius*)

Ana Margarida Calvinho Cerveira Almiro e Castro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Molecular e Microbiana

Dissertação orientada por:

Professora Doutora Maria Margarida Cortez Vieira

Professor Doutor Rui Cruz

Faro, 2015

Desenvolvimento e Otimização de um Filme Biodegradável à base de Proteína do Tremoço (*Lupinus angustifolius*)

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Ana Margarida Calvinho Cerveira Almiro e Castro

Copyright © Ana Margarida Calvinho Cerveira Almiro e Castro

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Antes de mais, quero agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Margarida Vieira, por me ter dado a oportunidade de trabalhar numa área um pouco diferente da minha e me ter apoiado e ensinado várias coisas.

Um grande obrigada também ao meu coorientador, Professor Doutor Rui Cruz, por toda a sua disponibilidade e paciência. Sem a sua ajuda, este trabalho não teria corrido da mesma maneira.

Aos meus pais, um **obrigada gigante** por me darem a oportunidade de seguir o meu sonho e apoiarem-me sempre em tudo o que faço!! Sem vocês, nunca conseguiria ter as oportunidades que tive, tenho e terei na minha vida!

À minha querida irmã que, apesar de a sua área ser completamente diferente da minha, me conseguiu ajudar dando-me força e apoio moral para acreditar em mim mesma!

À minha querida tia Teresa Cerveira Borges que, desde o início, sempre me ajudou imenso, me encaminhou em todas as situações e sempre teve a paciência para me ajudar não só na tese como em todo o mestrado.

Um muito obrigada a todo o pessoal do laboratório, em especial à Vera Alves, Tânia Mateus e Romilson Brito, por me proporcionarem um bom ambiente de trabalho e uma ótima companhia. Sem a vossa companhia e apoio, as coisas não teriam corrido tão bem como correram!!

À Engenheira Clárisse Ramalho, Engenheira Vera Gonçalves e Sra. D. Luísa, o meu sincero agradecimento por todas as conversas e risos que partilharam comigo e à Sílvia e Engenheira Neusa Rodrigues por me terem apoiado e ajudado bastante no laboratório de microbiologia.

Ao Billy, Vilma, Vanessa Afonso, Rita, Pedro, Ana Raposo e Fábio, estou super feliz por vos ter conhecido! Encheram mais um pouco a minha vida. Gosto muito de vocês. Obrigada por estes dois anos!

A todos meus amigos de Lisboa que, apesar da distância, sempre me apoiaram e me deram toda a força para terminar. Obrigada, mesmo!!

À Vânia Bruno por, mais uma vez, se demonstrar sempre disponível para me ajudar e conseguir compreender-me tão bem!!

Resumo

Os consumidores atuais, preocupando-se com o ambiente e a saúde humana, preferem materiais de embalagem biológicos. Estes, desenvolvidos através da investigação, devem substituir as poliolefinas na indústria de embalagens. O objetivo deste estudo foi desenvolver um filme de embalagem alimentar baseado em proteína isolada de tremçoço (PIT) com propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Para otimizar a composição do filme, usou-se a metodologia de superfície de resposta (MSR) e um *design* de mistura, sendo as variáveis independentes: % PIT, (x_1); % glicerol, (x_2) e % de água, (x_3). Foram medidas 6 respostas: L (Y_1), a (Y_2), b (Y_3); espessura (Y_4); força de punção (Y_5) e teor de humidade (Y_6), originando 6 modelos polinomiais. Através de otimização numérica, obteve-se a melhor composição: 8,98 % PIT, 6,88 % glicerol e 84,15 % água. A validação experimental revelou que Y_2 e Y_4 , eram significativamente diferentes dos valores previstos, sendo o filme mais fino e amarelado.

As atividades antioxidantes e antimicrobiana do filme otimizado foram seguidamente avaliadas e, como o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* não foi inibido, adicionou-se carvacrol à solução formadora do filme repetindo-se os testes de atividade antimicrobiana e antioxidante. As propriedades foram também avaliadas no filme PIT, no filme com carvacrol (FCC) e nas soluções com (SCC) e sem carvacrol (SSC). SCC inibiu todos os microrganismos, enquanto o filme com carvacrol inibiu todos menos a *Pseudomonas aeruginosa*. Os compostos fenólicos totais, flavonoides e capacidade antioxidante do filme foram, respetivamente, 307,41 mg EAG/100 g PIT, 20,56 mg EQ/100 g PIT e 9,38 mmol ET/100g PIT não se verificando diferenças significativas entre a SSC e o filme de PIT. Estes valores aumentaram consideravelmente na SCC e no FCC.

Neste estudo foi possível desenvolver um filme de embalagem de PIT, amarelo, com atividade antioxidante relativamente baixa e sem atividade antimicrobiana, requerendo adição de um agente antimicrobiano que irá aumentar a sua atividade antioxidante.

Palavras-chave: Proteína isolada do tremçoço, filmes biodegradáveis, metodologia de superfície de resposta, propriedades físico-mecânicas, antioxidantes e antimicrobianas.

Abstract

Modern demanding consumers, concerned with the environment and human health, seek for biobased packaging materials. These, developed by many researchers, should replace soon polyolefin derivatives in the food packaging industry. The objective of this study was to develop a lupin protein isolate (LPI) based food packaging film with anti-oxidant and anti-microbial properties.

To optimize the film's composition a Response Surface Methodology (RSM) was used along with a mixture design, being the independent variables: % LPI, x_1 ; % glycerol, x_2 and % water, x_3 . Six responses were measured: L (Y_1), a (Y_2), b (Y_3); thickness (Y_4); puncture strength (Y_5) and moisture content (Y_6) originating six polynomial models. Through numerical optimization, the best film composition was: 8.98 % LPI, 6.88 % glycerol and 84.15 % water. Experimental validation revealed that Y_2 , and Y_4 , were significantly different from the predicted values, being the film yellower and thinner.

The antioxidant and antimicrobial activities of the optimized film were next evaluated and, as no growth inhibition was observed for *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, to the film-forming solution carvacrol was added and the anti-microbial and anti-oxidant activity tests were repeated. LPI film, film with carvacrol and the film-forming solutions with and without carvacrol, also underwent the same tests. Solution with carvacrol inhibited all microorganisms, whereas in the film with carvacrol all but *P. aeruginosa* were inhibited. LPI's total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant capacity were, respectively, 307.41 mg GAE/100g LPI, 20.56 mg QE/100g LPI and 9.38 mmol TE/100g LPI, and no significant differences were shown in solution without carvacrol and lupin film. These values increased largely in solution and film with carvacrol.

This study proved that the development of a LPI packaging yellow film is possible, with a relatively low antioxidant activity and no antimicrobial activity, requiring addition of an antimicrobial agent that will also enhance its antioxidant activity.

Key-words: Lupin protein isolate, biodegradable films, response surface methodology, physical-mechanical properties, and antimicrobial properties.

Abreviaturas

° C – Graus Celsius
µl – Microlitro
µm - Micrómetro
AAM – Atividade antimicrobiana
AG – Ácido Gálico
AOX – Antioxidantes
CAOX – Capacidade antioxidante
CFT – Compostos Fenólicos Totais
CMC – Carboximetil Celulose
CO₂ – Dióxido de Carbono
DOE – Design de Experiências
EA – Embalagem Ativa
EAC – Equivalente ao ácido caféico
EAF – Equivalente ao ácido ferrúlico
EAG – Equivalente ao ácido gálico
EC – Equivalente à catequina
EQ – Equivalente à quercetina
ET – Equivalente ao trolox
EV – Equivalente à vitexina
FCC – Filme com carvacrol
Flav - Flavonoides
FSC – Filme sem carvacrol
FP – Força de Punção
g – Grama
LPI – Lupine protein isolate
mg – Miligrama
ml – Mililitro
mM – Milimolar
mmol – Milimol
MS – Metabolitos secundários
MSR – Metodologia de Superfície de Resposta
N₂ – Azoto
O₂ – Oxigénio
PIT – Proteína isolada do tremçoço
SCC – Solução com carvacrol
SSC – Solução sem carvacrol
T – Trolox
TH – Teor de humidade
TSA – Tryptic Soy Agar
YM Agar – Yeast Malt Agar

Lista de tabelas

Tabela	Título	Página
2.1	Limites mínimos e máximos de cada componente.	24
2.2	<i>Design</i> de mistura dos componentes.	25
2.3	<i>Design</i> para avaliação do modelo quadrático.	25
2.4	Valores atribuídos a cada resposta.	28
2.5	ANOVA do ajuste do modelo para todas as respostas.	29
2.6	Modelos previstos para as respostas.	29
2.7	Mínimos e máximos para cada resposta, na otimização.	31
2.8	Composição ótima do filme e valores correspondentes a cada resposta e de desejabilidade.	32
3.1	CFT, flavonoides e CAOX na PIT.	44
3.2	Atividade antimicrobiana da PIT, SSC, SCC, FSC e FCC nos três microrganismos.	49
A1	Média e desvio-padrão de cada resposta.	69
A2	Fórmulas para saber o teor de CFT, Flav e CAOX em PIT e nos filmes.	69
A3	Fórmula para saber o teor de CFT, Flav e CAOX na SSC e SCC.	69

Lista de figuras

Figura	Título	Página
1.1	Evolução da produção de plásticos no Mundo e Europa.	3
1.2	Tratamento dos plásticos após o seu uso.	4
1.3	Percentagem de uso de plásticos em diferentes sectores.	5
1.4	Estrutura molecular do carvacrol.	10
1.5	Escala da cor Hunter L,a,b.	13
1.6	Efeito do aumento da temperatura no aumento da cristalinidade do polímero à base de proteína.	16
1.7	<i>Lupinus angustifolius</i> .	18
1.8	Esquematização do trabalho realizado.	21
2.1	Erro-padrão do <i>design</i> em estudo.	26
2.2	Superfície de resposta relativa às respostas <i>L</i> , <i>b</i> , espessura, FP e TH.	30
2.3	Superfície de resposta da composição ótima do filme.	32
2.4	Filme à base de proteína isolada do tremçoço obtido experimentalmente.	33
2.5	Parâmetro <i>L</i> obtido experimentalmente e previsto pelo modelo.	33
2.6	Parâmetro <i>b</i> obtido experimentalmente e previsto pelo modelo.	34
2.7	Parâmetro espessura obtido experimentalmente e previsto pelo modelo.	34
2.8	Parâmetro TH obtido experimentalmente e obtido pelo modelo.	35
2.9	FP do filme experimental e o previsto pelo modelo.	35
3.1	CFT (mg EAG/100 ml de solução) nas soluções.	45
3.2	CFT (mg EAG/100 g de filme) nos filmes.	46
3.3	Flavonoides (mg EQ/100 ml de solução) nas soluções.	46
3.4	Flavonoides (mg EQ/100 g de filme) nos filmes.	47
3.5	CAOX (mmol ET/100 ml de solução) nas soluções.	48
3.6	CAOX (mmol ET/100 g de filme) nos filmes.	48
3.7	Atividade antimicrobiana da PIT nos três microrganismos.	54
3.8	Atividade antimicrobiana da SSC nos três microrganismos.	54
3.9	Atividade antimicrobiana do SCC nos três microrganismos.	55
3.10	Atividade antimicrobiana do FSC nos três microrganismos.	55
3.11	Atividade antimicrobiana do FCC nos três microrganismos.	56
A1	Curva de calibração para os CFT em PIT.	70
A2	Curva de calibração para os flavonoides em PIT.	70

A3	Curva de calibração para a CAOX em PIT.	71
A4	Curva de calibração para os CFT em SSC.	71
A5	Curva de calibração para os CFT em SCC.	72
A6	Curva de calibração para os CFT em FSC.	72
A7	Curva de calibração para os CFT em FCC.	73
A8	Curva de calibração para os flavonoides em SSC.	73
A9	Curva de calibração para os flavonoides em SCC.	74
A10	Curva de calibração para os flavonoides em FSC.	74
A11	Curva de calibração para os flavonoides em FCC.	75
A12	Curva de calibração para a CAOX em SSC.	75
A13	Curva de calibração para a CAOX em SCC.	76
A14	Curva de calibração para a CAOX em FSC.	76
A15	Curva de calibração para a CAOX em FCC.	77

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Abreviaturas	IV
Lista de tabelas	V
Lista de figuras	VI
1. Introdução	1
1.1. Plásticos sintéticos	1
1.2. Problemas causados pelos plásticos/embalagens sintéticas.....	2
1.3. Polímeros biodegradáveis (biopolímeros)	6
1.3.1. Biodegradação.....	6
1.4. Embalagens ativas.....	7
1.5. Propriedades dos filmes.....	11
1.5.1. Propriedades mecânicas	11
1.5.2. Propriedades de barreira	11
1.5.3. Propriedades óticas	12
1.6. Filmes biodegradáveis.....	13
1.6.1. Filmes à base de polissacáridos.....	13
1.6.2. Filmes à base de lípidos	14
1.6.3. Filmes compósitos	15
1.6.4. Filmes à base de proteínas	15
1.7. Procura de novas matérias-primas para a base de filmes poliméricos	18
1.7.1. Composição química do tremçoço	19
1.7.2. Uso comercial	19
1.7.3. Proteína isolada do tremçoço.....	20
1.8. Objetivos	20
2. Desenvolvimento e otimização do filme através da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)	22
2.1. Introdução.....	23
2.2. Materiais e Métodos	23
2.2.1. <i>Design</i> de mistura.....	23
2.2.2. Produção dos filmes para otimização	26
2.2.3. Caracterização Físico-Mecânica dos filmes.....	26
2.2.3.1. <i>Cor</i> ($L - Y_1$, $a - Y_2$ e $b - Y_3$)	26

2.2.3.2.	<i>Espessura (e, Y₄)</i>	27
2.2.3.3.	<i>Força de Punção (FP, Y₅)</i>	27
2.2.3.4.	<i>Teor de humidade (TH, Y₆)</i>	27
2.2.4.	Análise estatística	27
2.3.	Resultados.....	27
2.3.1.	Modelos de previsão de resposta.....	27
2.3.2.	Otimização	31
2.4.	Validação experimental	32
2.4.1.	Cor	33
2.4.2.	Espessura e Teor de Humidade	34
2.4.3.	Força de Punção	35
2.5.	Discussão.....	36
2.6.	Conclusões.....	38
3.	Caracterização das propriedades antioxidantes e antimicrobianas da solução formadora de filme e filme de PIT e carvacrol	39
3.1.	Introdução.....	40
3.2.	Materiais e Métodos	41
3.2.1.	Preparação das amostras	41
3.2.2.	Propriedades antioxidantes	42
3.2.3.	Propriedades antimicrobianas	43
3.2.4.	Análise estatística	44
3.3.	Resultados.....	44
3.3.1.	Compostos fenólicos totais	44
3.3.2.	Flavonoides	46
3.3.3.	Capacidade antioxidante	47
3.3.4.	Atividade antimicrobiana.....	49
3.4.	Discussão.....	49
3.5.	Conclusões.....	56
4.	Conclusões gerais	57
5.	Perspetivas de trabalhos futuros	58
6.	Referências bibliográficas.....	58
7.	Anexos	69

1. Introdução

1.1. Plásticos sintéticos

A indústria de plásticos é muito importante em diferentes indústrias, nomeadamente têxtil, construção e alimentar (PlasticsEurope, 2015).

O termo “plástico” aplica-se a materiais que possuem capacidade de se moldarem, fundirem ou serem usados como revestimento. Os plásticos são feitos a partir de polímeros sintéticos com a adição de produtos químicos (e.g.: aditivos, estabilizadores, corantes, entre outros), sendo adquiridos através da polimerização de monómeros derivados do petróleo (Petersen *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2009).

Nos últimos 20 anos, vários plásticos sintéticos como o polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), poliamida (PA), polietileno tereftalato (PET) e policloreto de vinilo (PVC) têm vindo a ser produzidos e utilizados como embalagens por possuírem diversas vantagens, tais como terem um baixo custo, serem leves (facilitando o seu transporte), moldáveis, duráveis, oferecerem boa flexibilidade, transparência, terem resistência à corrosão, terem propriedades de isolamento térmico, possuírem boas propriedades mecânicas (e.g.: tensão, resistência ao corte) e constituírem boas barreiras contra o oxigénio e o dióxido de carbono (Siracusa *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2009; Guzman *et al.*, 2011; Malathi *et al.*, 2014).

Na indústria alimentar, o uso de embalagens é muito importante e tem como principais funções proteger os alimentos contra riscos presentes no ambiente que o rodeia, que podem ser de várias índoles: biológicos, químicos e físicos, preservando a qualidade e segurança dos alimentos durante o seu armazenamento e contribuindo para o prolongamento do seu tempo de vida útil (Petersen *et al.*, 1999; Marsh & Bugusu, 2007; Leceta *et al.*, 2013).

Risco biológico: as embalagens conseguem fornecer barreiras contra vários microrganismos (e.g.: bactérias, fungos e vírus), insetos, roedores e outros animais, evitando o aparecimento de doenças e a deterioração do alimento, enquanto controlam o seu amadurecimento e envelhecimento. Estas barreiras existem para que não ocorra qualquer contato entre o meio ambiente e o alimento, nem transmissão de odores, existindo um equilíbrio no meio interno da embalagem.

Risco químico: a proteção química que as embalagens oferecem, diminui as alterações de composição que possam ser influenciadas pelo meio ambiente (e.g.: gases, humidade ou luz).

Apesar de as embalagens de plástico possuírem várias propriedades barreira, conseguem ser mais permeáveis do que, por exemplo, as embalagens de vidro ou metal.

Risco físico: a proteção física está relacionada com os danos mecânicos (como, por exemplo, impactos e esmagamentos) que possam ocorrer durante o transporte/distribuição e o manuseamento do produto.

1.2. Problemas causados pelos plásticos/embalagens sintéticas

Como os plásticos sintéticos são constituídos maioritariamente por poliolefinas, possuem uma capacidade de degradação muito lenta, chegando a levar cerca de 1000 anos a degradar-se, contribuindo para a emissão de gases prejudiciais a todos os ecossistemas (Rosa *et al.*, 2001; Heap, 2009).

Desde os anos 50 que a produção de plásticos aumentou, aproximada e globalmente, 10% todos os anos, sendo que, em 2009, este aumento passou de 0.5 a 260 milhões de toneladas com mais de 500 bilhões de sacos de plástico distribuídos e menos de 3% a serem reciclados, todos os anos (Heap, 2009).

Com um crescimento contínuo há mais de 50 anos, a produção mundial de plásticos aumentou, em 2013, para 299 milhões de toneladas, enquanto em 2012, a produção foi de 288 milhões de toneladas, ou seja, neste período ocorreu um aumento de, aproximadamente, 4%. Pelo contrário, na Europa a produção de plásticos estabilizou nos anos 2012 e 2013 (57 milhões de toneladas), apesar de, em 2007, a produção ter aumentado consideravelmente (65 milhões de toneladas) e em 2009 ter ocorrido um decréscimo para 55 milhões de toneladas (Figura 1.1).

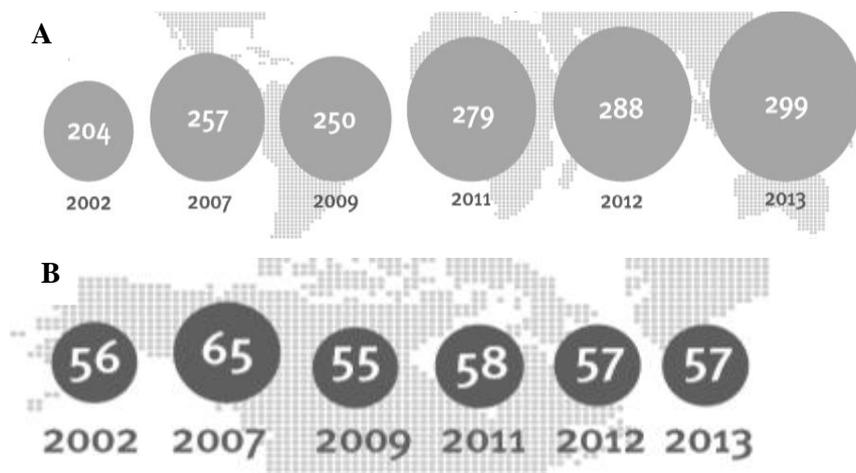


Figura 1.1. Evolução da produção de plásticos entre 2002 a 2013 no Mundo A) e na Europa B) (PlasticsEurope, 2015).

Em 2012, cerca de 25 milhões de toneladas de resíduos de plásticos usados foram para lixeiras. Dos plásticos usados, 62% foram recuperados, dos quais 26% foram utilizados para processos de reciclagem e os restantes 36% para processos de recuperação de energia. Por sua vez, 38% do total de plásticos usados, foram depositados em aterros (Figura 1.2).

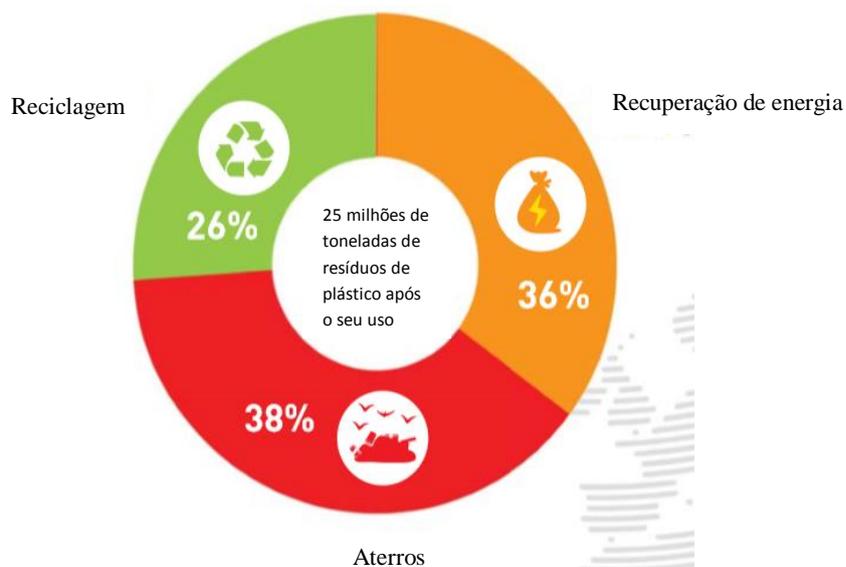


Figura 1.2. Tratamento dos plásticos após o seu uso (PlasticsEurope, 2015).

Na Europa, o setor que mais necessita de plásticos é o de aplicações em embalagens para alimentos (figura 1.3), representando 39.6% da procura total; na construção civil há uma procura de 20.3%; os aparelhos domésticos, produtos de consumo, produtos médicos e móveis, compreendem 21.7% do uso de plásticos; a indústria automóvel compreende uma percentagem de 8.5%; as aplicações elétricas e eletrónicas representam 5.6% da procura total de plásticos e, por fim, as aplicações agrícolas possuem uma quota de 4.3% (PlasticsEurope, 2015).

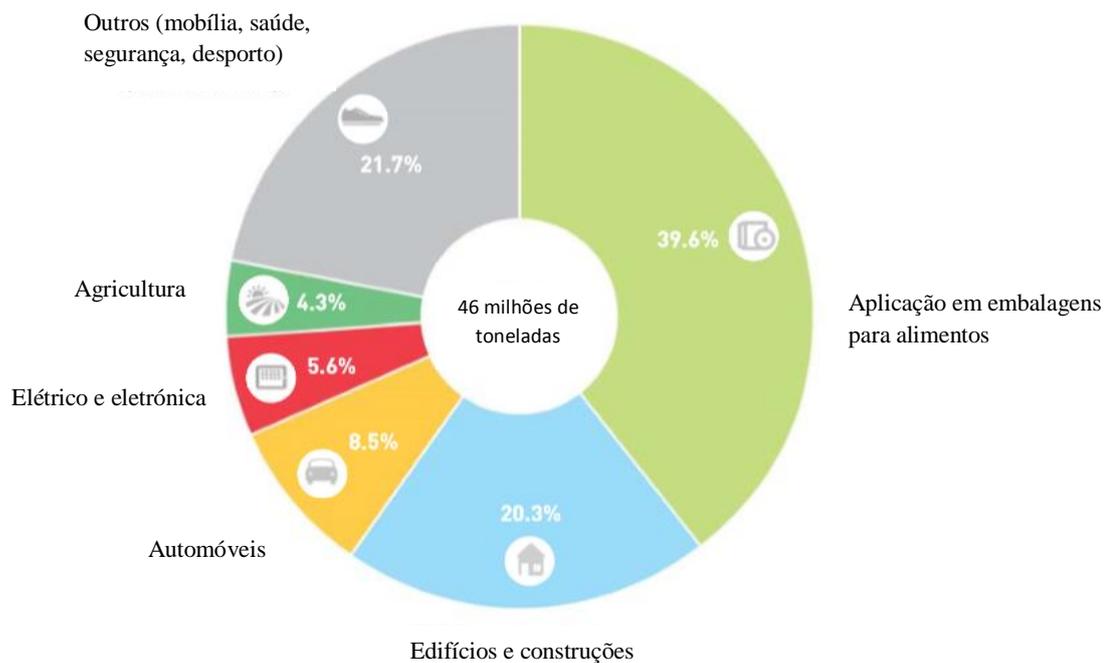


Figura 1.3. Percentagem de uso de plásticos em diferentes setores (PlasticsEurope, 2015).

A indústria do plástico, por estar muito dependente do petróleo, pode sofrer repercussões económicas negativas no mercado quando o preço do petróleo aumenta (Siracusa *et al.*, 2008; Leceta *et al.*, 2013).

Hoje em dia, o uso de plásticos derivados de poliofelinias deve ser limitado devido ao fato de estes não serem totalmente recicláveis e/ou biodegradáveis (Sorrentino *et al.*, 2007). Muitas embalagens podem conter restos de alimentos e, por isso, não se consegue fazer a sua reciclagem, o que leva a que milhares de toneladas de plásticos sejam depositadas em aterros, aumentando todos os anos o número de resíduos no meio ambiente. Dado muitas vezes existirem problemas na reciclagem das embalagens e estas possuírem um tempo de vida curto, a quantidade de resíduos de embalagens é semelhante à quantidade de embalagens existente no mercado (Leceta *et al.*, 2013).

1.3. Polímeros biodegradáveis (biopolímeros)

As causas ambientais negativas, provenientes do uso excessivo de embalagens derivadas das poliolefinas, aumentam cada vez mais a necessidade de se começar a usar recursos renováveis (García *et al.*, 2004).

A grande alternativa provém do desenvolvimento de filmes de polímeros feitos a partir de recursos renováveis (e.g.: sub-produtos agrícolas e de pesca), que têm um ciclo de vida mais curto do que os recursos fósseis (e.g.: petróleo). Estes podem ser obtidos através de: 1) matérias-primas naturais (amido, celulose e proteína); 2) síntese química de monómeros bio-derivados (polilactato); e 3) polímeros produzidos naturalmente por microrganismos (polihidroxibutirato polihidroxivalerato) (Petersen *et al.*, 1999; Brito *et al.*, 2011) sendo, normalmente, designados por biopolímeros.

A pesquisa sobre possíveis usos destes recursos para produzir polímeros biodegradáveis com diversas propriedades, irá, não só, fornecer valor económico como, também, diminuir a poluição (Krochta & De Mulder-Johnson, 1997; García *et al.*, 2004).

Apesar de estes biopolímeros apresentarem grandes vantagens a nível ambiental, também podem melhorar a qualidade dos alimentos (Wihodo & Moraru, 2013) tanto a nível das propriedades organolépticas (e.g.: cor, textura, sabor, odor, entre outros) como funcionais, através da introdução de aditivos como antioxidantes (AOX), agentes anti-escurecimento, intensificadores de textura, sabor, cor (Olivas & Barbosa-Cánovas, 2005; Rojas-Graü *et al.*, 2009) e agentes antimicrobianos (Rubilar *et al.*, 2013a,b; Wihodo & Moraru, 2013).

Relativamente à introdução de agentes antimicrobianos nos filmes, o principal objetivo é criar, no interior da embalagem, um ambiente propício ao atraso ou impedimento do crescimento de microrganismos na superfície do produto, aumentando, assim, o tempo de prateleira dos alimentos embalados (Wihodo & Moraru, 2013).

1.3.1. Biodegradação

Devido à sua durabilidade, resistência à degradação e ao ataque de microrganismos, as poliolefinas tendem a permanecer no meio ambiente por muito tempo após o seu uso e muitas aves marinhas e mamíferos, morrem todos os anos por ingeri-los (Rosa *et al.*, 2001; Guzman *et al.*, 2011). Nos últimos 10 anos, vários plásticos biodegradáveis têm sido introduzidos no mercado embora, atualmente, o plástico biodegradável represente apenas um pequeno mercado, quando comparado com o mercado dos plásticos convencionais (Shah *et al.*, 2008).

Para vários autores (e.g.: Nolan-ITU, 2002; Rudnik, 2008; Brito *et al.*, 2011), a "biodegradabilidade" dos plásticos depende não só das matérias-primas usadas, como, também, da estrutura química do material e da constituição final do produto. De acordo com os diferentes mecanismos de degradação, os polímeros podem ser considerados como: 1) Compostáveis; 2) Fotobiodegradáveis; 3) Bioerodíveis; e 4) Biodegradáveis.

Compostáveis: a compostagem de resíduos orgânicos é um dos métodos de reciclagem mais antigo. Neste processo, a matéria orgânica é transformada em fertilizante orgânico, acabando por ser uma solução tanto a nível ambiental como a nível agrícola, proporcionando o retorno da matéria orgânica e nutrientes ao solo (Jahnel *et al.*, 1999).

Fotobiodegradáveis: um plástico fotobiodegradável é um plástico capaz de se deteriorar com a luz solar, tendo a capacidade de se decompor mais rapidamente que o plástico comum (Giesse, 2003).

Bioerodíveis: vários polímeros degradam-se sem a ação de microrganismos e podem estar incluídos processos como a dissolução em água, envelhecimento pelo calor ou envelhecimento pela luz ultravioleta.

Biodegradáveis: a biodegradação é o tipo de degradação causada pela atividade biológica, principalmente pela ação enzimática de vários microrganismos (bactérias, algas, fungos), que visa romper ligações químicas da cadeia principal do polímero, levando a mudanças na sua estrutura química. Para que tal ocorra, é necessário que existam condições favoráveis para a sobrevivência destes microrganismos (e.g.: temperatura, humidade, pH e disponibilidade de oxigénio). A biodegradação pode ocorrer na presença ou ausência de oxigénio.

1.4. Embalagens ativas

As embalagens para alimentos tornaram-se muito importantes nos dias de hoje e, embora as embalagens convencionais tenham contribuído bastante para a distribuição dos produtos, já não permitem uma resposta tão adequada às necessidades dos consumidores, pelo fato de estes darem preferência a produtos mais naturais e com menos conservantes (Soares *et al.*, 2008).

Nesse sentido, começaram-se a desenvolver novas tecnologias de embalagens, que têm como objetivo aumentar o tempo de prateleira dos alimentos, mantendo a sua segurança e qualidade (Dainelli *et al.*, 2008).

A embalagem ativa (EA) é um novo termo onde a embalagem, o produto e o meio ambiente conseguem interagir e prolongar o tempo de prateleira ou até melhorar as propriedades do produto (Suppakul *et al.*, 2003). Em oposição às embalagens sintéticas, as EA têm a capacidade

de alterar a composição e as características sensoriais dos alimentos (Dobrucka & Cierpiszewski, 2014). Também se pode referir a EA quando há adição de aditivos como AOX, agentes antimicrobianos, ácidos orgânicos, enzimas, extratos naturais, iões, etanol, entre outros (Dainelli *et al.*, 2008; Dobrucka & Cierpiszewski, 2014). De acordo com vários autores (e.g.: Brody *et al.*, 2001; Suppakul *et al.*, 2003; Dobrucka & Cierpiszewski, 2014), estas embalagens possuem a capacidade de:

- a) Eliminar o oxigénio,
- b) Controlar a humidade,
- c) Absorver/libertar odores e sabores,
- d) Gerar/absorver dióxido de carbono,
- e) Eliminar/controlar o etileno,
- f) Libertar agentes AOX,
- g) Libertar agentes antimicrobianos.

Eliminação do oxigénio: o O₂ é muito importante para os seres vivos mas também é considerado como um dos fatores mais importantes na degradação dos alimentos. Através de reações de oxidação, o O₂ pode alterar vários parâmetros de qualidade dos alimentos e bebidas, tais como: o sabor, o odor e a cor e ainda promover: a descoloração dos pigmentos de frutas, a destruição de vários nutrientes e o crescimento de vários microrganismos (e.g.: bactérias aeróbicas e bolores) (Brody *et al.*, 2001; Suppakul *et al.*, 2003; Kerry *et al.*, 2006). As EA mais usadas no mercado são as que conseguem remover o O₂ do interior da embalagem. Os eliminadores de O₂ agem rapidamente, eliminando grandes volumes deste gás e atuam enquanto o eliminador estiver presente (Brody *et al.*, 2001).

O O₂ existente no interior da embalagem pode ser removido através: a) da selagem com aplicação de vácuo, b) de gás inerte inserido na embalagem (N₂, CO₂); c) ou ambos, em que mais de 90% do O₂ é removido (Prasad & Kochhar, 2014). Para além desta tecnologia existem quelantes de ferro, onde este promove a oxidação dos alimentos (Kerry *et al.*, 2006).

Controlo de humidade: a perda de água nos alimentos frescos pode ocorrer através da evaporação a partir do produto, seguida da infiltração através da embalagem, quando esta não proporciona uma boa barreira contra o vapor de água. Quando ocorre humificação da superfície do produto, os nutrientes solúveis existentes são dispersos na água, podendo resultar na sua perda e no crescimento de vários fungos (Brody *et al.*, 2001). Existem diferentes maneiras de se manter baixa a humidade relativa em torno dos alimentos, usando silicatos (e.g.: gel de sílica), óxido de cálcio e argilas naturais. Este controlo da humidade tem como principal objetivo reduzir a condensação que ocorre no interior das embalagens, reduzindo, assim, o

crescimento de fungos na superfície dos alimentos e prolongando o tempo de prateleira (Brody *et al.*, 2001; Suppakul *et al.*, 2003).

Absorção e libertação de odores: a adição de essências e odores pode aumentar a desejabilidade do produto por parte do consumidor, quando a embalagem é aberta, tanto no que respeita ao aroma como ao sabor. Estes sabores e aromas são libertados lentamente no produto embalado durante o armazenamento (Prasad & Kochhar, 2014) e a sua remoção no interior das embalagens, pode ser prejudicial visto poder remover componentes desejáveis do alimento (Brody *et al.*, 2001; Almenar *et al.*, 2009). A principal função da embalagem é impedir que ocorra a perda de aromas ou sabores dos produtos, apesar de poderem existir pequenos odores de deterioração, tais como compostos sulfurosos, resultantes da quebra de proteína/aminoácido ou compostos de acetona (devido à oxidação de lípidos), que podem ser formados durante o transporte do produto. Como esses odores ficam aprisionados, quando a embalagem é aberta esses gases são libertados e detetados pelo consumidor. Apesar de o carvão ter cor preta, pode libertar algum ou praticamente todo o odor absorvido anteriormente, sendo considerado o absorvente mais popular visto ser eficaz a um preço acessível (Brody *et al.*, 2001).

Absorção e libertação de dióxido de carbono: o CO₂ impede ou atrasa o crescimento microbiano quando presente em níveis elevados (60-80%), prolongando o tempo de vida dos alimentos. Mas, apesar desta vantagem, os altos níveis de CO₂ nos alimentos podem provocar mudanças no seu sabor (Kerry *et al.*, 2006). Embora o óxido de ferro absorva melhor o O₂, também consegue absorver o CO₂ (Brody *et al.*, 2001).

Eliminação/controlo de etileno: vários frutos e vegetais libertam etileno após a sua colheita (Terry *et al.*, 2007; Prasad & Kochhar, 2014). Este gás promove e acelera o amadurecimento dos frutos, degrada as clorofilas e leva à deterioração das frutas e vegetais (Brody *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2009). Um dos agentes eliminadores de etileno é o permanganato de potássio, que faz a oxidação do etileno para CO₂ (Abe & Watada, 1991); outro mecanismo é o uso de materiais que absorvem o etileno como, por exemplo, o paládio (Smith *et al.*, 2009).

Agentes AOX: a oxidação de lípidos é um dos mecanismos que levam à deterioração de alimentos com elevado teor de lípidos, promovendo o crescimento de microrganismos. A oxidação reduz o tempo de prateleira dos alimentos, devido à existência de alterações na textura, sabor/odor, funcionalidade e qualidade nutricional.

Os AOX são adicionados aos alimentos, com o propósito de retardar o início ou de reduzir a taxa de oxidação do produto. Existem vários AOX sintéticos usados vulgarmente na indústria alimentar, mas o consumidor atual prefere AOX naturais, por serem mais seguros (Pereira *et al.*, 2010; Contini *et al.*, 2011).

Agentes antimicrobianos: a contaminação microbiana é a principal razão para a deterioração dos alimentos (Quintavalla & Vicini, 2002; Sung *et al.*, 2013). Durante muitos anos a fermentação, secagem, adição de agentes antimicrobianos (ácidos orgânicos, plantas e sais), congelamento, refrigeração, atmosfera modificada, tratamento com calor e irradiação têm vindo a ser usados para inibir/retardar o crescimento microbiano (Quintavalla & Vicini, 2002; Zhou *et al.*, 2010). Hoje em dia, existe um grande número de agentes antimicrobianos (e.g.: etanol, antibióticos, óleos essenciais, especiarias, fungicidas, desinfetantes, compostos fenólicos, entre outros; Coma, 2008; Sung *et al.*, 2013) que podem ser adicionados às embalagens.

A ação dos compostos antimicrobianos sobre as membranas celulares dos microrganismos, afetam o seu arranjo lipídico e, conseqüentemente, a estabilidade das bicamadas lipídicas. A integridade das membranas é assim ameaçada, facilitando a entrada de prótons através destas (Arfa *et al.*, 2006). De acordo com Weber and de Bont (1996), os compostos mais tóxicos são os compostos hidrofóbicos, sendo a membrana citoplasmática o primeiro local de ação. Estes compostos possuem grande afinidade às membranas, provocando mudanças nas suas propriedades físico-químicas, começando este efeito a ser sentido quando o seu coeficiente de partição octanol/água (logP) for superior a 3 (Arfa *et al.*, 2006). Entre os compostos fenólicos, o carvacrol (figura 1.4), encontrado no óleo essencial do orégão e do tomilho, foi reportado por possuir uma atividade antimicrobiana muito forte (Roller and Seedhar, 2002) devido: 1) ao fato de possuir hidrofobicidade suficiente, que permite a sua penetração e acumulação na membrana celular e 2) por possuir um sistema de elétrons deslocalizado, permitindo ao seu grupo hidroxilo trocar o seu próton, conferindo-lhe, assim, um elevado efeito tóxico (Arfa *et al.*, 2006).

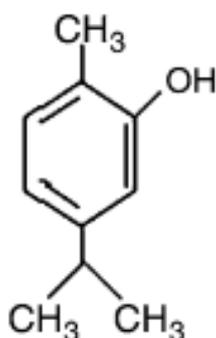


Figura 1.4. Estrutura molecular do carvacrol (adaptado de Arfa *et al.*, 2006).

1.5. Propriedades dos filmes

As principais funções das embalagens são proteger os alimentos do seu meio envolvente e preservar as suas qualidades nutricionais (Wihodo & Moraru, 2013). Os filmes biodegradáveis, utilizados em embalagens de alimentos, devem possuir uma boa resistência mecânica e uma boa capacidade de alongamento para poderem resistir aos diferentes stresses externos, mantendo uma boa funcionalidade (Yang & Paulson, 2000).

De acordo com vários autores (e.g.: Debeaufort *et al.*, 1998; Haugaard *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2002), as propriedades funcionais como as de barreira, ótica e mecânica são muito importantes e têm como objetivo final a formação de um filme com boa capacidade de preservação de alimentos.

1.5.1. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes dependem principalmente da coesão estrutural, ou seja, da capacidade de se formarem ligações moleculares fortes entre as cadeias poliméricas, que vão dificultar a sua separação (Guilbert *et al.*, 1996).

Wihodo and Moraru (2013) referem que as propriedades mecânicas dos filmes, dependem não só da sua composição, como também das condições ambientais existentes, pelo que, para se conseguir manusear, armazenar e manter a integridade das embalagens, é necessário que os seus materiais possuam uma boa resistência mecânica.

De acordo com o trabalho desenvolvido por Sothornvit and Krochta (2001), a incorporação de um plastificante tem a capacidade de aumentar o alongamento mas, ao mesmo tempo, a força tênsil diminui.

1.5.2. Propriedades de barreira

Permeabilidade ao vapor de água: o desenvolvimento de filmes com propriedades de barreira ao vapor de água têm sido alvo de muitos estudos, tendo-se já chegado à conclusão que os melhores filmes barreira são aqueles em cuja composição entram lípidos seguidos dos que contêm proteínas, embora estes sejam mais permeáveis (Guilbert *et al.*, 1996). Filmes que contêm grupos hidrocolóides na sua estrutura molecular são hidrofílicos, tendo por isso a capacidade de absorver grandes quantidades de água, afetando negativamente as suas propriedades físicas e de barreira (Morillon *et al.*, 2000; Cho & Rhee, 2002).

A quantidade de água existente nos alimentos pode provocar várias reações químicas e enzimáticas durante o seu armazenamento, prejudicando as suas características funcionais

(e.g.: cereais crocantes podem tornar-se moles). Por esta razão, a permeabilidade ao vapor de água é um parâmetro importante para que exista um controlo no transporte de água entre os alimentos e o seu meio externo (Yang & Paulson, 2000).

Permeabilidade ao O₂ e CO₂: muitas das reações de degradação de alimentos (e.g.: rancidez de óleos e gorduras, crescimento de microrganismos, perda de vitaminas, entre outros), são devidas à presença de O₂, pelo que é necessário o uso de embalagens que tenham a capacidade de o eliminar (Gontard *et al.*, 1996). Por outro lado, no caso de tecidos vivos (e.g.: frutos e vegetais) que necessitam de respirar, é importante que o filme seja permeável tanto ao oxigénio como ao dióxido de carbono. Como tal, é necessário que se desenvolvam filmes com barreiras apropriadas, para que seja feita uma troca respiratória controlada e através da qual se possa contribuir para a conservação dos alimentos (Ayranci & Tunc, 2003).

1.5.3. Propriedades óticas

A aparência de um alimento é um fator bastante importante no que diz respeito à sua qualidade (Abbott, 1999). Tanto a cor como a opacidade das embalagens são propriedades importantes. De acordo com Kunte *et al.* (1997), a cor pode afetar muito a aceitação dos produtos embalados, por parte do consumidor. Para se conseguir medir a cor, é necessário o uso de sistemas próprios, existindo vários tipos de sistemas: 1) Hunter $L a b$; 2) CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) $L^* a^* b^*$; 3) CIE XYZ; 4) CIE $L^* u^* v^*$; 5) CIE Yxz; e 6) CIE LCH. Estes sistemas baseiam-se apenas no fato de o olho humano possuir três sensores de cor, sensíveis à cor vermelha, verde e azul. As restantes cores são consideradas uma mistura destas três (Abbott, 1999). Para se medir a cor, é necessário o uso de um colorímetro onde, no caso da escala CIE $L^* a^* b^*$, o L indica a luminosidade e a^* e b^* são consideradas as coordenadas de cromaticidade. O $+ a^*$ indica que está na direção da cor vermelha; $- a^*$ está na direção da cor verde; $+ b^*$ está direcionado para a cor amarela e $- b^*$ para a cor na direção azul, como demonstrado na figura 1.5. Como o centro das coordenadas $a^* b^*$ é acromático, à medida que estas aumentam, a saturação da cor também aumenta (Minolta, 1998).

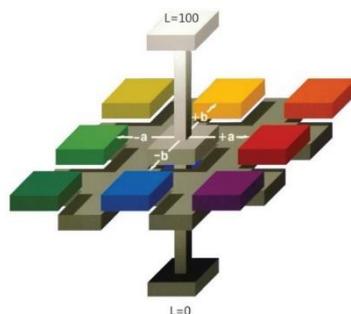


Figura 1.5. Escala da cor HunterLab (Hunter Lab, 2001)

1.6. Filmes biodegradáveis

Os principais filmes biodegradáveis têm como base polissacáridos, lípidos, proteínas ou a sua combinação (Dangaran & Krochta, 2007; Campos *et al.*, 2010; Murillo-Martínez *et al.*, 2011). No entanto, possuem fraca estabilidade ao vapor de água e baixa resistência mecânica, o que limita o seu uso em embalagens de alimentos (Bourtoom, 2009).

1.6.1. Filmes à base de polissacáridos

Os polissacáridos mais usados na formação de um filme são a celulose, os derivados de amido, os derivados de pectina, os extratos de algas marinhas e a quitina e o quitosano (Krochta & De Mulder-Johnston, 1997). Os polissacáridos, normalmente, são muito hidrofílicos e, por isso, são más barreiras ao vapor de água e aos gases (Bourtoom, 2008).

Celulose e derivados: a celulose é uma matéria-prima barata pois é o polímero natural mais abundante na terra, cujo monómero é a glucose, apesar de ser difícil de usar devido à sua natureza hidrofílica, à sua insolubilidade em água e estrutura cristalina (van Tuil *et al.*, 2000). Existem vários derivados de celulose que são produzidos comercialmente, como a carboximetil celulose (CMC), a metil celulose (MC), a hidroxietil celulose (HEC), a etilcelulose (EC), a acetato de celulose (AC) e a hidroxipropil celulose (HPC) (Krochta & De Mulder-Johnston, 1997; van Tuil *et al.*, 2000). Os derivados de celulose possuem excelentes propriedades para formar filmes, uma vez que são inodoros, insípidos, flexíveis, transparentes, resistentes a óleos e gorduras, possuem propriedades moderadas contra a humidade e transmissão de gases e possuem força moderada, mas são solúveis em água (Krochta & De Mulder-Johnston, 1997). São extremamente caros para uso em grandes quantidades, sendo esta uma consequência negativa da sua estrutura cristalina, que torna os passos iniciais difíceis e dispendiosos (van Tuil *et al.*, 2000).

Quitina e quitosano: a quitina é um polissacárido natural que está presente no esqueleto de invertebrados marinhos, insetos, algumas algas e fungos, sendo o segundo polímero mais abundante (Andrady & Xu, 1997; Leceta *et al.*, 2013).

O quitosano é um polímero natural ($\beta(1,4)$ -2-amino-2-deoxi-D-glucosamina) que é obtido através da desacetilação da quitina. Este polímero possui características não tóxicas, biodegradáveis e apresenta uma natureza catiónica, que confere capacidade de transportar e libertar, lentamente, ingredientes funcionais (Coma *et al.*, 2002) e atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de uma vasta variedade de bactérias e fungos (Kumar, 2000; Coma *et al.*, 2002; Dutta *et al.*, 2009; Tripathi *et al.*, 2009). Estas características fazem com que o quitosano tenha um grande interesse para fins de embalagem de alimentos (Leceta *et al.*, 2013). O quitosano possui boa barreira ao oxigénio, propriedades mecânicas médias e idênticas a vários polímeros existentes no comércio, fraca barreira ao vapor de água (Butler *et al.*, 1996) e dá a origem a filmes muito transparentes (Srinivasa *et al.*, 2002).

Amido: o amido é composto por unidades de glucose e possui duas componentes: amilose e amilopectina (Dureja *et al.*, 2011). Visto esta matéria-prima ser uma fonte renovável, de baixo custo e de fácil manuseamento, é muito usada para produzir filmes biodegradáveis com o intuito de substituir os polímeros sintéticos (Xu *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2006).

O amido proporciona uma boa barreira à transmissão de O₂ e CO₂, elevada resistência à tração mas, também como os materiais atrás referidos, não possui boa barreira ao vapor de água, devido à sua natureza hidrofílica, possui fracas propriedades mecânicas, sendo frágil e apresentando pouco ou praticamente nenhum alongamento, limitando o seu uso (Shogren, 1992; Alves *et al.*, 2006; John & Thomas, 2008; Dureja *et al.*, 2011).

1.6.2. Filmes à base de lípidos

Existem vários compostos lipídicos que são usados para formar filmes (e.g.: monoglicéridos acetilados, cera natural e os surfactantes). Apesar de estes compostos terem a capacidade de impedir o transporte de humidade (devido à sua natureza hidrofóbica), formam filmes mais espessos e mais frágeis. Normalmente, os filmes formados com estes compostos necessitam de uma matriz (e.g.: à base de polissacáridos) para se conseguir obter resistência mecânica (Bourtoom, 2008).

Ceras e parafina: a cera de parafina deriva da destilação do petróleo bruto, possuindo uma mistura de hidrocarbonetos sólidos na sua composição. As ceras são muito usadas para a formação de filmes, com o objetivo de proporcionarem uma boa barreira aos gases e humidade,

podendo melhorar a superfície de muitos alimentos (Bourtoom, 2008). De acordo com Khwaldia (2010a), a adição de uma camada de cera de parafina, num filme desenvolvido com outro material renovável, reduz a permeabilidade ao vapor de água.

1.6.3. Filmes compósitos

Segundo vários autores (e.g.: Bourtoom, 2008; Azeredo, 2012), os filmes compósitos podem ser desenvolvidos com uma mistura à base de carboidratos e proteínas, carboidratos e lípidos, lípidos e proteínas ou polímeros sintéticos e polímeros biodegradáveis. O objetivo destes filmes é proporcionar uma maior permeabilidade e/ou melhorar as suas propriedades mecânicas. Tanto os polissacáridos como as proteínas, possuem menos permeabilidade aos gases quando comparados com os lípidos e, por essa razão, a sua presença no desenvolvimento de filmes é importante para se conseguir reduzir taxas de respiração e retardar a senescência. Os lípidos, por outro lado, permitem que os filmes, na sua constituição, não percam todo o seu teor de humidade.

1.6.4. Filmes à base de proteínas

Os filmes à base de proteínas têm despertado grande interesse dado terem a capacidade de substituir, quase totalmente, os plásticos poliolefínicos. Estes filmes podem evitar a deterioração dos alimentos, evitando a migração de humidade que existe entre os componentes e podem, também, transportar agentes AOX e agentes antimicrobianos.

No seu estado natural, as proteínas existem como proteínas fibrosas (insolúveis) ou globulares (solúveis em água ou em soluções aquosas de sais ou ácidos). As proteínas globulares apresentam uma estrutura esférica, pois as moléculas têm tendência a enrolar-se e a estabelecerem ligações químicas que podem ser iónicas, pontes de hidrogénio ou covalentes (pontes dissulfito) com grupos vizinhos.

As propriedades físico-químicas destas proteínas, dependem das quantidades relativas de aminoácidos e da sua distribuição ao longo da cadeia polimérica. Os filmes produzidos à base de proteínas são formados através de dispersões proteicas, após evaporação de um solvente (Wittaya, 2012). O solvente usado é normalmente água, etanol ou uma mistura dos dois. Para formar uma estrutura alongada, necessária à formação de um filme, as proteínas têm de ser desnaturadas por calor, ácido e/ou por solventes. Após a desnaturação, estabelecem-se ligações entre as cadeias de proteína através de pontes de hidrogénio, ligações iónicas, hidrofóbicas ou covalentes, aumentando o seu grau de cristalinidade (Figura 1.6). É esta interação entre cadeias que vai determinar a natureza do filme que, por seu lado, depende da natureza e sequência dos resíduos de aminoácidos.

A presença e distribuição uniforme, ao longo da cadeia, de grupos hidrofóbicos, polares ou tiol, aumentam a probabilidade de existirem interações e de se obter um filme mais forte, mas menos flexível e menos permeável aos gases, vapor de água e líquidos. Se possuírem grupos que se ligam por pontes de hidrogénio ou ligações iónicas ou seja, ligações mais fracas, são excelentes barreiras ao oxigénio, mas não ao vapor de água. Para se obterem polímeros com baixa permeabilidade ao vapor de água, é preciso que existam grupos hidrofóbicos nas cadeias, visto o grupo predominante das proteínas serem os grupos hidrofílicos. Assim, se o objetivo for o desenvolvimento de um filme à base de proteína com barreira ao vapor de água, ter-se-á de adicionar grupos hidrofóbicos por copolimerização ou dispersá-los na matriz (Bourtoom, 2009; Wittaya, 2012).

Na literatura podem encontrar-se vários trabalhos de desenvolvimento de filmes à base de proteínas globulares tais como a gelatina, a zeína de milho, o soro de leite e a proteína de soja, passando-se a descrição de alguns destes filmes de seguida.



Figura 1.6. Efeito do aumento da temperatura, no aumento da cristalinidade do polímero à base de proteína (adaptado de Bier *et al.*, 2014).

Filmes de gelatina: é através da hidrólise do colagénio que se obtém a gelatina (Bourtoom, 2008), sendo esta muito usada tanto na indústria farmacêutica como na indústria alimentar (Carvalho & Grosso, 2006). Filmes à base de gelatina possuem barreira contra o O₂, a luz, impedem a desidratação e a oxidação lipídica, tendo a capacidade de manter a qualidade dos alimentos durante o seu armazenamento (Jongjareonrak *et al.*, 2008). No entanto, possuem uma fraca barreira ao vapor de água (Carvalho & Grosso, 2006).

Filmes de zeína de milho: a proteína mais importante no milho é a zeína (Bourtoom, 2008), sendo extraída a partir da farinha de glúten de milho (Dikey *et al.*, 2001). A zeína tem uma natureza hidrofóbica devido à existência de um grande número de aminoácidos não-polares,

sendo também considerada como um material relativamente termoplástico (Shukla & Cheryan, 2001). Os filmes de zeína possuem boas propriedades barreira ao O₂ e CO₂ (Beck *et al.*, 1996) e são uma boa barreira ao vapor de água (Dangaran *et al.*, 2009). Pode formar filmes duros, brilhantes, com boa flexibilidade e impermeáveis a gorduras, impedindo o aparecimento de microrganismos. Apesar de a zeína possuir características favoráveis para o desenvolvimento de filmes, este material necessita de uma grande quantidade de solventes orgânicos para ser extraído, contribuindo, assim, para o seu elevado custo (Shukla & Cheryan, 2001).

Filmes de glúten de trigo: o glúten de trigo é o nome dado às proteínas insolúveis em água presentes na farinha de trigo, que possui uma mistura de proteínas globulares (Bourtoom, 2008). Estes filmes apresentam boa resistência à água, elevado brilho e, mesmo que não se consigam dissolver em água, têm a capacidade de a absorver. Como este material é abundante e a preço baixo, têm vindo a ser realizados vários estudos sobre possíveis aplicações do glúten de trigo (van Tuil *et al.*, 2000).

Filme de caseína e proteínas do soro de leite: a caseína é uma proteína derivada do leite, representando 80% das proteínas totais. No geral, os filmes de caseína possuem uma aparência opaca. Uma desvantagem é o seu preço elevado.

As proteínas do soro de leite representam apenas 20% das proteínas existentes no leite e são subprodutos da produção de queijo, ricas em β -lactoglobulina (van Tuil *et al.*, 2000). Como têm um elevado valor nutricional, são muito usadas em produtos alimentares (e.g.: formação de géis, emulsões ou espumas) (Foegeding *et al.*, 2002). No geral, para além de ser possível produzir filmes à base de proteínas de leite (caseína e soro de leite) que são transparentes e flexíveis, estes possuem excelentes propriedades barreira ao O₂ e boas propriedades mecânicas (Chen, 1995) mas, por outro lado, possuem uma fraca barreira à humidade devido à sua natureza hidrofílica (Yoshida & Antunes, 2004).

Filme de proteína de soja: a proteína isolada de soja é abundante, tem um custo baixo, é biodegradável, renovável (Bai *et al.*, 2012) e está disponível no comércio como farinha, concentrado de soja e isolado de soja (van Tuil *et al.*, 2000). De acordo com Bourtoom (2008), esta proteína possui um maior teor proteico (38-44%) comparativamente com o dos grãos de cereais (8-15%). Os filmes produzidos tendo como base a proteína de soja, possuem fracas propriedades mecânicas (Rhim *et al.*, 2000; Khwaldia *et al.*, 2010b; Su *et al.*, 2010; Bai *et al.*, 2012) e elevada sensibilidade à humidade, devido ao fato de serem considerados hidrofílicos (Krochta & De Mulder-Johnston, 1997; Khwaldia *et al.*, 2010b; Su *et al.*, 2010; Bai *et al.*, 2012).

1.7. Procura de novas matérias-primas para a base de filmes poliméricos

Os cientistas continuam a pesquisar novos materiais biológicos para a obtenção de filmes poliméricos, para a embalagem de alimentos. No laboratório do Instituto Superior de Engenharia (ISE), surgiu a ideia de se estudar o tremço (*Lupinus* spp.).

É uma leguminosa (Slabu *et al.*, 2010) pertencente à família Fabaceae (Uzun *et al.*, 2007), com centros de maior diversidade no Norte e no Sul da América (Drummond *et al.*, 2012) e centros com menor diversidade no Mediterrâneo e no Norte de África (Ainouche & Bayer, 1999; Drummond *et al.*, 2012). O tremço foi plantado desde os tempos antigos (Schuster-Gajzágó, 2009; Scoppola *et al.*, 2011) e tem importância tanto económica como agronómica, pois cresce em diferentes solos e climas (Sujak *et al.*, 2006).

Dentro do género *Lupinus*, são conhecidas mais de 400 espécies, das quais apenas quatro têm interesse agronómico (Reinhard *et al.*, 2006): 1) Tremço branco (*L. albus* L.); 2) tremço azul (*L. angustifolius* L. Figura 1.7); 3) tremço amarelo (*L. luteus* L.); e 4) tremço pérola (*L. mutabilis* L.) (Mülayim *et al.* 2002; Reinhard *et al.*, 2006). Estes tremços são considerados doces, pois têm pouco sabor amargo e níveis diminuídos de alcaloides (Wäsche *et al.*, 2001) não sendo, por isso, tóxicos para os animais e humanos (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2006a). A Austrália é o país com maior produção de sementes de tremço, a nível mundial, representando cerca de 80% da produção, com uma produção de aproximadamente 1,6 milhões de toneladas por ano (Pollard *et al.*, 2002). Tanto a Rússia como a Polónia, também têm grandes produções de sementes de tremço, nomeadamente *L. luteus* (Reinhard *et al.*, 2006).



Figura 1.7. *Lupinus angustifolius* (Prolupin, 2013)

1.7.1. Composição química do tremçoço

O tremçoço, para além de proteínas, também possui na sua constituição lípidos, minerais, fibras e vitaminas, sendo considerado uma boa fonte de nutrientes. Comparado com muitos legumes consumidos pelos humanos, o tremçoço possui o dobro da quantidade de proteínas, tendo um teor proteico diferente consoante a espécie (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2006a), variando entre 28-48% (Sousa *et al.*, 1996; Linnemann & Dijkstra, 2002; Mülayim *et al.*, 2002) e sendo, por isso, considerado um bom suplemento na alimentação animal e humana (De Cortes Sánchez *et al.*, 2005; Schuster-Gajzágó, 2009).

Estas variações do teor proteico podem dever-se às diferentes condições de crescimento e do solo a que as sementes estão sujeitas (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2006a). As principais proteínas de armazenamento são as globulinas, que constituem 80-90%. Pelo contrário, tanto as prolaminas como as glutelinas existem nas sementes das leguminosas em quantidades pequenas (Mandal & Mandal, 2000). Comparado com a soja, o tremçoço possui vantagens, nomeadamente a alta digestibilidade das suas proteínas e óleo, visto possuir uma pequena quantidade de inibidores de tripsina (Pollard *et al.*, 2002).

No geral, devido ao seu alto teor de alcaloides (2-3.5%), o grão apresenta um gosto amargo (Przybylak *et al.*, 2005), sendo considerado um composto tóxico (Chludil *et al.*, 2009).

Entre as décadas 20 e 30, na Europa, foram realizados vários estudos para tentar selecionar variedades de tremçoço considerados doces, ou seja, com pouca quantidade de alcaloides (Jul *et al.*, 2003). As sementes deste tipo de tremçoço, também possuem uma constituição pobre em aminoácidos que contêm enxofre (Lampart-Szczapa, 1996) e lisina (Straková *et al.*, 2008).

1.7.2. Uso comercial

O tremçoço é uma leguminosa que é muito usada para aplicações alimentares (Xu *et al.*, 2008). O seu alto teor proteico pode ser usado para enriquecer diferentes tipos de alimentos como bolos, pães, batatas fritas e substitutos de leite, sendo também um bom componente alimentar quando a proteína animal é eliminada (Sujak *et al.*, 2006).

O tremçoço também pode ser usado em rotação de culturas durante a produção de grãos, pois tem a capacidade tanto de fixar azoto como de libertar fósforo orgânico do solo (Fan *et al.*, 2002).

Esta planta também pode ser usada para produzir concentrado de proteína que, ao ser adicionada a outros produtos alimentares, pode melhorar os seus valores nutricionais (Dijkstra

et al., 2003; Archer *et al.*, 2004). Na produção de alimentos dietéticos, o tremço também é muito usado visto ser uma fonte potencial de celulose (Sujak *et al.*, 2006).

1.7.3. Proteína isolada do tremço

A proteína isolada do tremço é uma boa fonte adicional de proteína para a nutrição humana (El-Adawy *et al.*, 2001) e possui, também, boas propriedades funcionais e nutricionais (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2009), melhorando a qualidade dos alimentos (Gulewicz *et al.*, 2008).

No geral, a adição de uma determinada percentagem de farinha de tremço, consegue melhorar a textura e também o aroma dos produtos (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2006b). Para a formação de espuma em alimentos, a farinha de tremço é capaz de substituir a albumina de ovo (Pollard *et al.*, 2002).

De acordo com o estudo de Pollard *et al.* (2002), ao substituir a farinha de trigo pela farinha de tremço, obtém-se uma crosta menos escura. Já o miolo fica com uma tonalidade mais amarelada. A cor amarela desta farinha seria útil em alguns alimentos como, por exemplo, em massas e macarrão (Dervas *et al.*, 1999).

As proteínas da semente do tremço são solúveis a $\text{pH} > 5.5$ e demonstram boa ligação à água e gordura, possuindo capacidade espumante e emulsionante (Dervas *et al.*, 1999; Hojilla-Evangelista *et al.*, 2004).

1.8. Objetivos

Na literatura existem vários estudos com o uso de diferentes tipos de proteínas para o desenvolvimento de filmes para embalagens, mas não existem estudos sobre o desenvolvimento de um filme à base de proteína isolada do tremço.

Este trabalho teve como principais objetivos o desenvolvimento e otimização de um filme para embalagem à base de proteína isolada do tremço, o estudo das suas propriedades físico-mecânicas e das suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas sem e com carvacrol (figura 1.8).

1º Capítulo - Introdução

- PLÁSTICOS SINTÉTICOS E SEUS PROBLEMAS
- POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS
- TREMOÇO

2º Capítulo – Desenvolvimento do filme de embalagem à base de proteína isolada do tremoço

- OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO USANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E UM *DESIGN* DE MISTURA
- VALIDAÇÃO DA RECEITA ÓTIMA OBTIDA DO FILME, ANALISANDO A COR, ESPESSURA, FORÇA DE PUNÇÃO E TEOR DE HUMIDADE.

3º Capítulo – Avaliação da atividade antioxidante (compostos fenólicos totais, flavonoides e capacidade

- PROTEÍNA ISOLADA DO TREMOÇO
- SOLUÇÃO COM COMPOSIÇÃO ÓTIMA DO FILME
- FILME COM COMPOSIÇÃO ÓTIMA
- ADIÇÃO DE CARVACROL À SOLUÇÃO ÓTIMA
 - ✓ SOLUÇÃO COM COMPOSIÇÃO ÓTIMA
 - ✓ FILME COM COMPOSIÇÃO ÓTIMA

Figura 1.8. Esquematização do trabalho desenvolvido

2. Desenvolvimento e otimização do filme através da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

Neste capítulo é descrito o desenvolvimento do filme, que incluiu a otimização dos componentes da sua composição. Para tal foi usada a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), com a ajuda do *software Design-Expert 6.0.11* © (Dx6, 2005), com o objetivo de se estudar o efeito das variáveis independentes (% PIT – x_1 ; % glicerol – x_2 e % água – x_3) relativamente às respostas/variáveis dependentes ($L - Y_1$; $a - Y_2$; $b - Y_3$; $e - Y_4$; FP – Y_5 e TH – Y_6).

O método usado é considerado, de acordo com Grizotto *et al.* (2005), eficiente para se conseguir obter uma otimização entre as variáveis independentes e as respostas.

2.1. Introdução

As causas ambientais negativas provocadas por plásticos sintéticos têm aumentado (García *et al.*, 2004), sendo a grande alternativa o desenvolvimento de filmes biodegradáveis feitos à base de materiais naturais com um tempo mais curto que, por exemplo, o petróleo (Brito *et al.*, 2011). Estes biopolímeros, para além de apresentarem vantagens a nível ambiental, também melhoram a qualidade dos alimentos, tanto a nível das propriedades organoléticas como funcionais (Rojas-Graü *et al.*, 2009; Wihodo & Moraru, 2013).

O uso de biopolímeros depende dos custos, disponibilidade, propriedades mecânicas, ótica e de barreira, resistência à água e aceitação sensorial. A sua desidratação produz filmes muito coesos e que necessitam de plastificante. Os plastificantes têm a capacidade de diminuir as forças intermoleculares existentes ao longo da cadeia do polímero (Vieira *et al.*, 2011), melhorando a sua flexibilidade, diminuindo a fragilidade e evitando, também, a diminuição de tamanho do filme durante o seu manuseio e armazenamento (Bordes *et al.*, 2009).

Apesar de existirem vários trabalhos de filmes biodegradáveis realizados com diferentes tipos de proteínas, neste estudo a proteína que foi utilizada para o desenvolvimento de um filme biodegradável foi a proteína isolada do tremçoço.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. *Design* de mistura

Visto não existir nenhum estudo de filme à base de PIT, usou-se, como ponto de partida e com adaptações, as condições descritas no trabalho realizado por Murillo-Martínez *et al.* (2013), sobre a produção de filmes à base de proteínas isoladas do soro de leite.

Para o desenvolvimento do filme utilizaram-se três componentes: proteína, glicerol e água, tendo em conta que os três ingredientes têm de estar presentes sempre na mistura não podendo, portanto, a sua percentagem variar entre 0% e 100% (Vieira & Silva, 2004). Foram estabelecidos mínimos e máximos de cada componente. Verificou-se, assim, que a área triangular delineada pela mistura dos três componentes, não poderia ser toda ocupada pelo *design* devido a restrições operacionais.

De acordo com Anderson and Whitcomb (1999), para seleccionar o número ideal de experiências, foi usado um dos *designs* mais populares – D-optimal e para aplicar o *design*, seguiu-se um procedimento geral:

1. Escolheu-se a ordem do polinómio, para se conseguir obter um modelo de previsão para a resposta estudada. Neste caso, optou-se pelo modelo polinomial quadrático de Scheffé:

$$Y_i = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{13} x_1 x_3 \quad \text{Eq. 1}$$

Onde Y_i é o valor da variável dependente do parâmetro i ; x_1 , x_2 e x_3 representam os três componentes do filme; β_1 , β_2 e β_3 representam os coeficientes de regressão linear; β_{12} , β_{23} e β_{13} são os coeficientes de regressão quadrática (Myers and Montgomery, 1995). Começou-se por escolher os valores mínimos e máximos de cada componente, de acordo com a tabela 2.1.

Tabela 2.1. Limites mínimos e máximos para x_1 = Proteína; x_2 = Glicerol e x_3 = Água no estabelecimento do *Design* de mistura.

	Mínimo (%)	Máximo (%)
x_1 Proteína	8	12
x_2 Glicerol	6	8
x_3 Água	82	86

2. De seguida, o *software* gerou um *design* com um número de pontos em excesso, para ajustar ao modelo polinomial escolhido;
3. Após obtenção do *design*, procedeu-se a uma avaliação do mesmo, com o objetivo de minimizar o erro do desvio padrão na região mais central, uma vez que esta região era a de mais interesse e ainda para conseguir equilibrar o número de graus de liberdade entre os destinados a avaliar o erro puro ($g.l. > 3$; erro inerente ao procedimento experimental) e a avaliar a falta de ajuste do modelo aos pontos experimentais ($g.l. > 3$; tabela 2.2, 2.3 e figura 2.1);
4. O *design* foi dividido em três blocos, com o propósito de diminuir/eliminar o erro devido ao fato de as experiências serem feitas em 3 dias diferentes. Para avaliar o erro puro, fizeram-se réplicas no centro e vértices. No total, obteve-se um *design* com 21 experiências.

Tabela 2.2. *Design* de mistura dos três componentes, obtido pelo *software Design-Expert*. x_1 = Proteína; x_2 = Glicerol e x_3 = Água.

Experiência	x_1	x_2	x_3
1	10.00	6.00	84.00
	10.00	8.00	82.00
	10.00	6.00	84.00
	8.75	7.00	84.25
	10.00	8.00	82.00
	9.50	7.00	83.50
	10.00	6.00	84.00
2	12.00	6.00	82.00
	12.00	6.00	82.00
	8.00	8.00	84.00
	10.30	7.00	82.70
	8.00	6.00	86.00
	8.00	6.00	86.00
	9.50	7.00	83.50
3	8.00	7.00	85.00
	11.00	7.00	82.00
	8.00	8.00	84.00
	9.50	7.00	83.50
	9.50	7.00	83.50
	10.30	7.00	82.70
	8.75	7.00	84.25

Tabela 2.3. *Design* para avaliação do modelo quadrático

Graus de liberdade	Nº
Blocos	2
Modelo	5
Residuais	13
<i>Falta de ajuste</i>	7
<i>Erro Puro</i>	6
Total	20

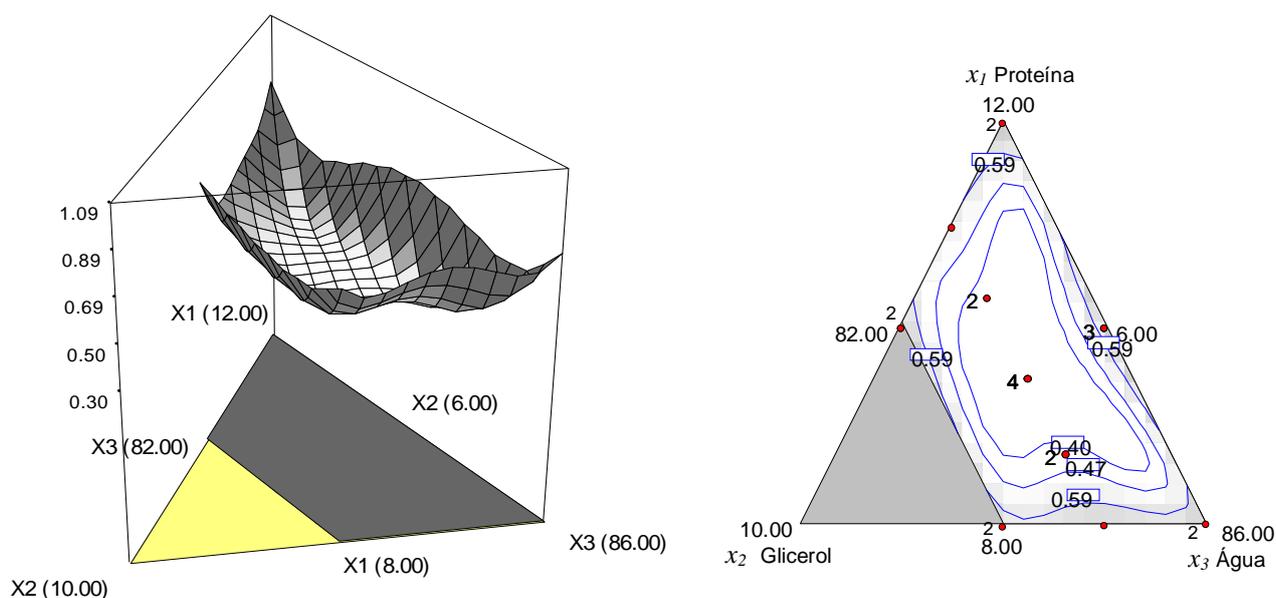


Figura 2.1. Erro-padrão do *design* em estudo.

2.2.2. Produção dos filmes para otimização

Após a escolha do *design*, os filmes foram desenvolvidos de acordo com a composição estabelecida no *design* descrito na tabela 2.2, agitando a solução vigorosamente de modo a facilitar a dissolução da proteína. O pH foi medido e ajustado a pH 9 com NaOH a 1M. As soluções foram submetidas a um aquecimento com uma temperatura entre 70-75 °C, agitando a solução de modo a facilitar a dissolução da proteína e a obter uma solução homogênea, durante 20 minutos, numa placa de aquecimento. No final, a solução foi colocada numa placa retangular com 10.6 cm de largura e 15.6 cm de comprimento. Foram feitas três réplicas.

2.2.3. Caracterização Físico-Mecânica dos filmes

2.2.3.1. Cor ($L - Y_1$, $a - Y_2$ e $b - Y_3$)

A avaliação da cor foi efetuada através de um colorímetro (Neurtek S.A., Espanha) e foi medida em seis locais diferentes de cada amostra com o iluminante D₆₅, 10 ° de observador na escala HunterLab. Os parâmetros usados para a análise da cor, estão de acordo com os valores de HunterLab (Rubilar *et al.*, 2013a).

2.2.3.2. Espessura (e , Y_4)

Para analisar a espessura, foi usado um espessímetro (Adamel-Lhomargy, tipo MI 21, França), tendo esta sido medida em seis locais diferentes das amostras (Cerqueira *et al.*, 2009).

2.2.3.3. Força de Punção (FP , Y_5)

Na realização do teste de penetração, foi usado um texturómetro (Brookfield, LFRA 1500, U.S.A.) para avaliar a resistência à força de punção, de acordo com Bamdad *et al.* (2006) com algumas modificações. As amostras foram medidas em seis locais diferentes, usando uma sonda de 4 mm de diâmetro (TA44), de aço inoxidável, com *target value* de 6 mm de penetração e uma velocidade de teste de 0.5 mm/s, juntamente com o *software* TextureProLite v1.1.

2.2.3.4. Teor de humidade (TH , Y_6)

Para a análise do teor de humidade, foi usada uma balança com infravermelhos (Mettler type LP 16 M e type PM 100, Suíça) onde foi colocada, aproximadamente, 1 g de cada amostra a uma temperatura de 160 °C (Ramos *et al.*, 2013).

2.2.4. Análise estatística

Para a otimização do filme, foi usada a análise de variância (ANOVA) e o teste F ($p < 0.05$). Para os parâmetros dos filmes (Y_1 , Y_3 , Y_4 , Y_5 e Y_6), a análise foi feita através da sua média e desvio-padrão em excel©, que está inserida em anexo (tabela A1).

2.3. Resultados

2.3.1. Modelos de previsão de resposta

Os resultados foram analisados através da ANOVA como referido em 2.2.4. Na tabela 2.4, encontram-se os valores obtidos no laboratório para cada uma das respostas (Y_i), para as 21 formulações em que se variaram as variáveis independentes x_1 (Proteína), x_2 (Glicerol) e x_3 (Água), de acordo com a tabela 2.2.

Tabela 2.4. Valores atribuídos a cada resposta, através do modelo matemático, em relação a cada formulação.

Blocos	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6
	L	a	b	e (mm)	FP (g)	TH (%)
1	81.8	-4.2	18.3	-----	48.67	22.5
	-----	-4.2	20	0.15	43.03	29.25
	-----	-3.8	17	-----	53.47	23.06
	82.29	-3.8	16.7	0.16	23.69	27.16
	81.62	-4.3	-----	0.128	17.87	27.12
	-----	-4.3	16.7	-----	34.07	-----
	81.8	-4.6	-----	0.188	43.67	23.24
2	82.09	-4.6	20.05	0.2	99.53	17.74
	82.81	-4.7	20.2	0.182	-----	19.37
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	83.07	-4.6	17.6	0.107	57.7	22.48
	-----	-4.6	19.4	0.135	46.7	22.61
	83.52	-4.4	-----	0.148	40.33	20.32
	-----	-4.2	18.5	0.15	60.3	22.5
3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	81.03	-4.9	21.7	-----	105.73	17.94
	82.17	-4.6	21.7	0.13	44.7	-----
	-----	-4.4	-----	0.208	72.53	17.85
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	82.22	-4.6	20.1	0.173	-----	-----
82.08	-4.5	19.3	0.165	72.03	18.55	

Algumas das respostas encontram-se sem valores pois, após a sua análise, foram considerados *outliers*, tendo sido removidos. Foi através da análise estatística, que se verificou qual o modelo de previsão que melhor se adequava. A análise do teste F, em cada resposta, indicou se os termos lineares e quadráticos contribuíam significativamente para o modelo. Examinando a falta de ajuste, os modelos que tiveram o erro residual significativamente superior ao erro puro foram rejeitados. Tanto o $R^2_{ajustado}$ como o $R^2_{previsto}$ (que indica o quão bem o modelo é capaz de prever os dados), também contribuíram para a seleção do modelo mais apropriado (Vieira & Silva, 2004).

Baseado nesta análise, a resposta Y_2 (cor - a) foi rejeitada, estando a análise das outras respostas apresentada na tabela 2.5.

Tabela 2.5. ANOVA do ajuste do modelo para todas as respostas.

Resposta	Modelo	R^2_{ajustado}	R^2_{previsto}
Y_1 L	F= 5.99 * Prob > F = 0.0305		0.5258 0.0621
Y_3 b	F= 6.19 * Prob > F = 0.0156		0.7412 0.3397
Y_4 e	F= 9.99* Prob > F = 0.0052		0.6205 0.3309
Y_5 FP	F= 41.59* Prob > F = < 0.0001		0.862 0.7421
Y_6 TH	F= 33.09 * Prob > F = < 0.0001		0.8425 0.6655

* Significativo ($p < 0.05$).

Na tabela 2.6 estão descritos os modelos de previsão para: Y_1 , Y_3 , Y_4 , Y_5 e Y_6 . Os gráficos referentes a cada resposta estão apresentados na figura 2.2.

Tabela 2.6. Modelos previstos para as respostas, em termos de componentes atuais.

Coeficientes	Linear	Quadrático	Linear	Linear	Linear
	Y_1	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6
β_1	0.564	27.066	0.0133	14.038	-0.579
β_2	0.804	141.182	-0.027	-10.015	2.707
β_3	0.854	1.579	2.66E-03	-0.0956	0.107
β_{12}	-----	-1.479	-----	-----	-----
β_{13}	-----	-0.357	-----	-----	-----
β_{23}	-----	-1.673	-----	-----	-----

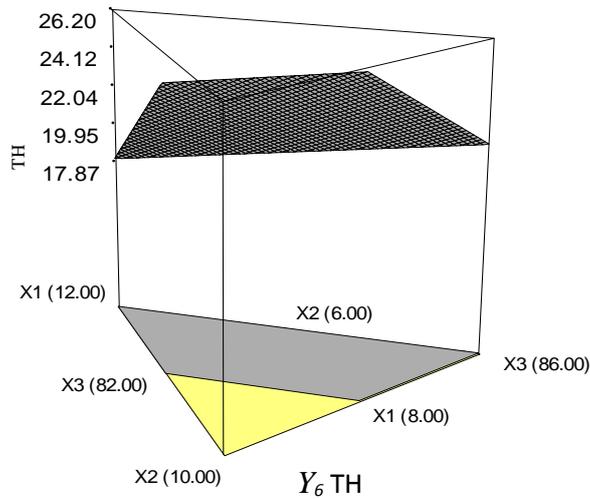
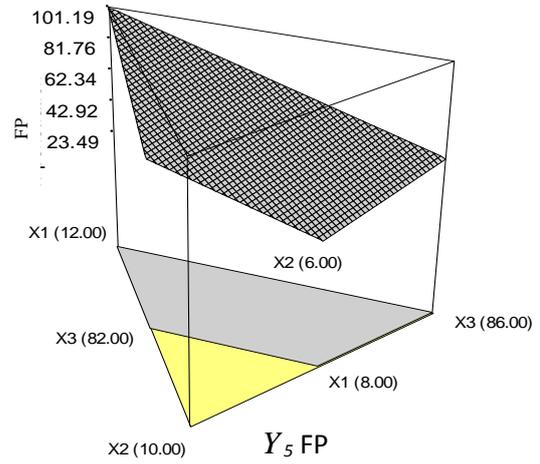
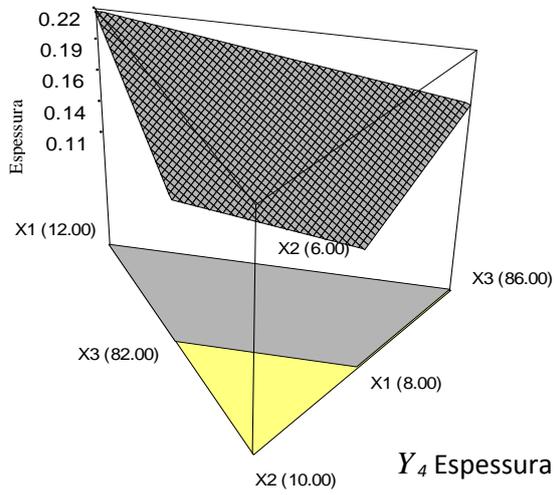
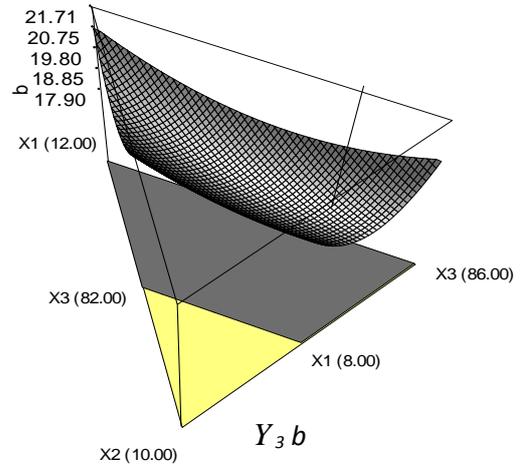
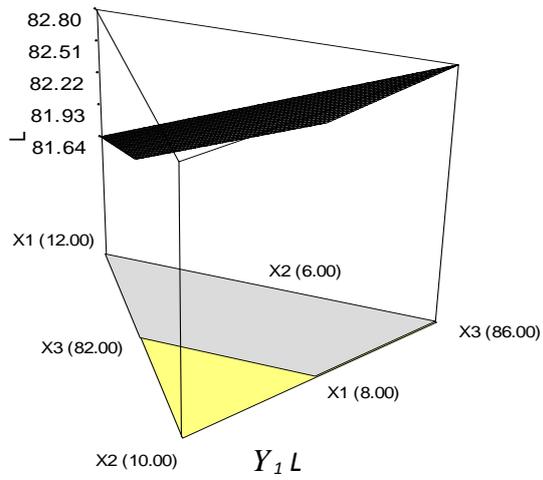


Figura 2.2. Superfície de resposta relativa às respostas L , b , e , FP e TH.

Em relação à cor, consegue-se observar que o parâmetro L aumenta com o aumento da % de água. Quanto ao parâmetro b , aumenta com a % de proteína e diminui com o aumento da % de água. Tanto a e como a FP aumentam com o aumento da % de proteína e o TH aumenta quanto maior for a % de água.

2.3.2. Otimização

Para otimização e validação, consideraram-se como restrições os parâmetros que tinham mais efeito no modelo. Para cada resposta, foi imposta uma restrição de acordo com os requisitos exigidos para o filme que se pretendeu desenvolver. Esta restrição foi, em alguns casos, um valor mínimo e noutros um valor máximo (tabela 2.7). Na otimização da melhor formulação, foi necessário obter-se um valor de desejabilidade (d_i) (eq. 2) para cada resposta, através da transformação das respostas Y_i (Anderson & Whitcomb, 1996).

Tabela 2.7. Mínimos e máximos para cada resposta, na otimização.

Respostas Y_i	Mínimo	Máximo	Objetivo	Efeito no filme
Y_1	80	100	Máximo	Mais claro possível
Y_3	16.74	21.73	Mínimo	Menos amarelo possível
Y_4	0.107	0.208	Mínimo	Menor espessura
Y_5	17.87	105.73	Máximo	Mais resistente à punção
Y_6	17.74	29.25	Mínimo	Menos húmido

A função de desejabilidade (Eq. 2) (Anderson and Whitcomb, 1996) tem a capacidade de combinar as desejabilidades, d_i , das cinco respostas (L , b , e , FP e TH).

$$D = \left(\prod_{i=1}^n d_i \right)^{1/n} \quad \text{Equação 2}$$

Onde n é o número de respostas (5).

A composição (tabela 2.8 e figura 2.3) para produzir o filme ótimo foi de 8.98% de PIT (1.98 g), 6.88% de glicerol (1.51 g) e 84.15% de água (18.5 ml).

Tabela 2.8. Composição ótima do filme à base de proteína do tremoço e valores correspondentes a cada resposta e valor de desejabilidade.

PIT	8.98%
Glicerol	6.88%
Água	84.15%
<i>L</i>	82.48
<i>b</i>	17.91
<i>e</i>	0.155
FP	49.12
TH	22.4
Desejabilidade	0.116

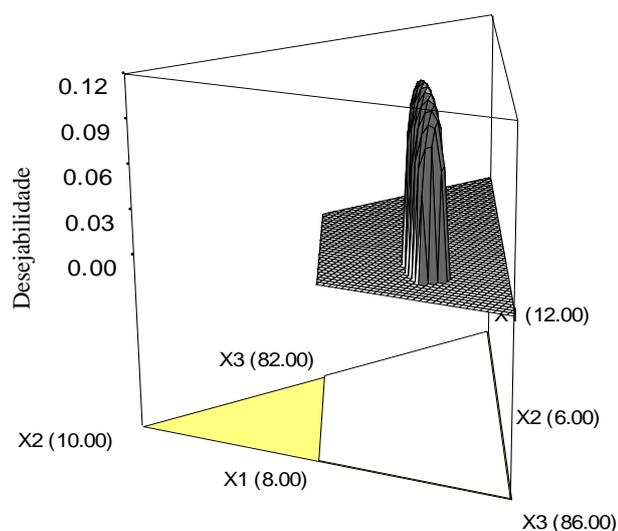


Figura 2.3. Superfície de resposta da composição ótima do filme.

2.4. Validação experimental

De acordo com a composição ótima prevista pelo modelo matemático, foi efetuada a validação experimental e os parâmetros *L*, *b*, *e*, TH e FP foram analisados de acordo com as metodologias descritas anteriormente. Obteve-se um filme com superfície praticamente lisa, com determinada flexibilidade e fino, tendo sido fácil a sua remoção. Este filme possui uma aparência amarelada e alguma transparência (figura 2.4).



Figura 2.4. Filme à base de proteína isolada do tremçoço obtido experimentalmente.

2.4.1. Cor

Relativamente à validação experimental, os valores obtidos experimentalmente aproximam-se do previsto para L (85.36 ± 0.93 ; 82.5 respectivamente) (figura 2.5). Em relação ao parâmetro b , que é o parâmetro que indica cor amarela (valores positivos) ou cor azul (valores negativos), apesar de ter tido valores positivos, o valor obtido experimentalmente (27.26 ± 0.65) foi bastante superior em relação ao valor obtido pelo modelo matemático (17.9) (figura 2.6), indicando que o filme obtido experimentalmente é mais amarelo que o previsto.

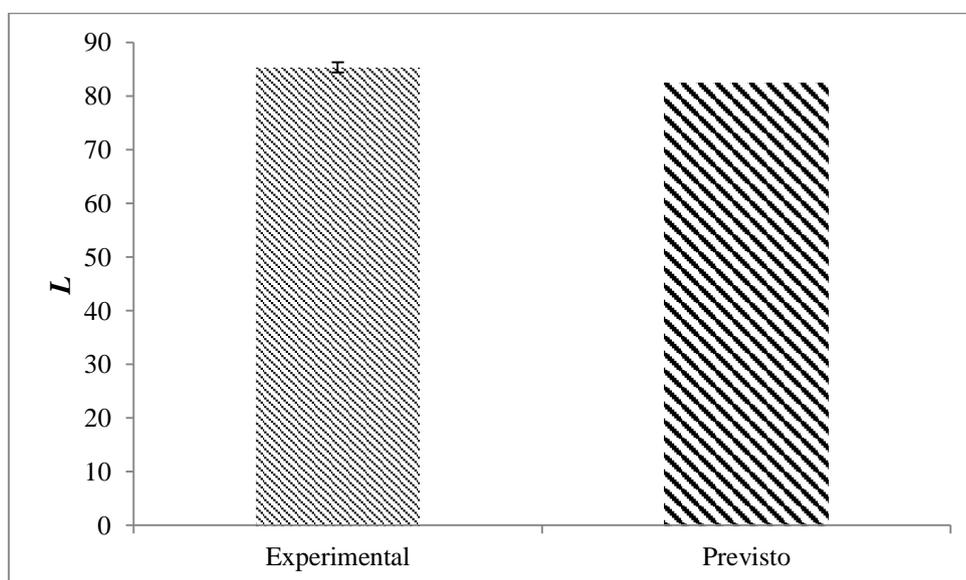


Figura 2.5. Parâmetro L , obtido experimentalmente e previsto pelo modelo.

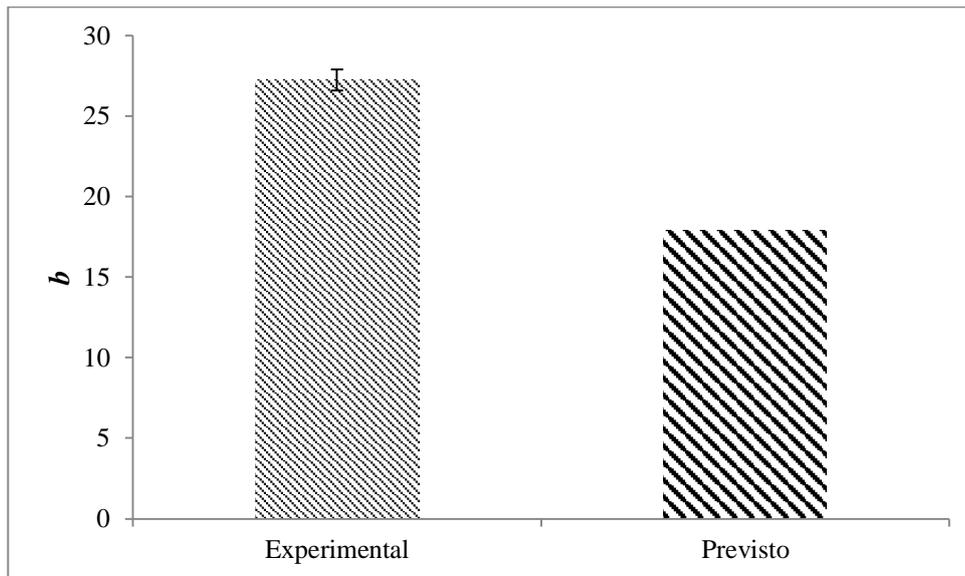


Figura 2.6. Parâmetro b , obtido experimentalmente e previsto pelo modelo.

2.4.2. Espessura e Teor de Humidade

Obteve-se um filme com valores de e ligeiramente baixos, comparativamente ao previsto, verificando-se uma grande diferença (125 ± 13 e $155 \mu\text{m}$, respetivamente) (figura 2.7). Na figura 2.8, observa-se que o valor do TH obtido experimentalmente está dentro do valor obtido pelo modelo ($19.1 \pm 3.52\%$ e 22.4 , respetivamente). Isto significa que o modelo conseguiu prever, com sucesso, este parâmetro.

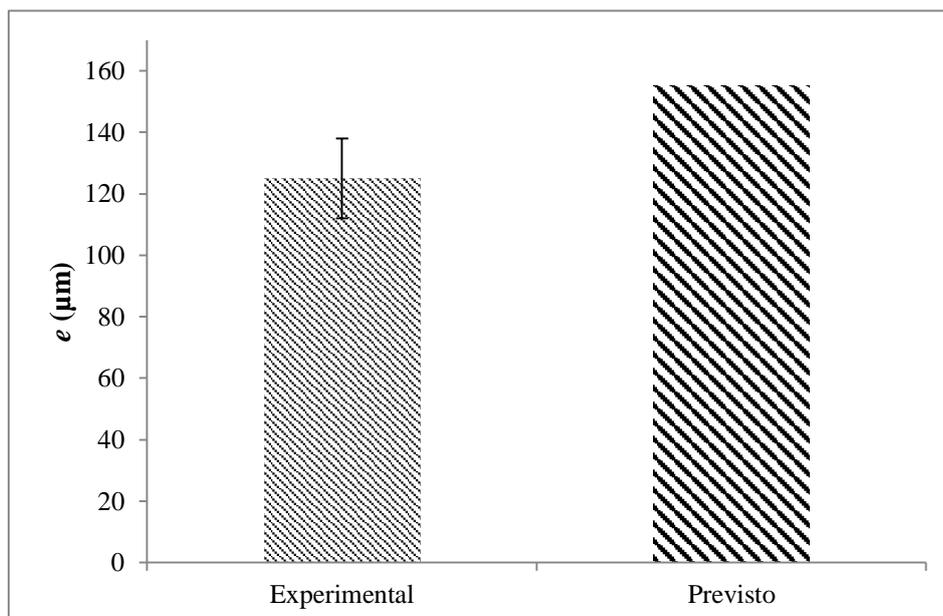


Figura 2.7. Parâmetro e , obtido experimentalmente e previsto pelo modelo.

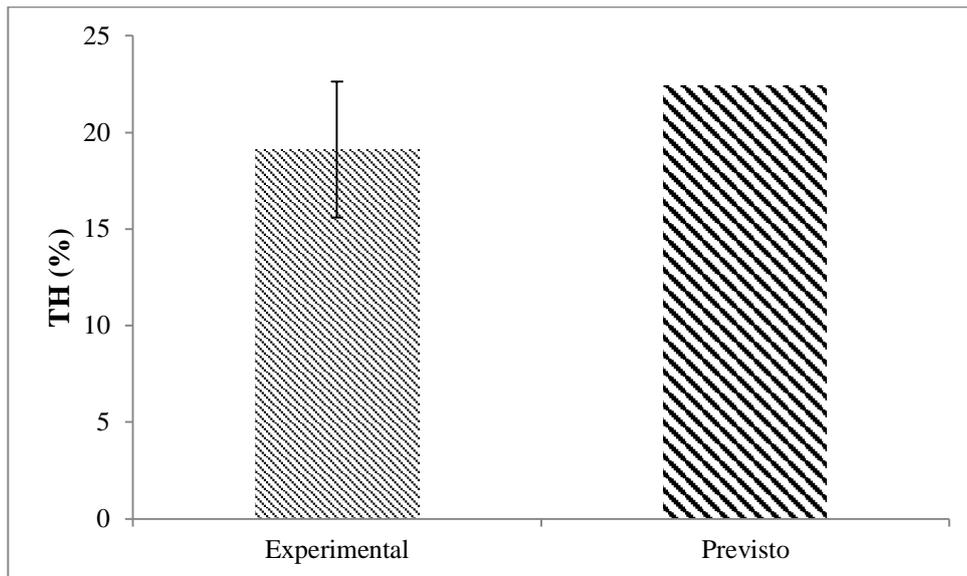


Figura 2.8. Parâmetro TH, obtido experimentalmente e previsto pelo modelo.

2.4.3. Força de Punção

A FP está diretamente relacionada com a textura do filme, ou seja, quanto maior força for necessário exercer sob o filme, maior a dureza. A figura 2.9 revela que o valor obtido experimentalmente foi praticamente o mesmo que o previsto (45.18 ± 3.1 e 49.1 g, respectivamente).

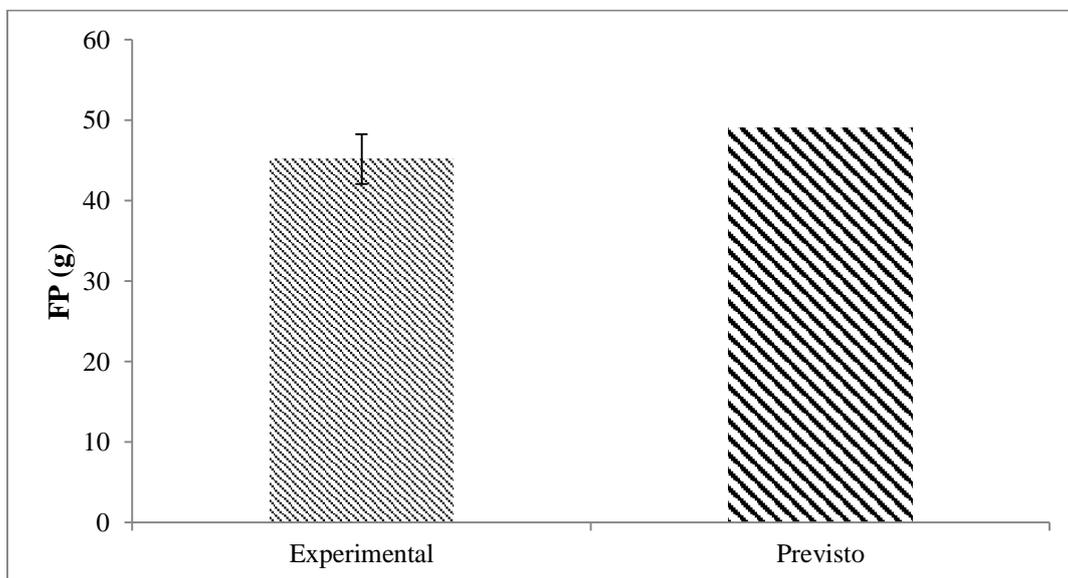


Figura 2.9. FP do filme obtido experimentalmente e o previsto pelo modelo.

2.5. Discussão

O filme obtido neste estudo foi validado em todos os parâmetros, á exceção de dois: o parâmetro e que foi inferior ao valor previsto e o parâmetro b da cor que apresentou um valor superior. Estas discrepâncias podem explicar-se pelo fato de o filme ainda ser feito manualmente e a reproducibilidade de alguns parâmetros ser mais difícil de atingir. No caso do parâmetro b , que quantifica a intensidade de cor amarela quando positivo, sendo a cor um parâmetro com muita importância pois está diretamente relacionada com a aparência do produto (Ramos *et al.*, 2013) e estando, também, muito relacionada com a aceitabilidade de filmes biodegradáveis e não biodegradáveis por parte do consumidor (Ghanbarzadeh *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2013), devemos ter em conta de que, sendo um produto vegetal em que a cor provém de cloroplastos, existe sempre uma certa variação na distribuição destes no isolado de proteína, podendo ter levado a este resultado. Por outro lado, os modelos para estes dois parâmetros apresentavam um R^2 previsto relativamente baixo, indicando que a previsão de valores pode acarretar mais erro.

De qualquer modo, o filme apresentou-se liso com $L = 85.36 \pm 0.93$, $b = 27.26 \pm 0.65$, $e = 125 \pm 13 \mu\text{m}$, um TH = $19.1 \pm 3.52 \%$ e uma FP = $45.18 \pm 3.1 \text{ g}$, sendo estes resultados comparáveis com os existentes na literatura para filmes obtidos com outras proteínas animais e vegetais.

De acordo com o estudo de Rhim *et al.* (1998), onde a proteína de soja foi usada para a produção do filme, obtiveram um valor de $L = 93.37$ e $b = 12.18$, a pH 10; Rubilar *et al.* (2013a) usaram quitosano para desenvolverem um filme, tendo obtido valores de L e b , respetivamente, 96.19 e 1.06.

No filme desenvolvido à base de amido de milho, onde colocaram 5 g de proteína, obtiveram valores de L e b de 78.09 e 14.70, respetivamente (Ghanbarzadeh *et al.*, 2010). Valores de L e b (29.49 e 2.72, respetivamente) foram obtidos no trabalho de Salgado *et al.* (2010), tendo sido usada a proteína isolada do girassol. Estes autores obtiveram, assim, um filme com tom de verde-escuro devido ao valor de L e b serem relativamente baixos.

Para o valor de L , os resultados obtidos por Ghanbarzadeh *et al.* (2010) e Rhim *et al.* (1998), foram os mais idênticos comparativamente com o filme de PIT.

As diferenças de cor dos filmes podem estar diretamente relacionadas com a cor do material a ser usado (Salgado *et al.*, 2010).

Relativamente à espessura (e) e ao Teor de Humidade (TH), o filme de PIT obtido neste estudo apresentou valores semelhantes aos encontrados na literatura. No estudo de Ramos *et al.* (2013), onde usaram a proteína do soro de leite com diferentes percentagens de glicerol (40,

50 e 60%), o TH variou entre 15.1-18.7 % existindo diferenças significativas no TH quando se aumentou o teor de glicerol. Já no estudo de Salgado *et al.* (2010), onde foi usada a proteína do girassol, obtiveram um $e = 71 \mu\text{m}$ e um TH = 25.9 %.

Com o uso da lentilha para o desenvolvimento de um filme biodegradável, foi obtida um e de 150 μm com um TH de 23.5 % (Bamdad *et al.*, 2006).

O aumento do TH pode estar relacionado com a natureza higroscópica do glicerol, ou seja, a capacidade de absorver água. O glicerol consegue atrair e reter as moléculas de água, provocando um humedecimento maior do filme (Kokoszka *et al.*, 2010) podendo, também, modificar a sua estrutura, deixando-o mais solto e com maior capacidade de transmissão de água (Jangchud & Chinnan, 1999). Estes autores também verificaram que, com o aumento da temperatura de secagem, tanto a espessura como o TH diminuam.

Relativamente à força de punção, esta é definida como a tensão máxima necessária para o rompimento ou penetração do filme (Hanani *et al.*, 2013). A % de glicerol desempenha, nesta força, um papel importante. De fato, com o aumento da concentração de glicerol, há um aumento na quantidade de ligações de hidrogénio entre as cadeias de proteína, aumentando tanto o espaçamento intermolecular como a mobilidade da cadeia (Barreto *et al.*, 2003). No entanto, esse aumento apenas se consegue com uma determinada concentração de glicerol pois, acima dessa concentração, poderá ocorrer saturação da matriz do filme com o glicerol e, para além disso, o glicerol deixa de conseguir reagir com as moléculas de proteína existentes, não havendo ligações covalentes (Ramos *et al.*, 2013). Outro fator a ter em conta, é a temperatura à qual se produzem os filmes que, no caso de existirem proteínas, se for elevada poderá causar a sua desnaturação, provocando o seu desenrolamento e exposição de grupos reativos. Se promoverem ligações reticuladas, obter-se-ão filmes com um maior grau de cristalinidade, com uma densidade mais elevada e maior resistência à punção mas, se pelo contrário, forem expostos grupos que exerçam impedimento estereoquímico, teremos ligações mais fracas, com um menor grau de cristalinidade e uma menor densidade. Ainda, Kim *et al.* (2002) também afirmaram que os tratamentos térmicos a proteínas a pH básico têm efeito nas propriedades físicas dos filmes, visto promoverem formação de ligações cruzadas intra e intermoleculares, promovendo uma força de punção mais elevada.

No caso do filme de PIT, a FP foi relativamente baixa. Isto poderá explicar-se, tal como aconteceu com Bamdad *et al.* (2006), devido à temperatura de desnaturação da proteína (70 °C durante 20 minutos) ou pelo fato de a solução conter uma quantidade de glicerol relativamente elevada (50% do peso da proteína, ou seja, 2.5 g).

Relativamente ao estudo de Bamdad *et al.* (2006), os seus filmes obtiveram uma FP de 158.3 g de força, para uma espessura de 150 μm . Num outro trabalho, onde usaram a farinha de semente de algodão, os filmes apresentaram uma FP de 78.5 g de força com uma espessura de 100 μm (Murquie *et al.*, 1995), tendo sido mais semelhante ao obtido neste estudo (45.18 g com espessura de 125 μm).

Comparativamente aos filmes de proteína de lentilha (158.3 g), o filme de PIT teve uma FP bastante menor. Isto poderá querer dizer que, para além de a sua espessura ser mais pequena, a sua rede proteica pode não ser suficientemente forte e coesa (Bamdad *et al.*, 2006).

2.6. Conclusões

A validação experimental confirmou a possibilidade de se desenvolver e otimizar um filme à base de proteína isolada do tremçoço com as seguintes quantidades de proteína, glicerol e água: 1.98 g, 1.51 g e 18.5 ml, respetivamente. A partir da validação, pode-se concluir que não existem diferenças significativas entre o L , teor de humidade e força de punção experimental relativamente ao previsto pelo modelo. Pelo contrário, tanto em b como na espessura experimentais, já se verificaram diferenças significativas em relação ao previsto.

O valor de b experimental foi mais alto que o previsto e o valor da espessura experimental foi mais baixo contribuindo, assim, para um filme mais amarelo e mais fino.

No geral, pode-se concluir que o modelo matemático conseguiu prever praticamente todos os parâmetros em estudo.

3. Caracterização das propriedades antioxidantes e antimicrobianas da solução formadora de filme e filme de PIT e carvacrol

No capítulo anterior, foi descrito o desenvolvimento de um filme de embalagem à base de proteína isolada de tremço. Com vista ao desenvolvimento de uma embalagem que interaja com o alimento de modo a poder prolongar o seu tempo de vida útil, interessa pesquisar propriedades antioxidantes e antimicrobianas neste novo material. Neste capítulo é descrito o estudo da atividade antioxidante em termos de teor em compostos fenólicos totais, flavonoides e capacidade antioxidante (AER – Atividade de eliminação de radicais) na PIT, SSC, SCC, FSC e FCC e respetiva atividade antimicrobiana relativamente aos microrganismos *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

3.1. Introdução

A embalagem ativa (EA) é um novo termo que se aplica a embalagens que interagem com o alimento, prolongando o seu tempo de vida ou até melhorar as suas propriedades (Suppakul *et al.*, 2003). Também se pode referir a EA quando há adição de aditivos como AOX, agentes antimicrobianos, ácidos orgânicos, enzimas, extratos naturais, iões, etanol, entre outros (Dainelli *et al.*, 2008; Dobrucka & Cierpiszewski, 2014).

Na sua constituição, muitas plantas possuem antioxidantes naturais (Gupta & Sharma, 2006), sendo os mais comuns os ácidos fenólicos, flavonoides, derivados de cumarina e outros polifenóis (Zieliński & Kozłowska, 2000). Estes antioxidantes naturais podem ter diversas funções como, por exemplo, eliminar radicais livres e prevenir a formação de OH (Gupta & Sharma, 2006). Relativamente aos alimentos, estes compostos podem prevenir as mudanças indesejáveis no sabor e na sua qualidade nutricional (Zieliński & Kozłowska, 2000).

Ainda, estando geralmente em contato direto com o solo, estão sujeitas a ataques de patogénicos (Wink, 1984) e, por isso, possuem vários mecanismos de defesa contra os agentes patogénicos devido à capacidade de sintetizar uma grande quantidade e variedade de metabolitos secundários, que possuem atividade antimicrobiana (AM), para as proteger contra vários microrganismos (e.g.: vírus, fungos e bactérias), macrorganismos (e.g.: mamíferos, herbívoros, insetos) e, também, contra outras plantas (Schäfer & Wink, 2009; Castillo *et al.*, 2012).

Existem vários AOX sintéticos usados vulgarmente na indústria alimentar mas, o consumidor atual prefere AOX naturais por serem mais seguros (Pereira *et al.*, 2010; Contini *et al.*, 2011). Entre os compostos fenólicos, o carvacrol, um fenol isoprenilo que se pode encontrar no óleo essencial do oregão, foi identificado como sendo não só um bom antioxidante mas também um agente antimicrobiano muito potente (Arfa *et al.*, 2006, López-Mata *et al.*, 2013).

Com base no acima exposto, o objetivo deste capítulo foi a pesquisa da existência de compostos fenólicos, flavonoides, capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana no filme desenvolvido e, no caso de não haver, promover esta atividade através da adição de carvacrol.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Preparação das amostras

3.2.1.1. *Soluções para atividade antioxidante*

As soluções formadoras de filme e os filmes foram preparados da seguinte forma:

Solução formadora de filme: Foi usada a formulação ótima do filme de PIT. A solução esteve sujeita a uma centrifugação a 10000 rpm durante 10 minutos a 20 ° C e, posteriormente, foi filtrada com filtros de 90 µm para um balão volumétrico de 100 ml. Foram feitas três réplicas. Após obtenção das soluções, caracterizaram-se os compostos fenólicos totais, flavonoides e capacidade antioxidante.

Filme de PIT: Pesaram-se 5 g de filme e foram adicionados 75 ml da mistura de etanol (Panreac)/água (70/30). De seguida, foi usado o Ultraturrax T25 (Janke & Kunkel – IKA ® Labortechnik) para homogeneizar a solução, centrifugando-se a 10000 rpm durante 10 minutos a 20 ° C. Por fim, filtrou-se com filtros de 90 µm (Lab Logistics Group GmbH) para um balão volumétrico de 100 ml. Foram feitas três amostras para a PIT e duas para o FSC.

3.2.1.2. *Solução formadora de filme, PIT e filme com carvacrol a 10%*

Foi adicionado um antimicrobiano natural, o carvacrol, a 10% e foram testadas as suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, de acordo com o descrito anteriormente. A solução formadora de filme e o filme com carvacrol a 10%, foram produzidos de acordo com a seção 3.4.1.1, com algumas alterações. À percentagem ótima de cada componente, foi adicionado 2.22 ml de carvacrol (1M) e 0.2 ml de Tween 80 à solução existente.

Paralelamente, as propriedades antioxidantes e antimicrobianas da PIT foram caracterizadas com as metodologias descritas anteriormente.

3.2.1.3. *Filmes e soluções para análise da atividade antimicrobiana*

Para se obter as soluções necessárias para analisar a atividade antimicrobiana, recorreu-se ao mesmo método descrito no ponto 3.4.1.1, com exceção da solução de PIT onde se colocou 5 g de proteína em 25 ml de água destilada.

Quer a PIT quer as soluções formadoras de filme foram testadas com três concentrações diferentes: 100%, 25% e a 10%.

As soluções foram esterilizadas com o uso do Kit Millipore com filtros de 0.22 µm (Millipore Corporation Bedford, MA 01730). A superfície dos filmes foi esterilizada usando uma câmara UV-C durante 3 minutos.

3.2.1.4. *Bactérias e leveduras usadas e suas condições de crescimento*

Neste estudo, foram usados *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853) e *Saccharomyces cerevisiae* (PYCC-4012). Foi feito um riscado com cada uma das bactérias em meio Tryptic Soy Agar (TSA) (Scharlau) e colocadas a crescer na estufa a 37 °C entre 18-24h. Para a levedura, também foi feito um riscado em meio Yeast Malt Agar (YM Agar) (Scharlau) e colocada a crescer na estufa a 25 °C durante 7 dias. Estes riscados tiveram como objetivo obter-se colônias isoladas de cada microrganismo.

3.2.2. Propriedades antioxidantes

3.2.2.1. *Determinação dos compostos fenólicos totais (CFT)*

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinada através do método de Folin-Ciocalteu (Siger *et al.*, 2008), onde foi preparada uma solução com 0.5 g de ácido gálico (AG) (Fluka Chemika)/100 ml de água destilada, sendo a mistura agitada com aquecimento (aproximadamente 30 °C) para, posteriormente, se fazer a curva de calibração. Prepararam-se as seguintes concentrações para a curva de calibração: 0,075; 0,125; 0,250; 0,500; 0,750; 1,000; 1,250 e 1,500 mg/ml. Para se determinar os compostos fenólicos totais, colocou-se num tubo de ensaio: 10 µl da amostra (PIT, FSC, FCC, SSC e SCC); 1000 µl de reagente Folin-Ciocalteu (Scharlau) diluído (1:10) e agitou-se durante 2 minutos. De seguida, colocou-se 800 µl de solução saturada de carbonato de sódio (Na₂CO₃) (Panreac Química S.A.U.) 7,5% w/v e 190 µl de água destilada. A mistura foi novamente agitada e foi colocada ao abrigo da luz durante 30 minutos. Foi feito um branco onde, em vez da amostra, se colocou água destilada. Agitou-se e leu-se a absorvância, no espectrofotómetro (Hitachi, Ltd, Japão), a 760 nm. Os dados foram expressos em mg de AG equivalente a 100 ml de cada solução ou 100 g de filme, através das fórmulas descritas em anexo (tabelas A2 e A3).

3.2.2.2. *Determinação dos flavonoides (Flav)*

Foi usado o método baseado na formação do complexo flavonoide-alumínio, onde se preparou uma solução com 0.1 g de quercetina (Q) (Sigma-Aldrich) em 100 ml de metanol com agitação (Djeridane *et al.*, 2006), com o objetivo de se fazer a curva de calibração. Para se obter a curva de calibração, foram preparadas as seguintes concentrações: 0.001; 0.002; 0.005; 0.010; 0.025; 0.050; 0.075 e 0.100 mg/ml. Num tubo, foi colocado: 500 µl de amostra; 100 µl de cloreto de alumínio (Riedel-deHaën®) a 10%; 100 µl de acetato de potássio (Riedel-deHaën®) 1M e 2800 µl de água destilada. Para a preparação do branco, em vez de se ter colocado a amostra,

colocou-se metanol. Os tubos foram agitados e colocados ao abrigo da luz, durante 30 minutos. Agitou-se novamente e leu-se a absorvância, no espectrofotômetro, a 415 nm. Os dados foram expressos em mg de Q equivalente a 100 ml de cada solução ou 100 g de filme, através das fórmulas descritas em anexo (tabelas A2 e A3).

3.2.2.3. *Determinação da capacidade antioxidante – DPPH (Atividade de eliminação de radicais – AER)*

Preparou-se uma solução com 0.05 g de Trolox (T) (Sigma-Aldrich) em 50 ml de etanol a 96% para a curva de calibração, onde as concentrações foram as seguintes: 0,025; 0,05; 0,075; 0,100; 0,150; 0,200 e 0,300 mg/ml. A atividade de eliminação de radicais (AER) das amostras, foi avaliada com DPPH (Sigma-Aldrich), baseado no método reportado por Sevim and Tuncay (2013). A solução de DPPH (0.02718 mM) foi preparada em 500 ml de etanol a 96%. Num tubo de ensaio, foi colocado: 100 µl da amostra e com 1900 µl da solução de DPPH e agitou-se. Prepararam-se dois brancos onde, em vez da amostra, se colocou etanol a 96%. De seguida, a mistura foi colocada ao abrigo da luz durante 15 minutos, foi agitada e, por fim, a absorvância foi lida no espectrofotômetro a 517 nm. Os dados foram expressos em mmol de T equivalente a 100 ml de cada solução ou 100 g de filme, através das fórmulas descritas em anexo (tabelas A2 e A3).

3.2.3. Propriedades antimicrobianas

A análise da AAM para *S. cerevisiae*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, foi feita através do método de difusão do disco, usado por Sukantha *et al.* (2012), no qual são utilizados discos esterilizados (Filtres Fioroni; Dimension= 6 mm). Com a ajuda do Standart McFarland 0.5 (150×10^6 UFC por 1 ml) (bioMérieux® SA), foi usada a solução de Ringer (Merck) para fazer a suspensão mãe. Essa suspensão mãe foi usada para semear as placas de Petri em forma de tapete, com os diferentes microrganismos, com a ajuda de uma zaragatoa. Para as soluções, as placas foram divididas em três partes: a solução a 100% e as soluções a 25 e 10%. Para os filmes, as placas foram divididas em duas partes.

Nas placas onde se estudaram as soluções, foram colocados discos estéreis impregnados com 20 µl de cada solução (PIT, SSC e SCC com respetivas diluições). Relativamente aos filmes (FSC e FCC), estes foram cortados com um furador esterilizado com 7 mm de diâmetro e colocados na placa de Petri (Coma *et al.*, 2002). Para cada amostra, foram feitas 3 réplicas.

Placas com *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram colocadas na estufa a 37 °C durante 24 h, enquanto as placas com *S. cerevisiae* foram colocadas na estufa a 25 °C durante 7 dias. A sensibilidade

dos microrganismos foi descrita como resistente (< 8 mm), sensível (9-14 mm), muito sensível (15-19 mm) e extremamente sensível (> 20 mm) (Ponce *et al.*, 2003).

3.2.4. Análise estatística

A análise estatística para os valores de compostos fenólicos totais, flavonoides, capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana, foi feita através da sua média e desvio-padrão no Excel©.

3.3. Resultados

3.3.1. Compostos fenólicos totais

De acordo com as metodologias descritas nas seções dos compostos fenólicos totais, flavonoides e capacidade antioxidante, obtiveram-se os seguintes resultados para a PIT (tabela 3.1) e respectivas curvas de calibração (figuras A1, A2 e A3):

Tabela 3.1. CFT, Flav e CAOX na PIT.

	CFT (mg EAG/100 g de PIT)	Flav (mg EQ/100 g de PIT)	CAOX (mmol ET/100 g de PIT)
PIT <i>(Lupinus angustifolius)</i>	307.41 ± 31.98*	20.56 ± 1.60*	9.38 ± 1.17*

* Média ± desvio-padrão: CFT, Flav e CAOX.

As médias e desvio-padrão para a solução sem carvacrol (SSC) e solução com carvacrol (SCC) foram, respetivamente, 132.10 ± 17.21 mg EAG/100 ml de solução e 744.95 ± 10.38 mg/100 ml de solução (figura 3.1). As respetivas curvas de calibração de cada solução estão inseridas em anexo (figuras A4 e A5).

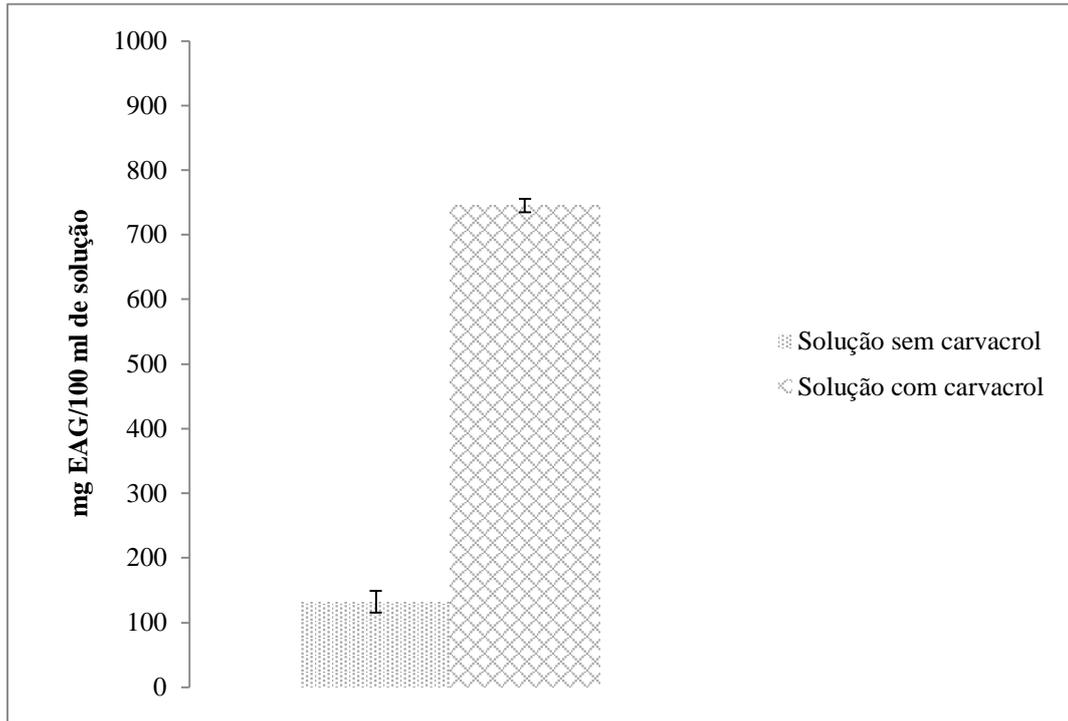


Figura 3.1. Compostos fenólicos totais (mg EAG/100 ml de solução) na SSC e SCC.

Para o filme sem carvacrol (FSC) e filme com carvacrol (FCC), as médias e desvio-padrão tiveram valores de 144.94 ± 3.76 mg EAG/100 g de filme e 2843.43 ± 86.04 mg EAG/100 g de filme, respetivamente (figura 3.2). Em anexo estão inseridas as respetivas curvas de calibração para cada filme (figuras A6 e A7).

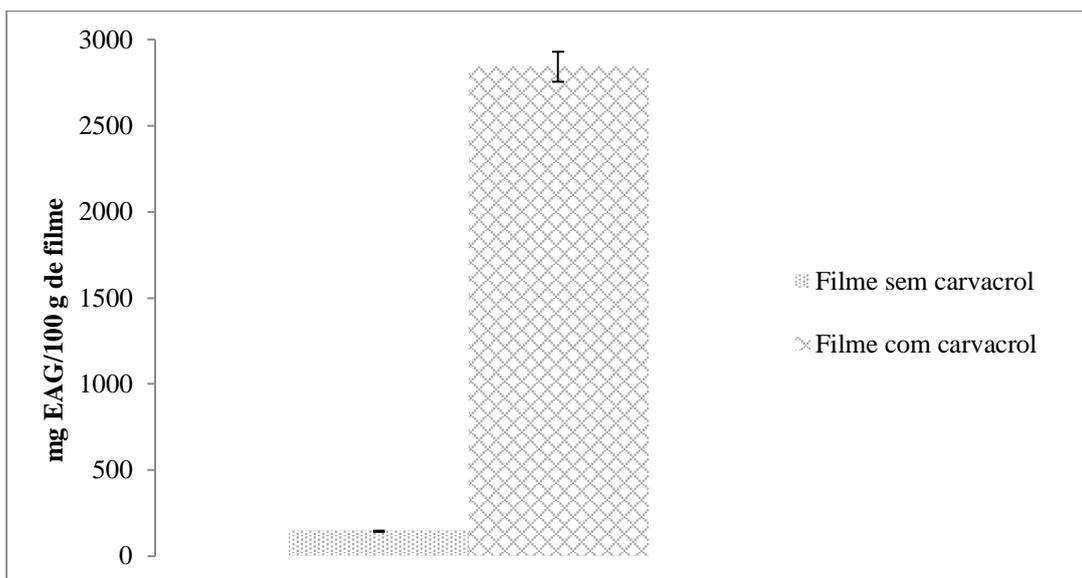


Figura 3.2. Compostos fenólicos totais (mg EAG/100 g de filme) existentes no FSC e FCC

3.3.2. Flavonoides

Relativamente às médias e desvio-padrão da solução sem carvacrol (SSC) e solução com carvacrol (SCC), foram obtidos valores de 11.97 ± 1.48 mg EQ/100 ml de solução e 33.48 ± 2.21 mg EQ/100 ml de solução, respetivamente (figura 3.3). As figuras A8 e A9, em anexo, são referentes às curvas de calibração de cada solução.

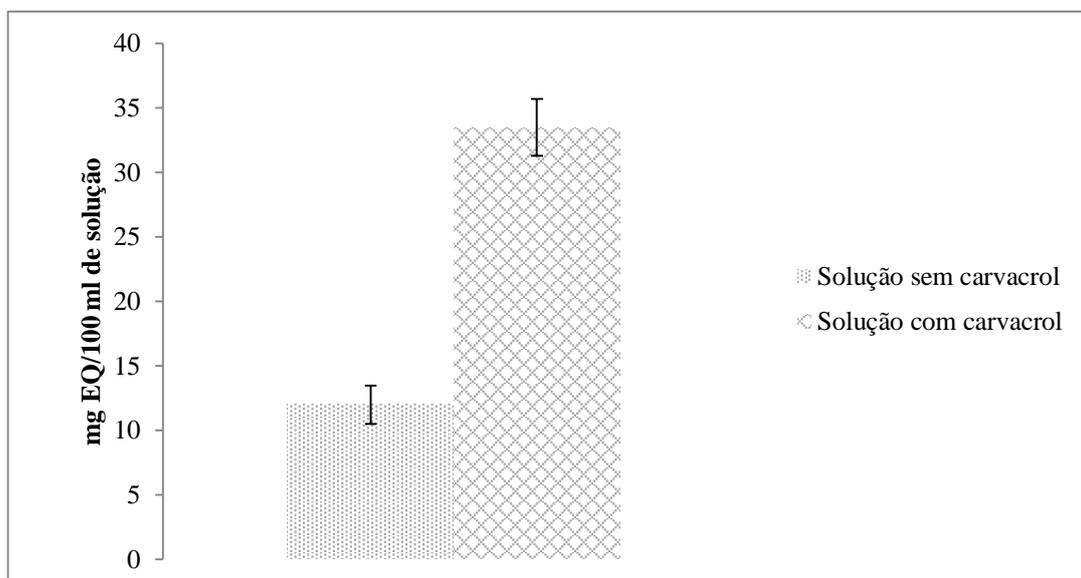


Figura 3.3. Flavonoides (mg EQ/100 ml de solução) em SSC e SCC.

Os valores das médias e desvio-padrão do filme sem carvacrol (FSC) e filme com carvacrol (FCC) foram, respectivamente 38.94 ± 10.78 mg EQ/100 g de filme e 104.74 ± 6.01 mg EQ/100 g de filme (figura 3.4). Em anexo (figuras A10 e A11), estão as curvas de calibração de cada filme.

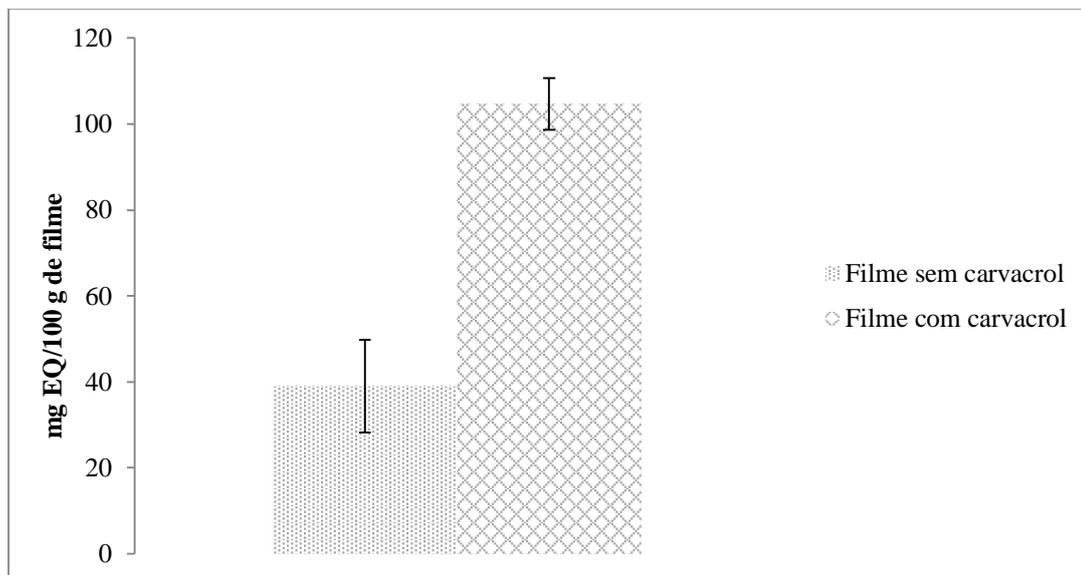


Figura 3.4. Flavonoides (mg EQ/100 g de filme) existentes no FSC e no FCC.

3.3.3. Capacidade antioxidante

As médias e desvio-padrão para a solução sem carvacrol (SSC) e solução com carvacrol (SCC) foram 30.21 ± 3.59 mmol ET/100 ml de solução e 89.21 ± 5.74 mmol ET/100 ml de solução, respectivamente (figura 3.5). As figuras A12 e A13, em anexo, referem-se às curvas de calibração de cada solução.

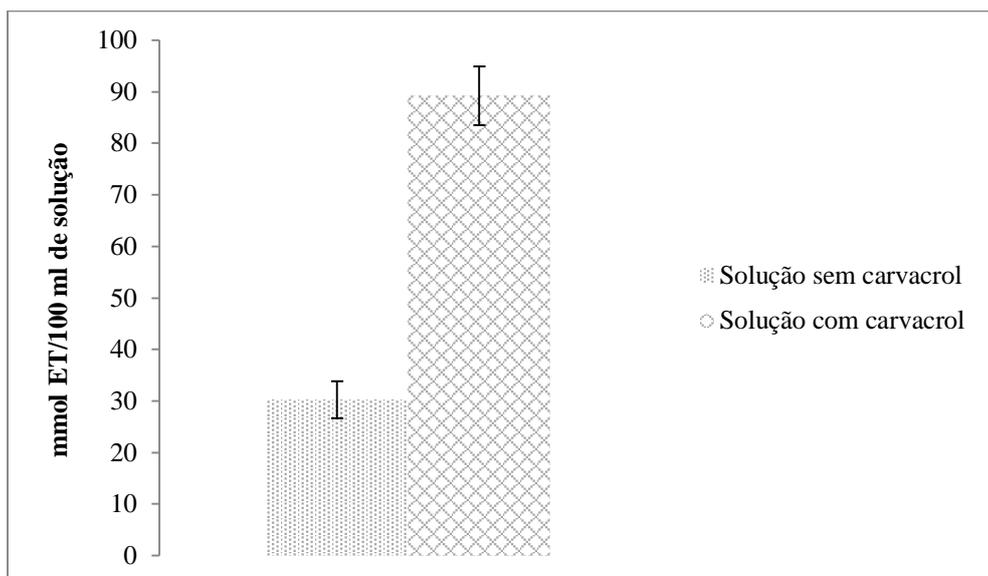


Figura 3.5. CAOX (mmol ET/100 ml de solução) em cada solução.

No filme sem carvacro (FSC) e filme com carvacrol (FCC), as médias e desvio-padrão foram, respectivamente, 31.16 ± 3.29 mmol ET/100 g de filme e 206.03 ± 31.18 mmol ET/100 g de filme (figura 3.6). Em anexo, figuras A14 e A15, estão representadas as curvas de calibração de cada filme.

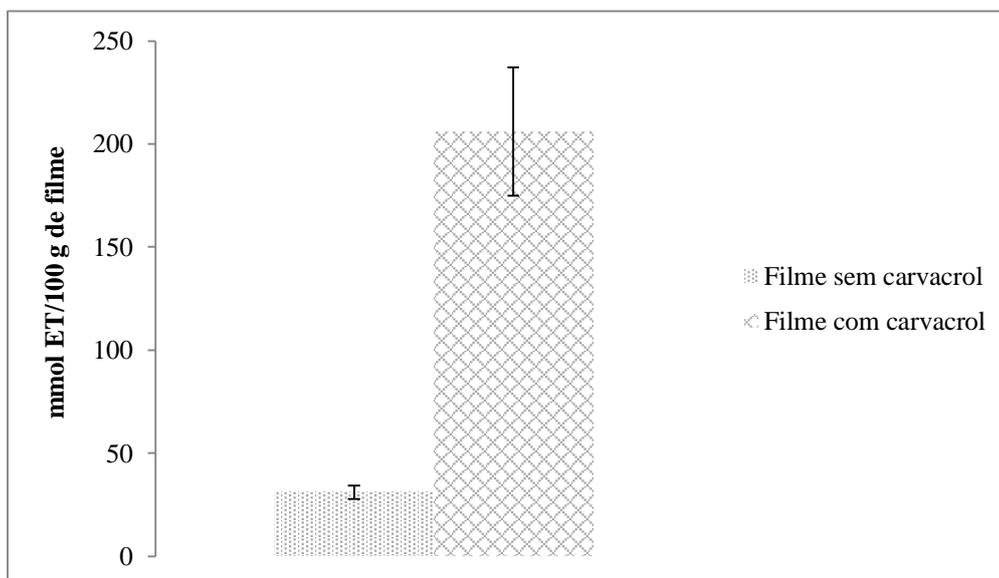


Figura 3.6. CAOX (mmol ET/100 g de filme) no FSC e FCC.

3.3.4. Atividade antimicrobiana

Os resultados da AAM, por parte do FSC, FCC, PIT, SSC e SCC, estão descritas na tabela 3.2 para uma levedura (*S. cerevisiae*), uma bactéria Gram positiva (*S. aureus*) e uma bactéria Gram negativa (*P. aeruginosa*). As figuras 3.7 a 3.11 demonstram a atividade antimicrobiana da PIT, SSC, SCC, FSC e FCC, respetivamente.

Tabela 3.2. Atividade antimicrobiana, expressa como o diâmetro da zona de inibição (mm) de PIT (100%, 25% e 10%), SSC (100%, 25% e 10%), SCC (100%, 25% e 10%), FSC e FCC contra *S. cerevisiae*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. (Média \pm desvio-padrão, n= 3).

Soluções	Halos de inibição * (mm)		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
PIT 100%	0	0	0
PIT 25%	0	0	0
PIT 10%	0	0	0
SSC 100%	0	0	0
SSC 25%	0	0	0
SSC 10%	0	0	0
SCC 100%	9.67 \pm 2.08 *	9.33 \pm 1.15 *	8.33 \pm 0.58 *
SCC 25%	8.33 \pm 0.58 *	0	0
SCC 10%	0	0	0
FSC	0	0	0
FCC	10 \pm 2.65 *	9 \pm 1.00 *	0

* Média \pm desvio-padrão; PIT (Proteína isolada do tremço), SSC (Solução sem carvacrol), SCC (Solução com carvacrol), FSC (Filme sem carvacrol) e FCC (Filme com carvacrol).

3.4. Discussão

Os compostos fenólicos estão presentes em todas as partes vegetativas das plantas, sendo a sua existência muito comum na natureza (Lampart-Szczapa *et al.*, 2003) e, para além de estarem envolvidos no crescimento e na reprodução das plantas, também têm a capacidade de utilizá-las contra várias doenças e microrganismos (Ross & Kasum, 2002) contribuindo, também, nas atividades AOX globais das plantas, inibindo os radicais livres (Uchegbu, 2015).

Relativamente à PIT utilizada neste trabalho (tabela 3.1), o teor em compostos fenólicos foi de 307.41 mg EAG/100 g de PIT enquanto, no trabalho de Siger *et al.* (2012), onde usaram a mesma espécie de tremço mas com diferentes cultivos (Zeus e Bojar), obtiveram valores entre 258 e 269 mg EAG/100 g respetivamente, de semente e não de proteína isolada, sendo estes valores naturalmente menores que os obtidos para a PIT. Martínez-Villaluenga *et al.* (2009), nos cultivos Troll e Emir de *L. angustifolius*, obtiveram valores de 223 mg EAF/100 g de

semente e 253 mg EAF/100 g de semente respectivamente. Para a proteína isolada do tremçoço, não foram encontradas publicações sobre estes compostos.

Wang and Clements (2008), também analisaram compostos fenólicos presentes em sementes de tremçoço e expressaram-nos como equivalentes a ácido gálico. De acordo com estes autores, o teor de compostos fenólicos em *L. angustifolius* variou entre 535.1 a 578.4 mg EAG/100 g de sementes.

Em estudos anteriores realizados por Lampart-Szczapa *et al.* (2003), foi obtida uma maior quantidade de compostos fenólicos nas cotiledóneas do que no episperma. Foi demonstrado que o maior teor de compostos fenólicos ocorreu em dois cultivos amargos de *L. albus* (cultivo Bac) e de *L. angustifolius* (cultivo Mirela). No *L. angustifolius*, a quantidade de compostos fenólicos nas cotiledóneas foi de 187.8 mg EAC/100 g de extrato enquanto no episperma foi de 28.8 mg EAC/100 g de extrato.

No estudo feito pela empresa fornecedora de PIT de *L. angustifolius*, foi reportada a obtenção de 80 mg EAG/100 g de PIT, tendo sido um valor muito inferior ao obtido neste estudo.

No FSC, o valor dos compostos fenólicos foi de 144.94 mg EAG/100 g de filme, tendo sido um pouco mais baixo do que o valor da PIT devido, talvez, à existência do glicerol.

Yuan *et al.* (2015), no trabalho onde desenvolveram filme de quitosano, obtiveram valores de aproximadamente de 500 mg EAG/100 g de extrato. Provavelmente, este número mais elevado de compostos fenólicos, comparativamente ao FSC, deve-se ao fato de o quitosano já possuir propriedades antimicrobianas conhecidas (Tripathi *et al.*, 2009).

No FCC, após a adição de carvacrol, o teor de compostos fenólicos aumentou de 144.94 mg/100 g para 2843.43 mg/100 g.

Como referido em 3.1, o carvacrol é um forte agente antioxidante e antimicrobiano (Arfa *et al.*, 2006; López-Mata *et al.*, 2013). No trabalho de Yuan *et al.* (2015), após adicionarem carvacrol no filme de quitosano, obtiveram valores de compostos fenólicos de, aproximadamente, 7000 mg EAG/100 g de extrato, ou seja, com a adição do carvacrol a quantidade dos compostos fenólicos aumentou drasticamente, tal como ocorreu no caso do FCC, podendo ter uma maior atividade antioxidante e antimicrobiana.

Após a análise do FSC, FCC e PIT, foram analisadas as soluções que deram origem aos filmes, expectando-se que os valores de fenólicos para SSC não fossem idênticos aos da PIT mas sim um pouco inferiores, uma vez que a solução estava diluída (132.10 mg EAG/100 ml de solução). Pelo contrário, na SCC houve um grande aumento na quantidade de fenólicos (744.95 mg EAG/100 ml de solução), mas não quando comparados com os valores obtidos pelo FCC. Em relação aos flavonoides, a PIT (tabela 3.1) obteve um valor de 20.56 mg EQ/100 g de PIT.

No FSC a quantidade de flavonoides foi de 38.94 mg EQ/100 g de filme e no FCC, onde houve adição de carvacrol, obteve-se uma quantidade de 104.74 mg EQ/100 g de filme de flavonoides. A SSC obteve um valor de 11.97 mg EQ/100 ml de solução enquanto na SCC obteve-se uma quantidade de 33.48 mg EQ/100 ml de solução.

Os flavonoides formam um grande grupo de produtos naturais, sendo encontrados em vários tecidos de plantas, tanto no interior das células como à superfície de diferentes órgãos da planta (Stobiecki & Kachlicki, 2006).

Siger *et al.* (2012) identificaram o total de flavonoides existentes em cada cultivo de *L. angustifolius* e obtiveram um valor de 73.13 mg EV/100 g de extrato no cultivo de Bojar e 68.74 mg EV/100 g de extrato no cultivo de Zeus, não estando muito próximos dos valores obtidos na PIT.

De acordo com Martínez-Villaluenga *et al.* (2009), dois cultivos diferentes de *L. angustifolius* (Troll e Emir) foram analisados e os valores variaram entre 13.3 mg EC/100 g de extrato e 36.2 mg EC/100 g de extrato, respectivamente, estando os valores do cultivo Troll relativamente próximos aos obtidos pela PIT. Mas, ao analisarem o cultivo de *L. albus* (Multolupa), obtiveram valores muito superiores (110 mg EC/100 g de extrato).

De acordo com os valores obtidos, denota-se que a quantidade de flavonoides no FSC e SSC foi relativamente baixa mas, após a colocação de carvacrol, tanto o FCC como a SCC tiveram um grande aumento de flavonoides, comparando com FSC e SSC, respectivamente.

Relativamente à capacidade antioxidante, consegue-se observar que existe alguma capacidade no FSC (31.16 mmol ET/100 g de filme) enquanto, após adição de carvacrol no filme, a capacidade antioxidativa intensificou (206.03 mmol ET/100 g de filme). Este resultado vai de acordo com o obtido por López-Mata *et al.* (2013) onde filmes de quitosano com carvacrol aumentaram a sua atividade antioxidante, comparativamente com o filme apenas de quitosano e, como usaram diferentes concentrações de carvacrol (0.5%, 1% e 1.5%), a sua atividade aumentou consoante o aumento da concentração.

No trabalho desenvolvido por Yuan *et al.* (2015), no filme apenas de quitosano obtiveram valores abaixo de 10 mmol E FeSO₄-7H₂O/100 g enquanto, após a adição de carvacrol, o filme possuiu valores de, aproximadamente, 30 mmol E FeSO₄-7H₂O/100 g.

A PIT (tabela 3.1), neste estudo, possuiu pouca capacidade antioxidante (9.38 mmol ET/100 g de PIT). De acordo com a empresa de fornecimento da PIT, o valor da capacidade antioxidante foi de 17 mmol ET/100 g de PIT, tendo tido um valor um pouco mais elevado do que o obtido neste estudo.

Tal como acontece no FCC, ao adicionar carvacrol na solução (SCC) a capacidade antioxidativa aumenta. Vários estudos afirmam que o carvacrol e os seus derivados possuem atividade antioxidante (e.g.: Mastelić *et al.*, 2008; López-Mata *et al.*, 2013), sendo essa capacidade dependente do efeito estérico e eletrónico do seu anel e, também, da existência do grupo hidroxilo que consegue doar átomos de hidrogénio (Mastelić *et al.*, 2008).

De acordo com os resultados obtidos, no FSC não foi observada nenhuma AAM, ao contrário do FCC que já apresentou alguma AAM em *S. cerevisiae* e em *S. aureus*, por ter sido incorporado com um agente antimicrobiano. Tanto a *S. cerevisiae* como a *S. aureus* foram consideradas sensíveis. Para a *P. aeruginosa*, não houve nenhuma AAM, indicando que é mais resistente.

No geral, as bactérias Gram positivas são consideradas mais sensíveis do que as Gram negativas, devido à diferente estrutura das suas paredes celulares. A parede celular das Gram negativas possui uma camada de lipopolissacarídeos (LPS), que evita a entrada tanto de compostos hidrofóbicos como hidrofílicos (e.g.: compostos antimicrobianos) (Ouattara *et al.*, 1997; Kanmani and Rhim, 2014)

No trabalho de Yuan *et al.* (2015), o filme desenvolvido apenas por quitosano também não demonstrou nenhuma AAM mas, pelo contrário, quando adicionaram agentes antimicrobianos, tanto a bactéria Gram positiva (*S. aureus*) como a bactéria Gram negativa (*Escherichia coli*) tiveram halos de inibição de 12.33 e 11.33 mm, respetivamente, sendo considerados sensíveis. Neste mesmo estudo, onde também adicionaram casca de romã no filme, verificaram que, juntamente com o carvacrol, a sensibilidade por parte de *S. aureus* aumentou comparativamente ao filme com apenas a adição de carvacrol (16.50 mm), sendo considerada muito sensível.

Também no trabalho desenvolvido por Kanmani and Rhim (2014), foram obtidos resultados semelhantes aos do presente estudo. Estes autores também não obtiveram qualquer AAM por parte do filme composto apenas por carragenina. Porém, após a adição de extrato de semente de uva, o filme teve a capacidade de inibir todos os microrganismos em estudo (bactérias Gram positivas e negativas) e verificaram também que, à medida que a concentração de extrato de uva aumentava, a zona de inibição também aumentava.

No estudo com filme de proteína do soro de leite, adicionaram diferentes concentrações (1%, 2%, 3% e 4%) de óleo essencial do orégão e compararam com o filme sem a adição do óleo. Verificaram que o filme sem adição de óleo não teve qualquer AAM contra nenhum dos microrganismos, enquanto, com apenas uma concentração de 2% do óleo é que ocorreu

inibição de todos os microrganismos. O maior halo de inibição foi exibido a uma concentração de 4% (Seydim & Sarikus, 2006).

Relativamente à solução de PIT e de SSC, não se verificou inibição do crescimento de nenhum microrganismo. Já na SCC, constatou-se inibição em todos os microrganismos e apenas na *S. cerevisiae* ocorreu inibição também a 25% da solução, o que não aconteceu nas duas bactérias. Isto poderá significar que a entrada do agente antimicrobiano pode ser mais fácil em leveduras do que em bactérias Gram positivas ou negativas, visto os óleos essenciais terem um efeito inibidor no crescimento micelial dos fungos (Özcan *et al.*, 2005).

No estudo onde usaram a solução de quitosano e outra de tapioca, verificaram que a bactéria ácido láctico (*Lactobacillus* spp.) foi muito sensível na solução de quitosano, com um halo de 17 mm, enquanto a solução de tapioca não conseguiu inibir o crescimento da bactéria (Vásquez *et al.*, 2009).

De acordo com Ponce *et al.* (2008), ao usarem a solução de quitosano, obtiveram uma pequena inibição (8.75 mm) da bactéria *Listeria monocytogenes* enquanto a solução de caseína e de celulose carboximetil não demonstrou inibição significativa. Apenas quando combinaram a solução de quitosano e de celulose carboximetil com o óleo de alecrim, é que *L. monocytogenes* foi muito sensível (15 mm) e sensível (9.50 mm), respetivamente. As combinações da solução de caseína com os vários óleos, pelo contrário, não teve atividade inibitória contra a bactéria.

A interação dos compostos ativos de plantas, com a membrana citoplasmática dos microrganismos, tem a capacidade de interferir, negativamente, no processo de transdução de sinal da membrana, prejudicando, assim, a função de algumas proteínas membranares e causando mudanças na permeabilidade, modificando a estrutura e composição da parede celular, acabando por destruí-la (Gustafson *et al.*, 1998; Ultee *et al.*, 2002).

Em relação à bactéria *S. aureus*, os compostos fenólicos do carvacrol interferem com as suas características fisiológicas tais como: 1) permeabilidade da membrana citoplasmática; 2) tolerância ao sal; 3) atividade da coagulase e 4) produção da enterotoxina (Souza *et al.*, 2013). A capacidade de produção de enterotoxinas por parte de várias bactérias, também pode ser anulada com o uso de carvacrol, existindo duas possíveis teorias: a) se a excreção da toxina for um processo ativo, pode existir insuficiente ATP disponível para exportá-la da célula; b) a pequena taxa de crescimento pode significar que as células estão a usar toda a energia disponível para conseguir sustentar a viabilidade e, por isso, deixam pouca energia para a produção de toxina (Ultee and Smid, 2001).

Na *S. cerevisiae*, tanto na SCC como no FCC não houve diferenças significativas. Já em *S. aureus* e *P. aeruginosa*, houve diferenças entre a SCC e o FCC, não tendo existido inibição para a *P. aeruginosa* por parte do FCC. Quando se compara a inibição da solução e do filme, é conhecido que, com soluções a inibição costuma ser maior pois, na solução, o carvacrol está mais disponível para atuar como um agente antimicrobiano. Pelo contrário, quando o carvacrol faz parte de um filme biodegradável, permanece mais compacto na matriz do filme, sendo difícil a sua libertação reduzindo, assim, a sua capacidade antimicrobiana (Zivanovic *et al.*, 2005). De acordo com Vásconez *et al.* (2009), a AAM depende da técnica de aplicação e, neste estudo, a SCC foi mais eficiente do que o FCC, tal como ocorreu no estudo dos autores referidos.

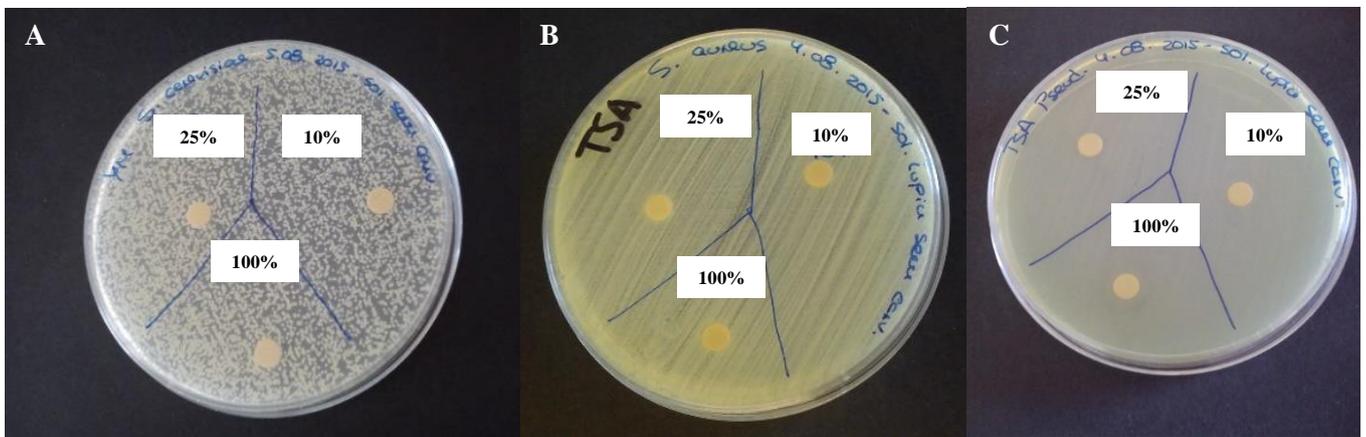


Figura 3.7. Atividade antimicrobiana da PIT em *S. cerevisiae* (A), *S. aureus* (B) e *P. aeruginosa* (C)

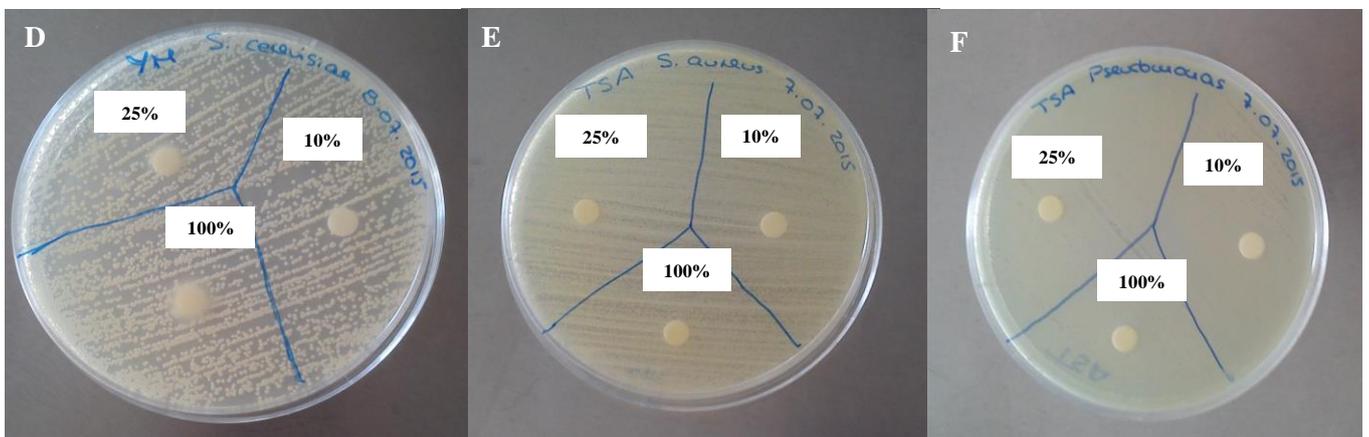


Figura 3.8. Atividade antimicrobiana da SSC em *S. cerevisiae* (D), *S. aureus* (E) e *P. aeruginosa* (F)

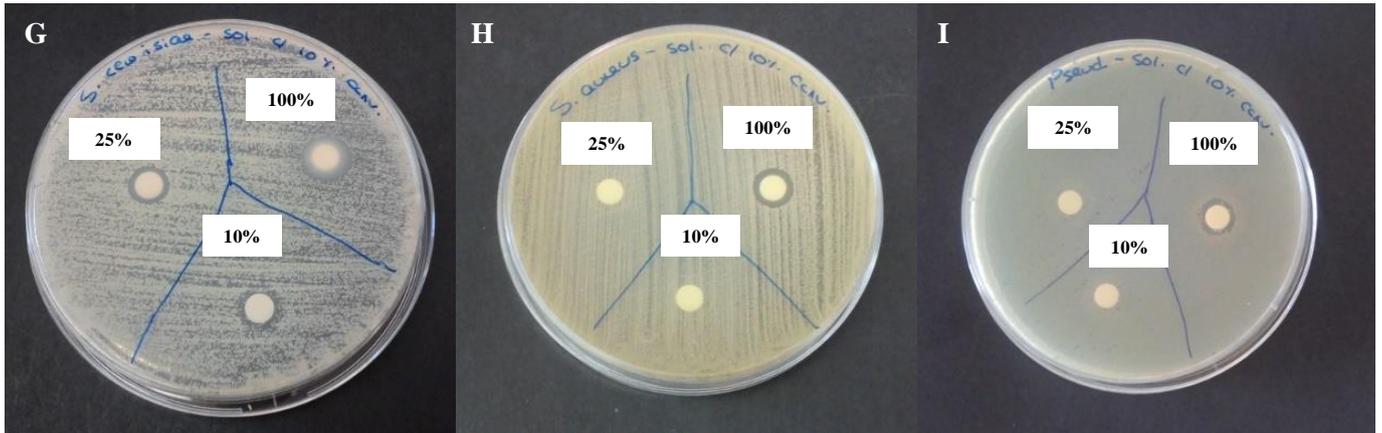


Figura 3.9. Atividade antimicrobiana da SCC em *S. cerevisiae* (G), *S. aureus* (H) e *P. aeruginosa* (I)



Figura 3.10. Atividade antimicrobiana do FSC em *S. cerevisiae* (J), *S. aureus* (K) e *P. aeruginosa* (L)



Figura 3.11. Atividade antimicrobiana do FCC em *S. cerevisiae* (M), *S. aureus* (N) e *P. aeruginosa* (O)

3.5. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, os valores dos CFT, Flav e CAOX não foram muito elevados apenas com a proteína isolada do tremço mas, quando se adicionou carvacrol, ocorreu um aumento considerável de todos estes parâmetros, devido a este ser considerado um composto ativo.

Relativamente à atividade antimicrobiana tanto na solução como no filme sem carvacrol, SSC e FSC respetivamente, foi inexistente para todos os microrganismos. Para a solução e filme com carvacrol (SCC e FCC, respetivamente), já foi possível observar inibição em todos os microrganismos mas, no caso do FCC, apenas a *P. aeruginosa* é que possuiu resistência a este agente antimicrobiano.

4. Conclusões gerais

Foi possível desenvolver e otimizar um filme de PIT com a seguinte composição: 1.98 g de proteína, 1.51 g de glicerol e 18.5 ml de água (8.98%, 6.88% e 84.15%, respectivamente) tendo apresentado alguma flexibilidade.

A partir da validação das respostas, concluiu-se que em L , teor de humidade e força de punção não existem grandes diferenças em relação ao previsto pelo modelo. Já em b e na espessura existiram diferenças significativas entre o obtido experimentalmente e o previsto, visto estar fora do erro-padrão. Dado o valor de b ter sido maior que o previsto, tal contribuiu para um filme mais amarelo. Neste caso, como o filme obteve uma cor amarela, poderia ser usado em alimentos de cor idêntica (e.g.: queijo) de modo a serem comercializados e mais facilmente aceites pelo consumidor. O fato de o filme experimental ter obtido valores de espessura mais baixos que o previsto, também poderá contribuir para uma melhor aceitação do produto final. Em relação à quantidade de CFT, Flav e CAO, os valores apenas aumentaram consideravelmente quando houve adição de um composto considerado bioativo.

A nível da microbiologia, a AAM exibida por parte do filme de proteína do tremoço foi inexistente e, por isso, para se conseguir obter um filme de PIT com atividade antimicrobiana, é necessária a adição de agentes antimicrobianos.

A incorporação direta de óleos essenciais nos alimentos, apesar de ter um efeito mais rápido na inibição de microrganismos, poderá modificar algumas características sensoriais (e.g.: cheiro e sabor). Pelo contrário, a incorporação de óleos essenciais no filme poderá não ter um impacto negativo tão grande no que diz respeito às propriedades sensoriais, apesar de a libertação do agente antimicrobiano ser limitado, por estar retido na matriz do filme. Neste estudo, tanto a SCC como o FCC inibiram todos os microrganismos, à exceção da *P. aeruginosa* por parte do FCC. A inexistência de inibição por parte desta bactéria, deve-se pelo fato de ser considerada uma bactéria gram negativa possuindo, assim, mais resistência aos agentes antimicrobianos.

Este filme desenvolvido à base de proteína do tremoço poderá ser usado para sistemas de embalagens ativas, com vista a melhorar o tempo de prateleira dos alimentos, ser consumível e biodegradável, sendo estas duas últimas características devidas à sua natureza ecológica.

5. Perspetivas de trabalhos futuros

Para futuros trabalhos, o FSC deveria ser estudado relativamente a outras propriedades físico-mecânicas (e.g.: solubilidade, permeabilidade ao O₂ e CO₂, entre outras). Relativamente ao FCC, este poderia ser analisado em diferentes tipos de alimentos (e.g.: queijo) para se conhecer o seu tempo de prateleira e poderá, também, ser testado com diferentes concentrações de carvacrol ou com um outro agente antimicrobiano (e.g.: grainha de uva).

Como este filme é considerado um filme biodegradável, seria benéfico conhecer qual o tempo que leva a degradar-se totalmente. Por último, deverão ser realizados estudos de outras propriedades físico-mecânicas (e.g.: solubilidade, permeabilidade ao O₂ e CO₂, entre outras) e testes para melhorar as propriedades de termoselagem do filme, visto a PIT não suportar a termoselagem.

6. Referências bibliográficas

- Abe, K., and Watada, A. E. (1991). Ethylene absorbent to maintain quality of lightly processed fruits and vegetables. *Journal of Food Science*, 56, 1589-1592.
- Abbott, J. A. (1999). Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 15, 207, 225.
- Aïnouche, A-K., and Bayer, R. J. (1999). Phylogenetic relationships in *Lupinus* (Fabaceae: Papilionoideae) based on Internal Transcribed Spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany*, 86, 590-607.
- Almenar, E., Catala, R., Hernandez-Muñoz, P., and Gavara, R. (2009). Optimization of an active package for wild strawberries based on the release of 2-nonanone. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 587-593.
- Alves, V., Costa, N., Hilliou, L., Larotonda, F., Gonçalves, M., Sereno, A., and Coelho, I. (2006). Design of biodegradable composite films for packaging. *Desalination*, 199, 331-333.
- Anderson, M. J., and Whitcomb, P. J. (1996). Optimization of paint formulations made easy with computer-aided design of experiments for mixtures. *Journal of Coatings Technology and Research*, 68, 71-75.
- Anderson, M. J., and Whitcomb, P. J. (1999). Computer-aided tools for optimal mixture design. *PCI Paint Coatings Industry Magazine*, 15, 68.
- Andrady, A. L., and Xu, P. (1997). Elastic behavior of chitosan films. *Journal of Polymer Science*, 5, 307-321.
- Archer, B. J., Johnson, S. K., Devereux, H., M., and Baxter, A. L. (2004). Effect of fat replacement by inulin or lupin-kernel fibre on sausage patty acceptability, post-meal perceptions of satiety and food intake in men. *British Journal of Nutrition*, 91, 591-599.
- Arfa, A. B., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., and Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 149-154.

- Ayranci, E., and Tunc, S. (2003). A method for the measurement of the oxygen permeability and the development of edible films to reduce the rate of oxidative reactions in fresh foods. *Food Chemistry*, 80, 423-431.
- Azeredo, H. M. C. (2012). Edible coatings. In: *Advances in fruit processing technologies*, eds. Rodrigues, S. and Fernandes, F. A. N., 345-361. Florida: CRC Press – Taylor & Francis Group.
- Bai, H., Xu, J., Liao, P., and Liu, X. (2012). Mechanical and water barrier properties of soy protein isolate film incorporated with gelatin. *Journal of Plastic Film and Sheeting*, 29, 174-188.
- Bamdad, F., Goli, A. H., and Kadivar, M. (2006). Preparation and characterization of proteinous film from lentil (*Lens culinaris*) – Edible film from lentil (*Lens culinaris*). *Food Research International*, 39, 106-111.
- Barreto, P. L. M., Piresm A. T. N., and Soldi, V. (2003). Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polymer Degradation and Stability*, 79, 147-152.
- Bastioli, C. (2005). Handbook of biodegradable polymers. Shawbury, UK: Rapra Technology Limited. ISBN: 1-85957-389-4.
- Beck, M. I., Tamka, I., and Waysek, E. (1996). Physic-chemical characterization of zein as a film coating polymer – a direct comparison with ethyl cellulose. *International Journal of Pharmaceutics*, 141, 137-150.
- Bhardwaj, H. L., Hamama, A. A., and Merrick, L. C. (1998). Genotypic and environmental effects on lupin seed composition. *Plant Foods for Human Nutrition*, 53, 1-13.
- Bier, J. M., Verbeek, C. J. R., and Lay, M. C. (2014). Thermal transitions and structural relaxations in protein-based thermoplastics. *Macromolecular Materials and Engineering*, 299, 524-539.
- Bordes, P., Pollet, E., and Avérous, L. (2009). Nano-biocomposites: biodegradable polyester/nanoclay systems. *Progress in Polymer Science*, 34, 125-155.
- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15, 237-248.
- Bourtoom, T. (2009). Edible protein films: properties enhancement. *International Food Research Journal*, 16, 1-9.
- Brito, G. F., Agrawal, P., Araújo, E., M., and Mélo, T. J. A. (2011). Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 6, 127-139.
- Brody, A. L., Strupinsky, E. R., and Kline, L. R. (2001). Active packaging for food applications. Lancaster: Technomic Publishing Co., Inc. 1-223 p. ISBN: 1-58716-045-5.
- Butler, B. L., Vergano, P. J., Testin, J. M., Bunn, J. M., and Wiles, J. L. (1996). Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. *Journal of Food Science*, 61, 953–955.
- Campos, C. A., Gerschenson, L. N., and Flores, S. K. (2010). Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 849-875.
- Carvalho, R. A., and Grosso, C. R. F. (2006). Properties of chemically modified gelatin films. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23, 45-53.
- Castillo, F., Hernández, D., Gallegos, G., Rodríguez, R., and Aguilar, C. N. (2012). Antifungal properties of bioactive compounds from plants. In: *Fungicides for plant and animal diseases*, ed. Dhanasekaran, D., Shanghai, China.

- Cerqueira, M. A., Lima, A. M., Teixeira, J. A., Moreira, R. A., and Vicente, A. A. (2009). Suitability of novel galactomannans as edible coatings for tropical fruits. *Journal of Food Engineering*, 94, 372-378.
- Chen, H. (1995). Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 78, 2563-2583.
- Chludil, H. D., Vilariño, M. P., Franco, M. L., and Leicach, S. R. (2009). Changes in *Lupinus albus* and *Lupinus angustifolius* alkaloid profiles in response to mechanical damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6107-6113.
- Cho, S. Y., and Rhee, C. (2002). Sorption Characteristics of Soy Protein Films and their Relation to Mechanical Properties. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 35, 151-157.
- Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F., and Deschamps, A. (2002). Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal of Food Science*, 67, 1162-1169.
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78, 90-103.
- Contini, C., Katsikogianni, M. G., O'Neill, F. T., O'Sullivan, M., Dowling, D. P., and Monahan, F. J. (2011). Development of active packaging containing natural antioxidants. *Procedia Food Science*, 1, 224-228.
- Dainelli, D., Gontard, N., Spyropoulos, D., den Beuken, E. Z., and Tobback, P. (2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 103-112.
- Dangaran, L. K., and Krochta, M. J. (2007). Preventing the loss of tensile, barrier and appearance properties caused by 60utilization 60utilization60ion in whey protein films. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 1094–1100.
- Dangaran, K., Tomasula, P. M., and Qi, P. (2009). Structure and function of protein-based edible films and coatings. In: *Edible films and coatings for food applications*, eds. Embuscado, M. E., and Huber, K. C., 25-56. New York: Springer.
- De Cortes Sánchez, M., Altares, P., Pedrosa, M. M., Burbano, C., Cuadrado, C., Goyoaga, C., Muzquiz, M., Jiménez-Martínez, C., and Dávila-Ortiz, G. (2005). Alkaloid variation during germination in different lupin species. *Food Chemistry*, 90, 347-355.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., and Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 299-313.
- Dervas, G., Doxastakis, G., Hadjisavva-Zinoviadi, S., and Triantafillakos, N. (1999). Lupin flour addition to wheat flour doughs and effect on rheological properties. *Food Chemistry*, 66, 67-73.
- Dijkstra, D. S., Linnemann, A. R., and van Boekel, T. A. S. (2003). Towards sustainable production of protein-rich foods: appraisal of eight crops for western Europe. Part II: analysis of the technological aspects of the production chain. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 481-506.
- Djeridane A., Yousfi, M., Nadjemi B., Boutassaouna D., Stocher P., and Vidal N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654-660.
- Dikey, L. C., Parris, N., Craig, J. C., and Kurantz, M. Z. (2001). Ethanol extraction of zein from maize. *Industrial Crops and Products*, 13, 67-76.
- Dobrucka, R., and Cierpiszewski, R. (2014). Active and intelligent packaging food – research and development – a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 64, 7-15.

- Drummond, C. S., Eastwood, R. J., Miotto, S. T. S., and Hughes, C. E. (2012). Multiple continental radiations and correlates of diversification in *Lupinus* (Leguminosae): testing for key innovation with incomplete taxon sampling. *Systematic Biology*, 61, 443-460.
- Dureja, H., Khatak, S., Khatak, M., and Kalra, M. (2011). Amylose rich starch as an aqueous based pharmaceutical coating material – review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 3, 8-12.
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., and Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114, 1173-1182.
- Dx6 (2005). *Design-Expert software, version 6.0.11*. Minneapolis:State-Ease.
- El-Adawy, T. A., Rahma, E. H., El-Bedawey, A. A., and Gafar, A. F. (2001). Nutritional potential and functional properties of sweet and bitter lupin seed protein isolates. *Food Chemistry*, 74, 455-462.
- Fan, X. H., Tang, C., and Rengel, Z. (2002). Nitrate uptake, nitrate reductase distribution and their relation to proton release in five nodulated grain legumes. *Annals of Botany*, 90, 315-323.
- Foegeding, E. A., Davis, J. P., Doucet, D., and McGuffey, M. K. (2002). Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 151-159.
- Franz, C. M. A. P., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., and Holzappel, W. H. (2003). Enterococci in foods – a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 105-122.
- Gandhi, M., and Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 1-15.
- García, M. A., Pinotti, A., Martino, M. N., and Zaritzky, N. E. (2004). Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers*, 56, 339-345.
- Ghanbarzadeh, B., Almasi, H., and Entezami, A. A. (2010). Physical properties of edible modified starch/carboxymethyl cellulose films. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 697-702.
- Giesse, R. (2003). O futuro dos plásticos: biodegradáveis e fotodegradáveis. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 13, 4-5.
- Gontard, N., Thibault, R., Cuq, B., and Guilbert, S. (1996). Influence of relative humidity and film composition on oxygen and carbon dioxide permeabilities of edible films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1064-1069.
- Grizotto, R. K., Bruns, R. E., Aguirre, J. M., and Batista, G. (2005). Otimização via metodologia de superfície de respostas dos parâmetros tecnológicos para produção de fruta estruturada e desidratada a partir de polpa concentrada de mamão. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 158-164.
- Guilbert, S., Gontard, N., and Gorris, L. G. M. (1996). Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Food Science and Technology – Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 29, 10-17.
- Gulewicz, P., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., Ciesiołka, D., Gulewicz, K., and Vidal-Valverde, C. (2008). Effect of germination on the protein fraction composition of different lupin seeds. *Food Chemistry*, 107, 830-844.
- Gupta, V. K., and Sharma, S. K. (2006). Plants as natural antioxidants. *Natural Product Radiance*, 54, 326-334.
- Gustafson, J. E., Liew, Y. C., Chew, S., Markham, J., Bell, H. C., Wyllie, S. G., and Warmington, J. R. (1998). Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 194-198.

- Guzman, A., Gnutek, N., and Janik, H. (2011). Biodegradable polymers for food packaging – factors influencing their degradation and certification types – a comprehensive review. *Chemistry & Chemical Technology*, 5, 115-122.
- Hammond-Kosack, K. E., and Jones, J. D. G. (1996). Resistance gene-dependent plant defence responses. *The Plant Cell*, 8, 1773-1791.
- Hanani, Z. A. N., Beatty, E., Roos, Y. H., Morris, M. A., and Kerry, J. P. (2013). Development and characterization of biodegradable composite films based on gelatin derived from beef, pork and fish sources. *Foods*, 2, 1-17.
- Haugaard, V. K., Udsen, A. M., Mortensen, G., Hoegh, L., Petersen, K., and Monahan, F. (2001). Potential food application of biobased materials. An EU-concerned action project. *Starch/Stärke*, 53, 189-200.
- Heap, B. (2009). Preface. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364, 1971.
- Hojilla-Evangelista, M. P., Sessa, D. J., and Mohamed, A. (2004). Functional properties of soybean and lupin protein concentrates produced by ultrafiltration-diafiltration. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81, 1153-1157.
- Hunter Lab. (2001). Applications Notes, 13, 1-4.
- Jahnel, M. C., Melloni, R., and Cardoso, E. J. B. N. Maturidade de compost de lixo urbano. *Scientia Agricola* [online]. 1999, 56 [cited 2015-09-28], 301-304. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161999000200007&lng=en&nrm=iso.
- Jangchud, A., and Chinnan, M. S. (1999). Peanut protein film as affected by drying temperature and pH of film forming solution. *Journal of Food Science*, 64, 153-157.
- John, M. J., and Thomas, S. (2008). Biofibres and biocomposites. *Carbohydrates Polymers*, 71, 343-364.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., and Tanaka, M. (2008). Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and α -tocopherol. *Food Hydrocolloids*, 22, 449-458.
- Jul, L. B., Flengenmark, P., Gylling, M., and Itenov, K. (2003). Lupin seed (*Lupinus albus* and *Lupinus luteus*) as a protein source for fermentation use. *Industrial Crops and Products*, 18, 199-211.
- Kanmani, P., and Rhim, J.-W. (2014). Development and characterization of carrageenan/grapefruit seed extract composite films for active packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 68, 258-266.
- Kerry, J. P., O'Grady, M., N., and Hogan, S. A. (2006). Past, current and potential utilization of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: a review. *Meat Science*, 74, 113-130.
- Khwaldia, K. (2010a). Water vapor barrier and mechanical properties of paper-sodium caseinate and paper-sodium caseinate-paraffin wax films. *Journal of Food Biochemistry*, 34, 998-1013.
- Khwaldia, K., Arab-Tehrany, E., and Desobry, S. (2010b). Biopolymer coatings on paper packaging materials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 82-91.
- Kim, K. M., Weller, C. L., and Hanna, M. A. (2002). Heat curing of soy protein films at selected temperatures and pressures. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, 35, 140-145.
- Kokoszka, S., Dbeaufort, F., Lenart, A., and Voilley, A. (2010). Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolated based edible films. *International Dairy Journal*, 20, 53-60.
- Krochta, J. M. and De Mulder-Johnston, C. (1997). Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*, 51, 61-74.

- Kumar, M. N. V. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1-27.
- Kunte, L. A., Gennadios, A., Cuppett, S. L., Hanna, M. A., and Weller, C. L. (1997). Cast films from soy protein isolates and fractions. *Cereal Chemistry*, 74, 115-118.
- Lampart-Szczapa, E. (1996). Preparation of protein lupin seeds. *Nahrung*, 40, 71-74.
- Lampart-Szczapa, E., Siger, A., Trojanowska, K., Nogala-Kalucka, M., Malecka, M., and Pacholek, B. (2003). Chemical composition and antibacterial activities of lupin seeds extracts. *Nahrung/Food*, 47, 286-290.
- Leceta, I., Guerreiro, P., Cabezudo, S., and Caba, K. D. La. (2013). Environmental assessment of chitosan-based films. *Journal of Cleaner Production*, 41, 312-318.
- Linnemann, A. R., and Dijkstra, D. S. (2002). Toward Sustainable Production of Protein-Rich Foods: Appraisal of Eight Crops for Western Europe. PART I. Analysis of the Primary Links of the Production Chain. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 377-401.
- López-Mata, M. A., Ruiz-Cruz, S., Silva-Beltráu, N. P., Ornela-Paz, J. J., Zamudio-Flores, P. B., and Burruel-Ibarra, S. E. (2013). Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with carvacrol. *Molecules*, 18, 13735-13753.
- Malathi, A. N., Santhosh, K. S., and Udaykumar, N. (2014). Recent trends of biodegradable polymer: biodegradable films for food packaging and application of nanotechnology in biodegradable food packaging. *Current Trends in Technology and Science*, 3, 73-79.
- Mandal, S., and Mandal, R. K. (2000). Seed storage proteins and approaches for improvement of their nutritional quality by genetic engineering. *Current Science*, 79, 576-589.
- Marsh, K., and Bugusu, B. (2007). Food packaging – roles, materials, and environmental issues. *Journal of Food Science*, 72, 39-55.
- Martínez-Villaluenga, C., Frías, J., and Vida-Valverde, C. (2006a). Functional lupin seeds (*Lupinus albus* L. And *Lupinus luteus* L.) after extraction of α -galactosides. *Food Chemistry*, 98, 291-299.
- Martínez-Villaluenga, C., Sironi, E., Vidal-Valverde, C., and Duranti, M. (2006b). Effects of oligosaccharide removing procedure on the protein profiles of lupin seeds. *European Food Research and Technology*, 223, 691-696.
- Martínez-Villaluenga, C., Zieliński, H., Frias, J., Piskula, M. K., Hozłowska, H., and Vidal-Valverde, C. (2009). Antioxidant capacity and polyphenolic content of high-protein lupin products. *Food Chemistry*, 112, 84-88.
- Mastelić, J., Jerković, I., Blažević, I., Poljak-Blaži, M., Borović, S., Ivančić-Baće, I., Smrečki, V., Zarković, N., Brčić-Kostic, K., Vikić-Topić, D., and Müller, N. (2008). Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3989-3996.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., and Tauxe, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 607-625.
- Minolta, K. (1998). Precise color communication – color control from perception to instrumentation. Konica Minolta Sensing, Inc. 3-91, Daisennishimachi, Sakai. Osaka 590-8551, Japan.
- Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., and Voilley, A. (2000). Temperature influence on moisture transfer through synthetic films. *Journal of Membrane Science*, 168, 223-231.

- Mülayim, M., Tamkoç, A., and Babaoglu, M. (2002). Sweet white lupins versus local bitter genotype: agronomic characteristics as affected by different planting densities in the Göller region of Turkey. *European Journal of Agronomy*, 17, 181-189.
- Murillo-Martínez, M. M., Pedroza-Islas, R., Lobato-Calleros, C., Martínez, Ferez, and Vernon-Carter, E. J. (2011). Designing W1/O/W2 double emulsions stabilized by protein polysaccharide complexes for producing edible films: rheological, mechanical and water vapour properties. *Food Hydrocolloids*, 25, 577-585.
- Murillo-Martínez, M. M., Tello-Solís, S. R., Garcia-Sánchez, M. A., and Ponce-Alquicira, E. (2013). Antimicrobial activity and hydrophobicity of edible whey protein isolate films formulated with nisin and/or glucose oxidase. *Journal of Food Science*, 78, 560-566.
- Murquie, C., Aymard, C., Cuq, J. L., and Guilbert, S. (1995). Biodegradable packaging made from cottonseed flour: formation and improvement by chemical treatments with gossypol, formaldehyde and glutaraldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2762-2767.
- Myers, R. H., and Montgomery, D. C. (1995). Experiments with mixtures. In: *Response surface methodology, process and product optimization using designed experiments*. Willey Inter. Science, 535-623.
- Nolan-ITU. (2002). Biodegradable Plastics-Developments and Environmental Impacts. Environment Australia, Melbourne, Australia.
- Olivas, G. I., and Barbosa-Cánovas, G. V. (2005). Edible coatings for fresh-cut fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 657-670.
- Oomah, B. D., Tiger, N., Olson, M., and Balasubramanian, P. (2006). Phenolics and antioxidative activities in narrow-leaved lupins (*Lupinus angustifolius* L.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 61, 91-97.
- Ouattara, B., Simard, R. E., Holley, R. A., Piette, G. J.-P., and Bégin, A. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 155-162.
- Özcan, M., Kasik, G., and Öztürk, C. (2005). Inhibitory effect of essential oils of myrtle, laurel, pickling herb and thyme and savory on the mycelial growth of *Agaricus campestris* (Lange) Sing. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 8, 120-125.
- Pereira de Abreu, D. A., Paseiro Losada, P., Maroto, J., and Cruz, J. M. (2010). Evaluation of the effectiveness of a new active packaging film containing natural antioxidants (from barley husks) that retard lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food Research International*, 43, 1277-1282.
- Petersen, K., Nielsen, P. V., Bertelsen, G., Lawther, M., Olsen, M. B., Nilsson, N. H., and Mortensen, G. (1999). Potential of biobased materials for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 52-68.
- PlasticsEurope. (2015). Plastics – the facts 2014/2015. An analysis of European plastics production, demand and waste data. *PlasticsEurope – Association of Plastics Manufacturers*, 1-34.
- Pollard, N. J., Stoddard, F. L., Popineau, Y., Wrigley, C. W., and MacRitchie, F. (2002). Lupin flours as additives: dough mixing, breadmaking, emulsifying, and foaming. *Cereal Chemistry Journal*, 79, 662-669.
- Ponce, A. G., Fritz, R., del Valle, C., and Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 36, 679-684.
- Ponce, A. G., Roura, S. I., Del Valle, C. E., and Moreira, M. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: in vitro and in vivo studies. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 294-300

- Prasad, P., and Kochhar, A. (2014). Active packaging in food industry: a review. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8, 1-7.
- Prolupin. (2013). Available from: <http://www.prolupin.com/press-photos-videos-graphics.html>
- Przybylak, J. K., Ciesiołka, D., Wysocka, W., Garcia-López, P. M., Ruiz-López, M. A., Wysocki, W., and Gulewicz, K. (2005). Alkaloid profiles of Mexican wild lupin and effect of alkaloid preparation from *Lupinus exaltatus* seeds on growth and yield of paprika (*Capsicum annum* L.). *Industrial Crops and Products*, 21, 1-7.
- Quintavalla, S., and Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 62, 373-380.
- Ramos, Ó. L., Reinas, I., Silva, S. I., Fernandes, J. C., Cerqueira, M. A., Pereira, R. N., Vicente, A. A., Poças, M. F., Pintado, M. E., and Malcata, F. X. (2013). Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. *Food Hydrocolloids*, 30, 110-122.
- Reinhard, H., Rupp, H., Sager, F., Streule, M., and Zoller, O. (2006). Quinolizidine alkaloids and phomopsins in lupin seeds and lupin containing food- *journal of Chromatography A*, 1112, 353-360.
- Rhim, J. W., Gennadios, A., Weller, C. L., Cezeirat, C., and Hanna, M. A. (1998). Soy protein isolate-dialdehyde starch films. *Industrial Crops and Products*, 8, 195-203.
- Rhim, J. W., Gennadios, A., Handa, A., Weller, C. L., and Hnna, M. A. (2000). Solubility, tensile, and color properties of modified soy protein isolate films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4937-4941.
- Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K., and Maté, J. I. (2006). Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*, 36, 840-846.
- Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., and Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 438-47.
- Roller, S. and Seedhar, P. (2002). Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4° and 8° C. *letters in Applied Microbiology*, 35, 390-394.
- Rosa, D. S., Franco, B. L. M., and Calil, M. R. (2001). Biodegradabilidade e propriedades mecânicas de novas misturas poliméricas. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 11, 82-88.
- Ross, J. A., and Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, 22, 19-34.
- Rubilar, J. F., Cruz, R. M. S., Silva, H. D., Vicente, A. A., Khmelinskii, I., and Vieira, M. C. (2013a). Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *Journal of Food Engineering*, 115, 466-474.
- Rubilar, J. F., Cruz, R. M. S., Khmelinskii, I., and Vieira, M. (2013b). Effect of antioxidant and optimal antimicrobial mixtures of carvacrol, grape seed extract and chitosan on different spoilage microorganisms and their application as coatings on different food matrices. *International Journal of Food Studies*, 2, 22-38.
- Rudnik, E. (2008). Compostable polymer materials. Oxford: Elsevier.
- Salgado, P. R., Ortiz, S. E. M., Petruccelli, S., and Mauri, A. N. (2010). Biodegradable sunflower protein films naturally activated with antioxidant compounds. *Food Hydrocolloids*, 24, 525-533.
- Schäfer, H., and Wink, M. (2009). Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. *Biotechnology Journal*, 4, 1684-1703.

- Schuster-Gajzágó, I. (2009). Lupin and chickpea. In: Cultivated plants, primarily as food sources. *Encyclopedia of Life Support System*, 1, 135-143.
- Scoppola, A., Magrini, S., and Celestini, M. (2011). *Lupines* sect. *albus* (Fabaceae): taxonomic criticism and conservation value. The case of wild populations in central Italy. *Plant Biosystems*, 145, 514-526.
- Sevim, D., and Tuncay, O. (2013). Effect of olive leaves addition before extraction of Turkish olive cultivars on olive oil minor components and antioxidant activity. *Open Access Scientific Reports*, 2, 1-8.
- Seydim, A. C., and Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39, 639-644.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., and Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26, 246-265.
- Shogren, R. L. (1992). Effect of moisture content on the melting and subsequent physical aging of cornstarch. *Carbohydrate Polymers*, 19, 83-90.
- Shukla, R., and Cheryan, M. (2001). Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, 13, 171-192.
- Siger, A., Nogala-Kalucka, and Lampart-Szczapa. (2008). The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plants oils. *Journal of Food Lipids*, 15, 137-149.
- Siger, A., Czubinski, J., Kachlicki, P., Dwiecki, K., Lampart-Szczapa, E., and Nogala-Kalucka, M. (2012). Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25, 190-197.
- Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., and Rosa, M. D. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 634-643.
- Slabu, C., Simioniuc, D. P., Lipşa, F. D., and Simioniuc, V. (2010). Physiological response to water and salt stress of some white lupine cultivars (*Lupinus albus* L.). *Lucrări Ştiinţifice*, 53, 64-68.
- Smith, A., W., J., Poulston, S., and Rowsell, L. (2009). A new palladium-based ethylene scavenger to control ethylene-induced ripening of climacteric fruit. *Platinum Metals Review*, 53, 112-122.
- Soares, N. F. F., Silva, W. A., Pires, A. C. S., Camilloto, G. P., and Silva, P. S. (2008). Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. *Revista Ceres*, 56, 370-378.
- Sorrentino, A., Gorrasi, G., and Vittoria, V. (2007) potential perspectives of bio-composites for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 84-95.
- Sothornvit, R., and Krochta, J. M. (2001). Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. *Journal of Food Engineering*, 50, 149-155.
- Sousa, I. M. N., Morgan, P. J., Mitchell, J. R., Harding, S. E., and Hill, S. E. (1996). Hydrodynamic Characterization of Lupin Proteins: Solubility, Intrinsic Viscosity, and Molar Mass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3018-3021.
- Souza, E. L., Oliveira, C. E. V., Stamford, T. L. M., Conceição, M. L., and Neto, N. J. G. (2013). Influence of carvacrol and thymol on the physiological attributes, enterotoxin production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 29-35.
- Stobiecki, M., and Kachlicki, P. (2006). Isolation and identification of flavonoids. In: *The science of flavonoids*, ed. Grotewold, E. Springer, Columbus, Ohio.

- Srinivasa, P. C., Revathy, B., Ramesh, M. N., Harish Prashanth, K. V., and Tharanathan, R. N. (2002). Storage studies of mango packed using biodegradable chitosan films. *European Food Research and Technology*, 215, 504-508.
- Straková, E., Suchý, P., Šugerková, M., and Večerek, V. (2008). The quality of seed protein of the lupin varieties registered in the Czech Republic, 180-184. In: *Lupins for Health and Wealth*, Proceedings 12th International Lupin Conference, eds. Palta, J. A., and Berger, J. B. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand.
- Su, J-F., Wangm S-B., Lu, X-Z., Zhang, L-D, and Zhang, Y-Y. (2010). Water vapor permeability and moisture sorption of soy protein isolate/ply (vinyl alcohol) packaging films. *Proceedings of the 17th IAPRI World Conference on Packaging*, 444-448.
- Sujak, A., Kotlarz, A., and Strobel, W. (2006). Compositional and nutritional evaluation of several lupin seeds. *Food Chemistry*, 98, 711-719.
- Sukantha, T. A., Sripathi, S. K., Ravindran, N. T., and Balashanmugam, P. (2012). Antioxidant and antibacterial activities of *Trianthema decandra* Linn. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 410-413.
- Sung, S-Y., Sin, L. T., Tee, T-T., Bee, S-T., Rahmat, A. R., Rahman, W. A., Tan, A-C., and Vikhraman, M. (2013). Antimicrobial agents for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 1-44.
- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., and Bigger, S. W. (2003). Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science*, 68, 408-420.
- Terry, L. A., Ilkenhans, T., Poulston, S., Rowsell, L., and Smith, A. W. J. (2007). Development of new palladium-promoted ethylene scavenger. *Postharvest Biology and Technology*, 45, 214-220.
- Thompson, R. C., Swan, S. H., Moore, C. J., and Saal, F. S. V. (2009). Our plastic age. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364, 1973-1976.
- Tripathi, S., Mehrotra, G. K., and Dutta, P. K. (2009). Physicochemical and bioactivity of cross-linked chitosan-PVA film for food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 372-376.
- Uchegbu, N. N. (2015). Effect of germination on proximate, available phenol and flavonoid content and antioxidant activities of African Yam Bean (*Sphenostylis stenocarpa*). *International Conference on Chemical, Food and Environment Engineering*, 1-5.
- Ultee, A., and Smid, E. J. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 373-378.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., and Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1561-1568.
- Uzun, B., Arslan, C., Karhan, M., and Toker, C. (2007). Fat and fatty acids of white lupin (*Lupinus albus* L.) in comparison to sesame (*Sesamum indicum* L.). *Food Chemistry*, 102, 45-49.
- Van Tuil, R., Fowler, P., Lawther, M., and Weber, C. J. (2000). Properties of biobased packaging materials. *Biobased packaging materials for the food industry – status and perspectives*, edited by Weber, C. J. (Copenhagen: Department of Dairy and Food Science, The Royal Veterinary and Agricultural University), 8-33.
- Vásconez, M.B., Flores, S.K., Campos, C.A., Alvarado, J., Gerschenson, L.N. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, 42, 762–769.

- Vieira, M. G. A., da Silva, M. A., dos Santos, L. O., and Beppu, M. M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: a review. *European Polymer Journal*, 47, 254-263.
- Vieira, M. C., and Silva, C. L. M. (2004). Optimization of a cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar formulation. *Journal of Food Process Engineering*, 27, 181-196.
- Wäsche, A., Müller, K., and Knauf, U. (2001). New processing of lupin protein isolates and functional properties. *Nahrung/Food*, 45, 393-395.
- Wang, S., and Clements, J. (2008). Antioxidant activities of lupin seeds, 546-551. In: *Lupins for Health and Wealth*, Proceedings of the 12th International Lupin Conference, eds. Palta, J. A., and Berger, J. B. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand.
- Weber, F. J., and de Bont, J. A. M. (1996). Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Biomembranes*, 1286, 225-245.
- Weber, C. J., Haugaard, V., Festersen, R., and Bertelsen, G. (2002). Production and applications of biobased packaging materials for the food industry. *Food Additives and Contaminants*, 19, 172-177.
- Wihodo, M., and Moraru, C. I. (2013). Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: a review. *Journal of Food Engineering*, 114, 292-302.
- Wink, M. (1984). Chemical defense of Leguminosae. Are quinolizidine alkaloids part of the antimicrobial defense system of lupins? *Zeitschrift für Naturforschung C*, 39, 548-552.
- Wittaya, T. (2012). Protein-Based Edible Films: Characteristics and improvement of properties. In: *Structure and function of food engineering*. INTECH, 43-70.
- Xu, Y. X., Kim, K. M., Hanna, M. A., and Nag, D. (2005). Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. *Industrial Crops and Products*, 21, 185-192.
- Xu, J., Mohamed, A. A., and Sessa, D. J. (2008). Rheological properties of lupin protein suspensions. *International Journal of Agricultural Research*, 3, 317-324.
- Yang, L., and Paulson, A. T. (2000). Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. *Food Research International*, 33, 571-578.
- Yoshida, C. M. P., and Antunes, A. J. (2004). Characterization of whey protein emulsion films. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 21, 247-252.
- Yuan, G., Lv, H., Yang, B., Chen, X., and Sun, H. (2015). Physical properties, antioxidant and antimicrobial activity of chitosan films containing carvacrol and pomegranate peel extract. *Molecules*, 20, 11034-11045.
- Zhou, G. H., Xu, X. L., and Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat – a review. *Meat Science*, 86, 119-128.
- Zieliński, H., and Kozłowska, H. (2000). Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2008-2016.
- Zivanovic, S., Chis, S., and Draughon, A. F. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science*, 70, 45-51.

7. Anexos

Tabela A1. Médias e desvio-padrão para cada parâmetro físico-mecânico do filme.

	Cor		e (μ)	Força Penetração (g)	Teor de umidade (%)
	L	b			
	86.06333333	26.825	132	47.06666667	19.22
	84.29833333	28.01166667	110	46.86666667	22.56
	85.70833333	26.955	133	41.6	15.53
Média	85.35666667	27.26388889	125	45.17777778	19.10333
Desvio-padrão	0.933572886	0.650848449	13	3.100059737	3.516452

Tabela A2. Fórmulas para saber o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides e capacidade antioxidante, em mg/100 g, em PIT e nos filmes.

Absorvância (nm)	[CFT, Flav ou CAO] g	[CFT, Flav ou CAO] mg/g	[CFT, Flav ou CAO] mg/100 g
Y	Y= ax-b	[CFT] x fator de diluição	[CFT] mg/g x 100

Tabela A3. Fórmula para saber o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides e capacidade antioxidante, em mg/100 g, nas soluções sem e com carvacrol.

Absorvância (nm)	[CFT, Flav ou CAO] g
Y	Y= ax-b

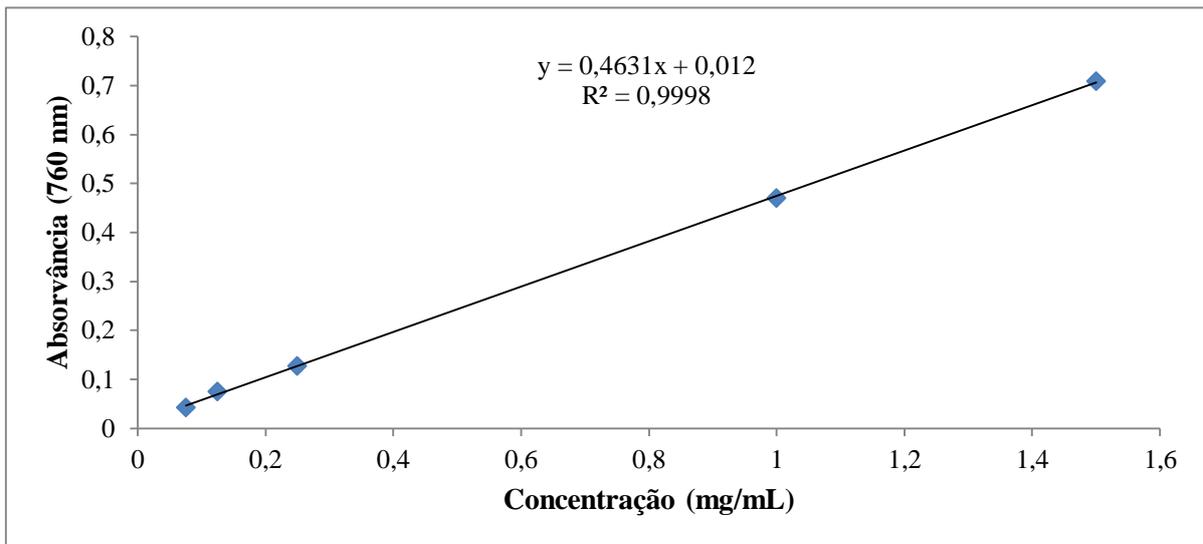


Figura A1. Curva de calibração para os compostos fenólicos totais em PIT.

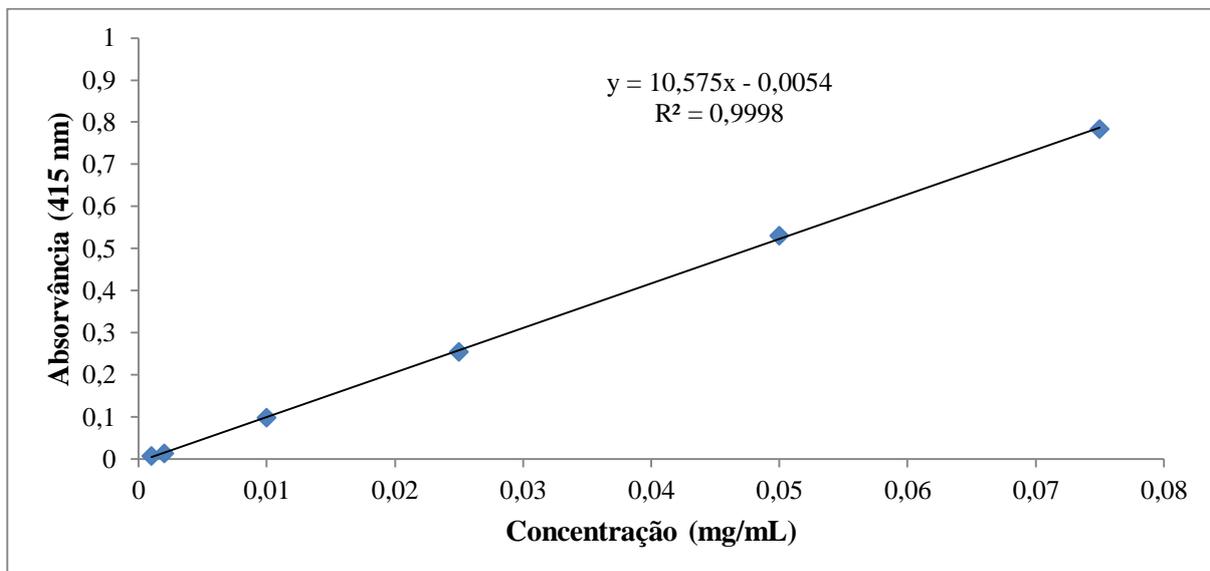


Figura A2. Curva de calibração para os flavonoides em PIT.

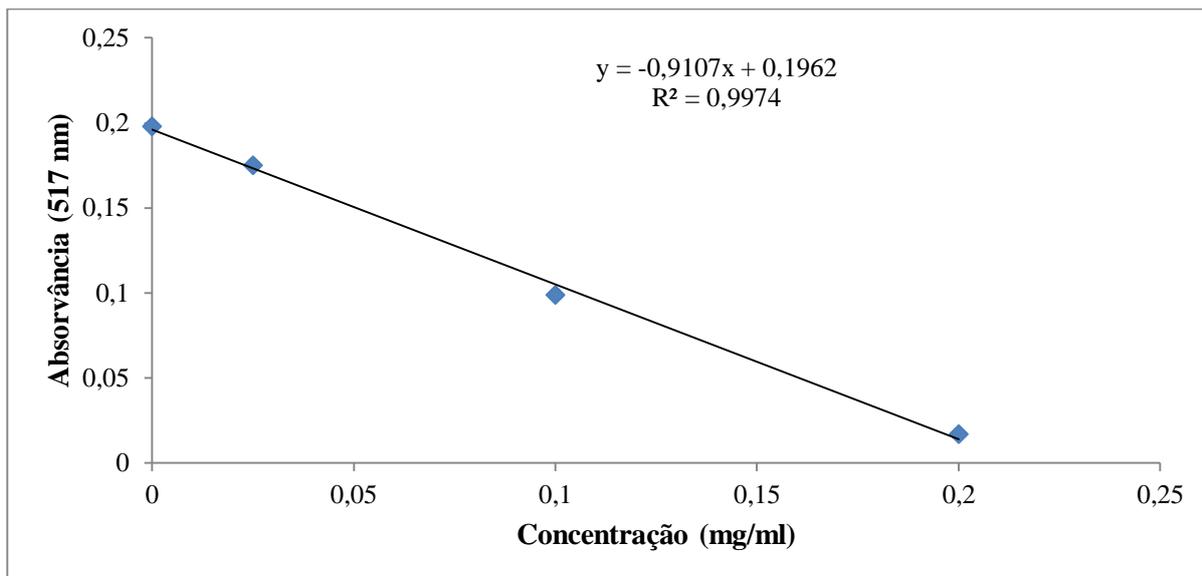


Figura A3. Curva de calibração para a capacidade antioxidante em PIT.

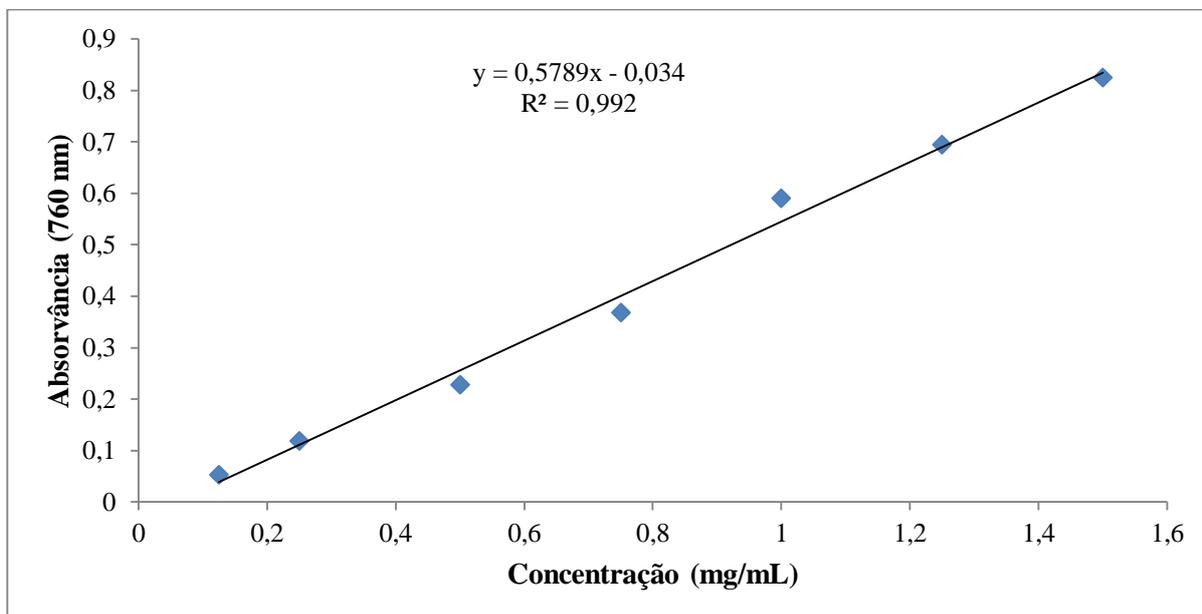


Figura A4. Curva de calibração para os compostos fenólicos totais em SSC.

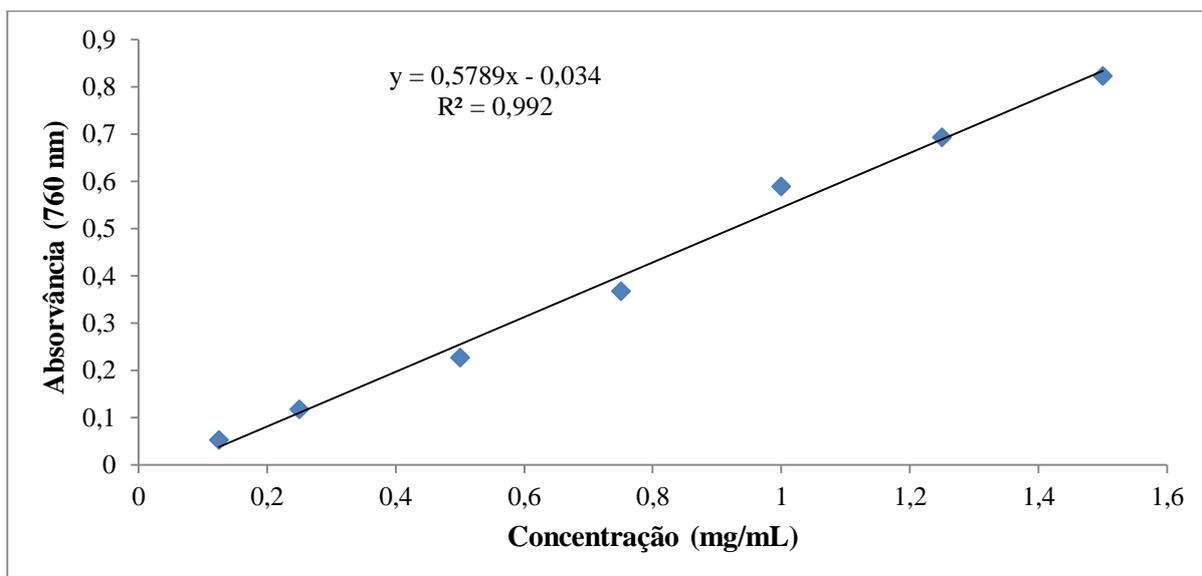


Figura A5. Curva de calibração para os compostos fenólicos totais em SCC.

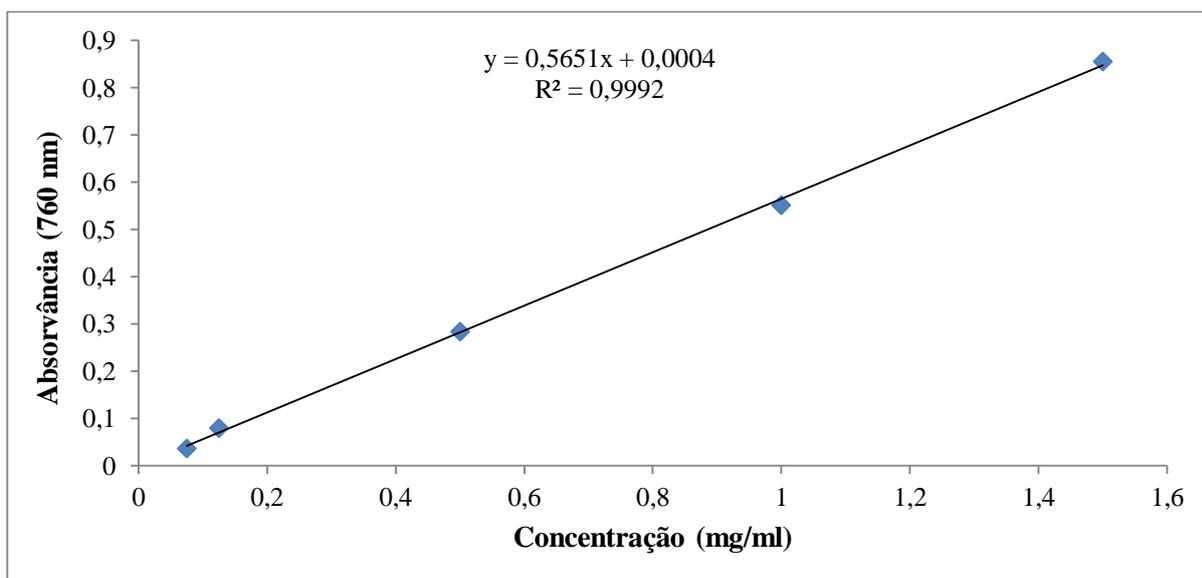


Figura A6. Curva de calibração para os compostos fenólicos totais em FSC.

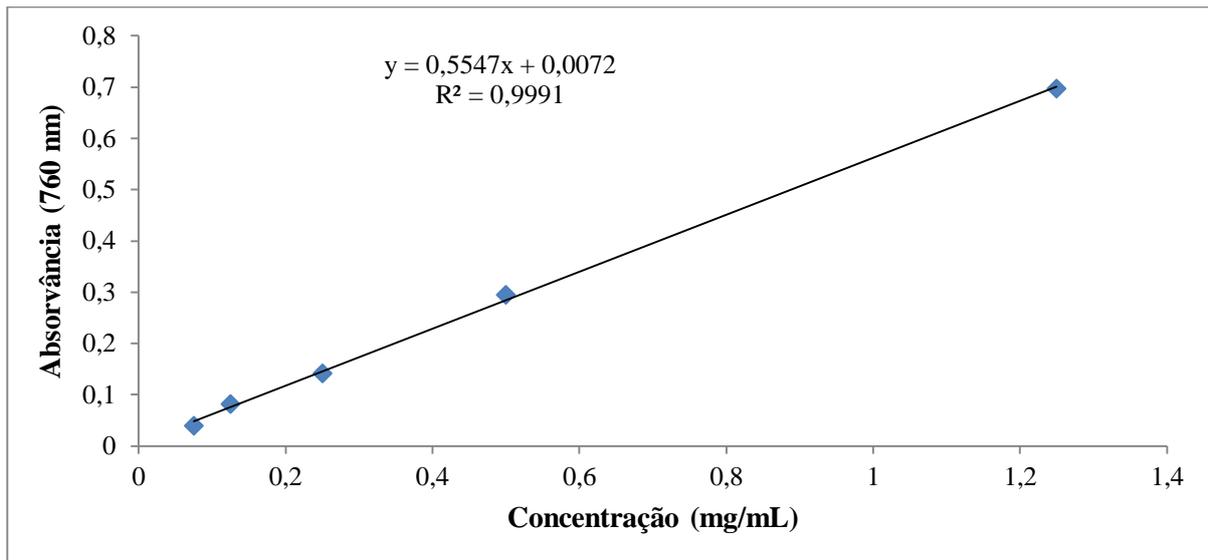


Figura A7. Curva de calibração para os compostos fenólicos totais em FCC

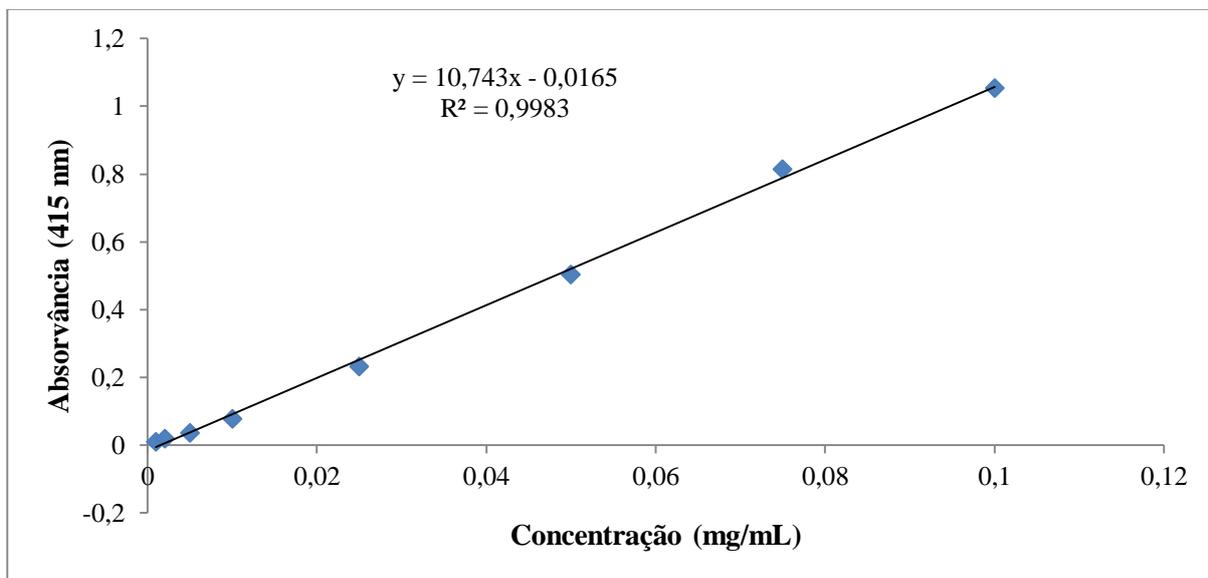


Figura A8. Curva de calibração para os flavonoides em SSC.

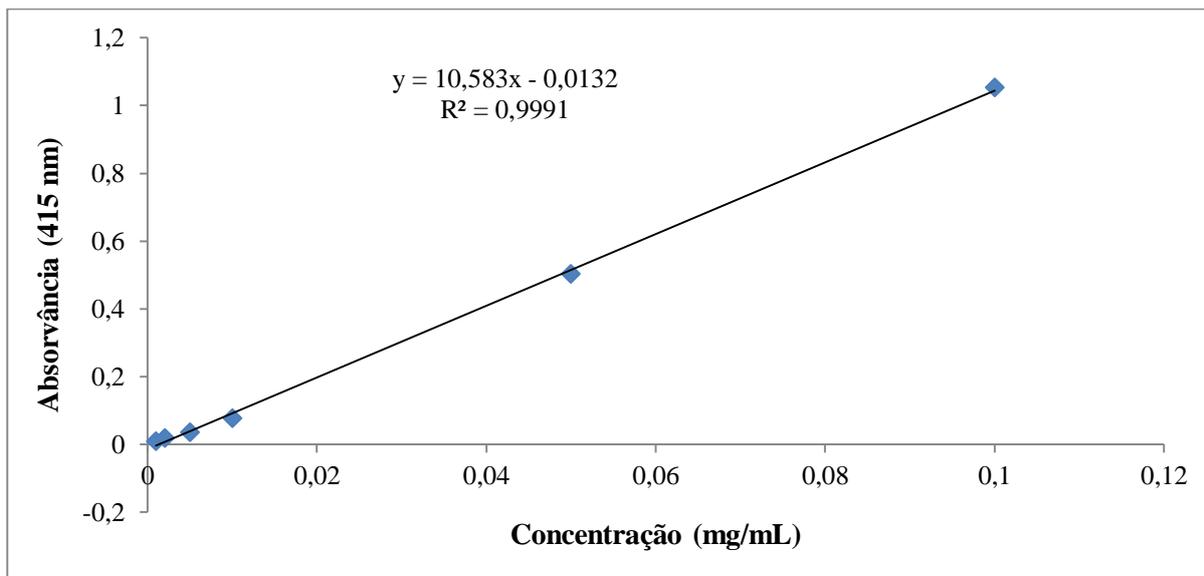


Figura A9. Curva de calibração para os flavonoides em SCC.

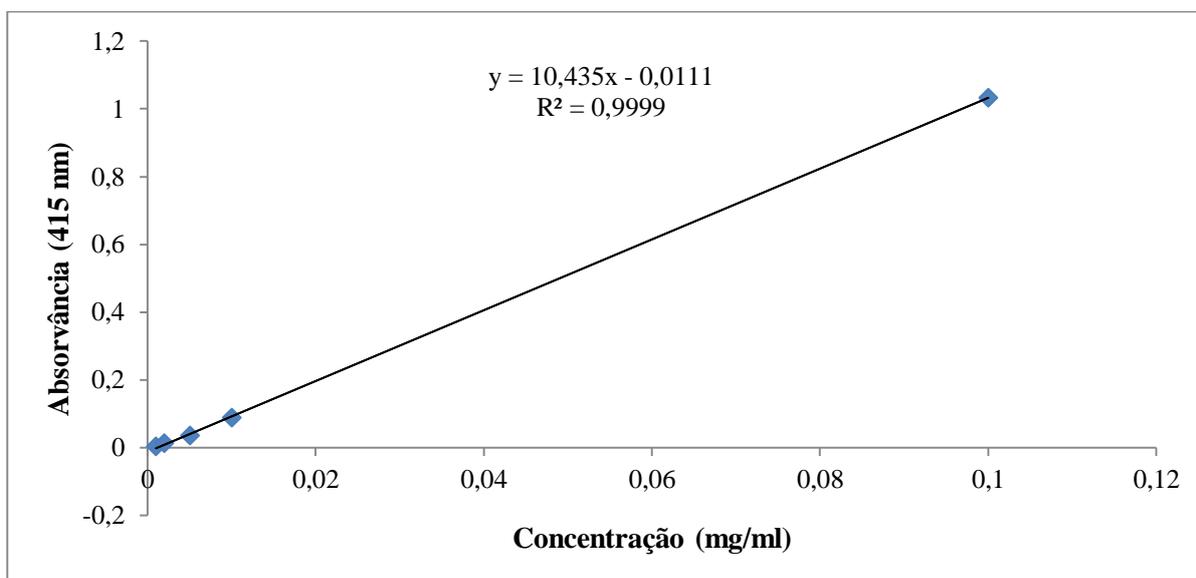


Figura A10. Curva de calibração dos flavonoides em FSC.

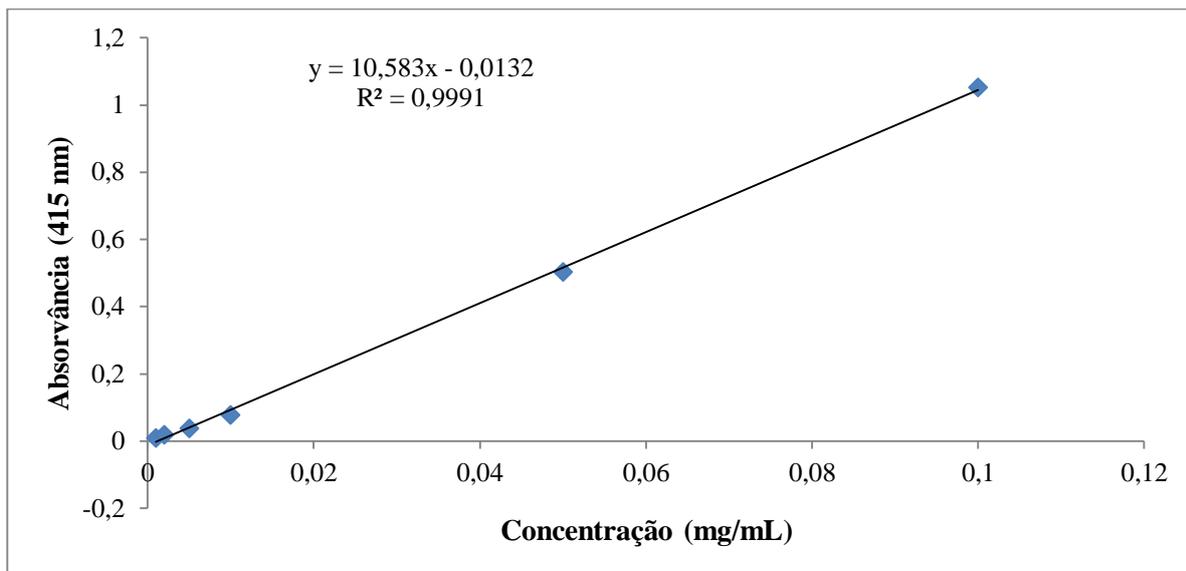


Figura A11. Curva de calibração para os flavonoides em FCC.

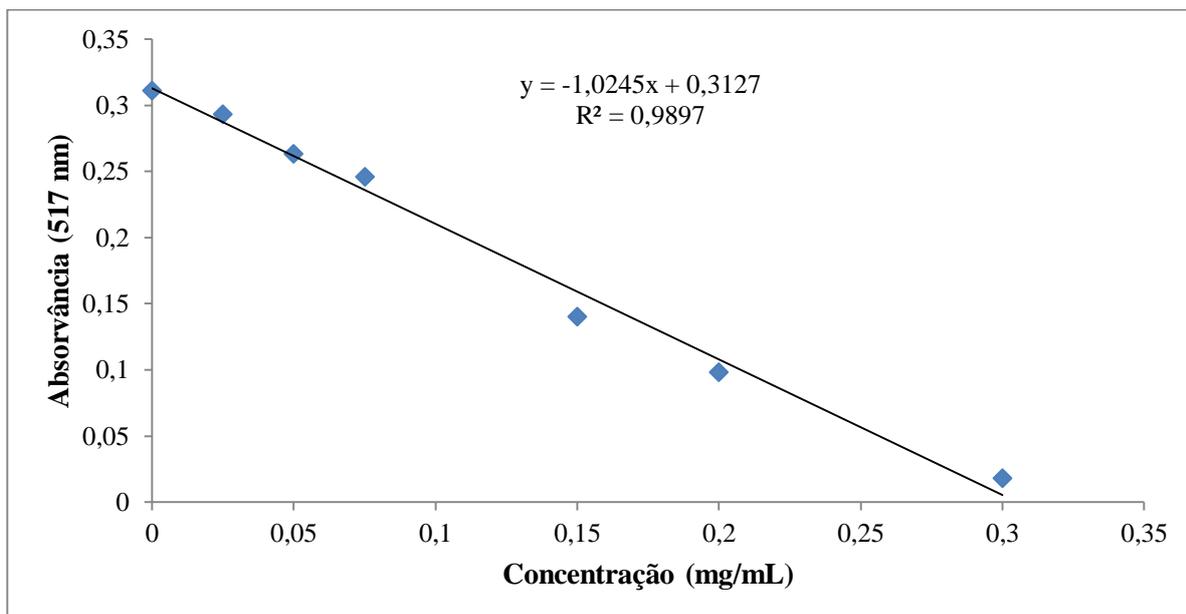


Figura A12. Curva de calibração da capacidade antioxidante em SSC.

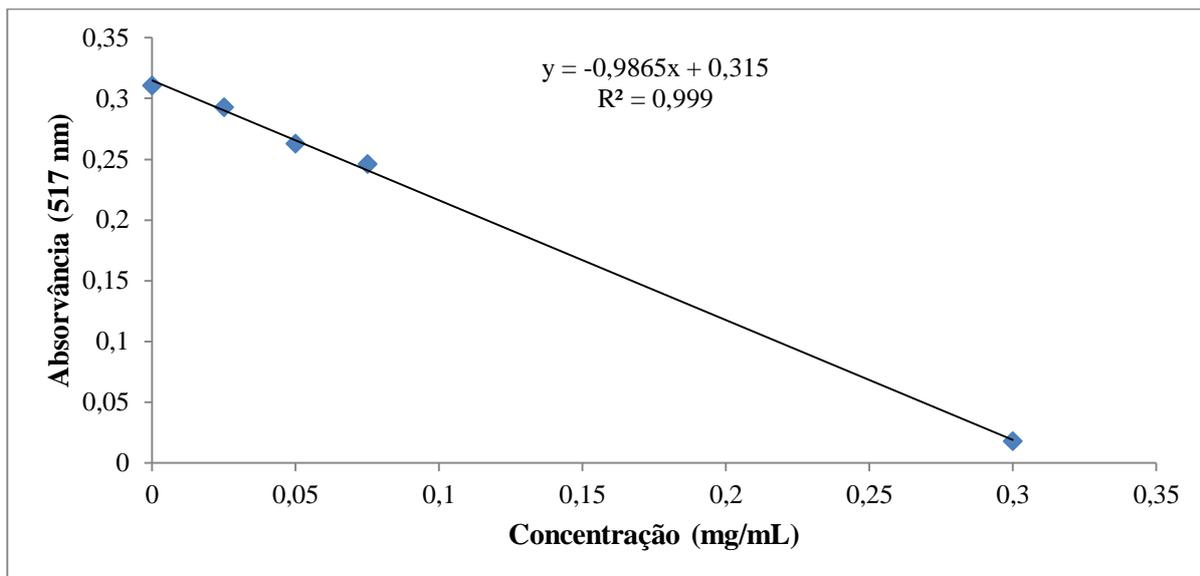


Figura A13. Curva de calibração da capacidade antioxidante em SCC.

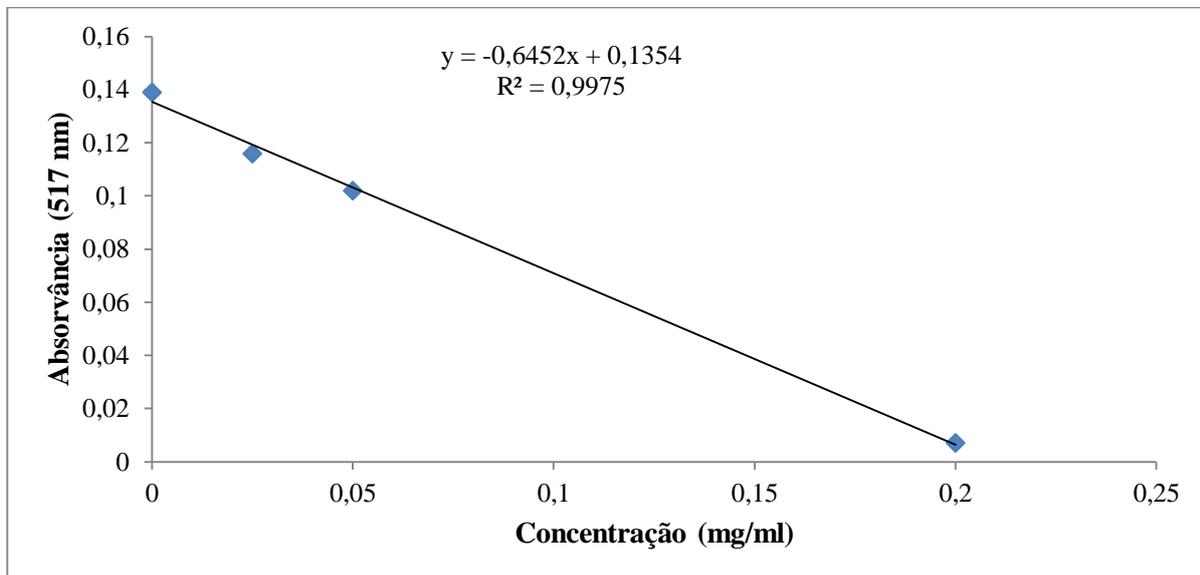


Figura A14. Curva de calibração da capacidade antioxidante em FSC.

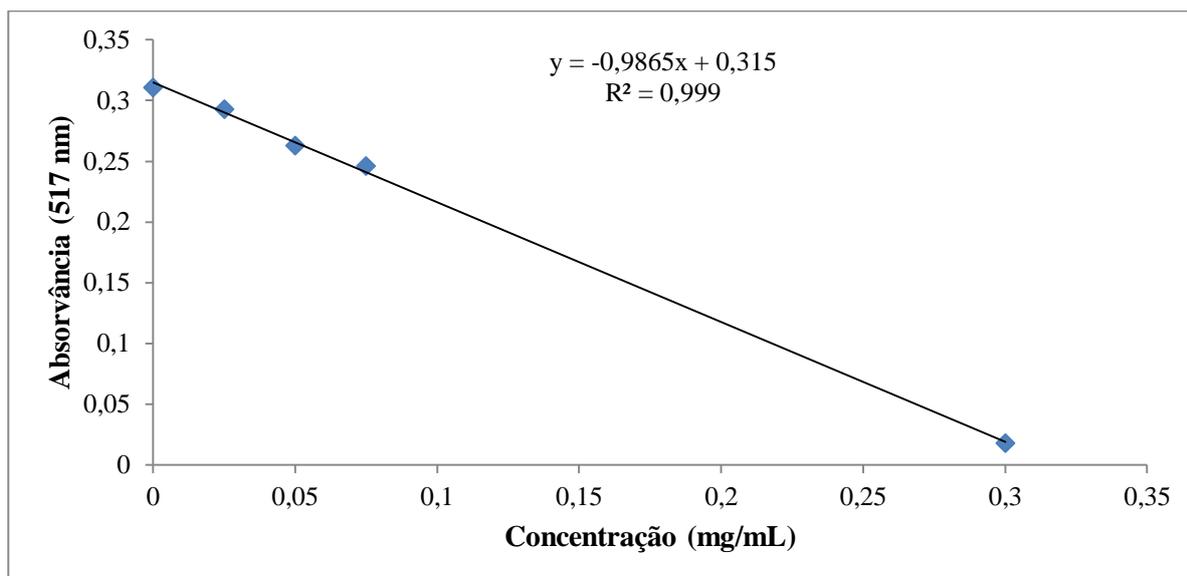


Figura A15. Curva de calibração da capacidade antioxidante em FCC.