

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS  
CURSO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
CÂMPUS CAMPO MOURÃO - PARANÁ

TÂNIA BARBEDO DE FREITAS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE ZEÍNA  
ADICIONADOS DE CASCA E EXTRATO DA CASCA DE PINHÃO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2015

TÂNIA BARBEDO DE FREITAS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE ZEÍNA  
ADICIONADOS DE CASCA E EXTRATO DA CASCA DE PINHÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Engenharia de Alimentos do Departamento Acadêmico de Alimentos – DALIM – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, *Campus* Campo Mourão, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Vitória Leimann

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marianne Ayumi Shirai

CAMPO MOURÃO

2015



Ministério da Educação

Universidade Tecnológica Federal do  
Paraná

Departamento Acadêmico de Alimentos



---

## TERMO DE APROVAÇÃO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE ZEÍNA ADICIONADOS DE CASCA  
E EXTRATO DA CASCA DE PINHÃO

POR

TÂNIA BARBEDO DE FREITAS

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado em 25/11/2015, às 8:30 horas, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenheiro de Alimentos. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

---

Profª. Drª. Fernanda Vitória Leimann

---

Prof. Dr. Manuel Salvador Vicente  
Plata Oviedo  
Membro da banca

---

Prof. Dr. Bogdan Demczuk Junior  
Membro da banca

---

**Nota:** O documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se na Coordenação do Curso de Engenharia de Alimentos da UTFPR *Campus* Campo Mourão.

FREITAS, T. B. **Produção e caracterização de filmes de zeína adicionados de casca e extrato da casca de pinhão**. 34 f. Trabalho de conclusão de curso – Engenharia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal Do Paraná (UTFPR). Campo Mourão, 2015.

## RESUMO

A busca por novas técnicas de produção de materiais que substituam os plásticos como forma de embalagem de alimentos, tem feito crescer a aplicação de polímeros biodegradáveis para formação de filmes e coberturas para alimentos. A zeína é uma proteína insolúvel em água, extraída do milho e um subproduto na produção de amido do grão, é um biopolímero com capacidades de formação de filmes flexíveis, biodegradáveis e que podem ser utilizados como embalagens ativas. O uso de fibras naturais como agentes enriquecedores para filmes biodegradáveis tem se tornado usual, pelo fato de suas características mecânicas serem melhoradas com a presença destes compostos. O presente trabalho teve como objetivo a produção de filmes de zeína, enriquecidos com casca de pinhão moída e extratos da casca (aquoso, hidro alcoólico e etanólico). Foram analisadas as propriedades mecânicas (alongação na ruptura, módulo de Young e resistência a tração), antibacterianas, capacidade antioxidante (DPPH, FRAP, Fenólicos Totais e ABTS) e calorífica (DSC) dos filmes e extratos produzidos. Os resultados demonstraram que a adição de extratos hidro alcoólico e etanólico apresentaram valores semelhantes ao do filme controle para o Módulo de Young, já o filme com extrato aquoso apresentou alongação e resistência a tração maiores aos demais, indicando maior tenacidade. Para os resultados do DSC, os filmes controle e adicionados da casca do pinhão apresentaram uma temperatura de transição vítrea (Tg) acima do encontrado na literatura para zeína, comparados a outros compostos plastificantes. Todos os filmes e extratos analisados demonstraram capacidade antioxidante, apresentando diferenças influenciadas pelo tipo de solvente utilizado na extração dos compostos fenólicos da casca do pinhão e suas interações com a matriz polimérica da zeína. Não houve ação antimicrobiana dos filmes sob os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia Coli*. Os filmes de zeína com adição da casca e extratos da casca do pinhão apresentaram características favoráveis para a aplicação como embalagens ativas.

**Palavras chave:** filme biodegradável; zeína; *Araucaria angustifolia*; atividade antioxidante; propriedades mecânicas.

FREITAS, T. B. **Production and characterization of zein films with extract and shell of pine seeds.** 34 f. Trabalho de conclusão de curso – Engenharia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal Do Paraná (UTFPR). Campo Mourão, 2015.

## ABSTRACT

The search for new techniques that produce materials to replace plastic for food packaging, has led to an increased application of biodegradable polymers to form films and coatings. Zein is a protein insoluble in water, extracted from corn grain and a by-product at production of its starch, is a biopolymer that contains flexible films formation capacity, is biodegradable and can be used as active packaging. The use of natural fibers for enriching agents into biodegradable films has become usual, because their mechanical properties of those compounds. This study aimed to the production of zein films, enriched with pine nut shell and its extracts (aqueous, hydro alcoholic and ethanol). Were analyzed the mechanical properties (elongation at break, Young's Modulus and tensile strength), antibacterial, antioxidant capacity (DPPH, FRAP, Total Phenolic and ABTS) and heat (DSC) of the films and produced extracts. The results showed that the addition of hydro-alcoholic and ethanol extracts had similar values to the film control to the Young's modulus, since the film with aqueous extract showed elongation and tensile strength greater than the others, indicating greater tenacity. For DSC results of the films made of the control and pine shell had a glass transition temperature ( $T_g$ ) higher than those found in the literature for zein, as compared with other plasticizers compounds. All films and extracts analyzed showed antioxidant capacity, with differences influenced by the type of solvent used in the extraction of phenolic compounds of the seed bark and their interactions with the polymer matrix of the zein. There was no antimicrobial action in the films under the *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The zein films with addition of shell pine nuts and its extracts showed favorable characteristics for application as active packaging.

**Key words:** biodegradable film; zein; *Araucaria angustifolia*; antioxidant activity; mechanical properties.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Curvas obtidas pelo teste de calorimetria diferencial de varredura (DSC) para os filmes de zeína com extrato hidro alcoólico (Filme+extrato), filme de zeína com casca e filme de zeína controle.....24
- Figura 2 (a) e (b) – Filmes de zeína com adição de extrato hidro alcoólico da casca de pinhão, inoculados com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.....28

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Propriedades mecânicas dos filmes de zeína.....	21
Tabela 2 – Atividade antioxidante dos extratos da casca do pinhão e filmes .....	25

## LISTA DE SIGLAS

FHA.....	Filme adicionado de extrato hidrocalcoólico
FEE.....	Filme adicionado de extrato etanólico
FEA.....	Filme adicionado de extrato aquoso
FC.....	Filme Controle
FCA.....	Filme adicionado de casca
EE.....	Extrato etanólico
EA.....	Extrato aquoso
EHA.....	Extrato hidro alcoólico
MY.....	Módulo de Young



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
2.1. Objetivo Geral.....	11
2.1. Objetivos Específicos.....	11
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>12</b>
3.1. Filmes biodegradáveis obtidos por <i>film casting</i> .....	12
3.2. Zeína.....	12
3.3. Filmes biopoliméricos contendo resíduos agroindustriais.....	13
3.4. Filmes biodegradáveis ativos.....	13
3.5. Resíduos do Pinhão.....	14
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
4.1. Materiais.....	16
4.2. Preparação da casca de pinhão.....	16
4.3. Preparação do Extrato.....	16
4.4. Produção dos filmes.....	17
4.5. Caracterização dos filmes.....	17
4.5.1. Espessura do filme.....	17
4.5.2. Propriedades Mecânicas.....	17
4.5.3. Calorimetria Diferencial de Varredura.....	18
4.5.4. Atividade Antioxidante.....	18
4.5.5. Atividade Antimicrobiana.....	20
4.5.6. Análise Estatística.....	21
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>21</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>29</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>30</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A alta durabilidade, propriedades físicas e mecânicas adequadas e o preço acessível são características que fazem com que os plásticos atendam às exigências do mercado de embalagens e com isto um vasto uso que atinge mais de 100 milhões de toneladas em produção por ano. O reflexo do alto consumo se dá no aumento das preocupações ambientais devido ao seu acúmulo excessivo, assim como a demanda de consumidores mais exigentes e que buscam alimentos saudáveis, nutritivos e vida útil prolongada. Com isso, as indústrias de alimentos e de embalagens nos últimos anos atentam-se cada vez mais para os filmes biodegradáveis (biopolímeros) (BEHRENSCHSEN, 2014; SHEN; KAMDEM, 2015).

A zeína é uma proteína do tipo prolamina presente no milho, insolúvel em água e um importante coproduto da produção do amido de milho e subproduto da indústria de bioetanol. É um polímero não tóxico e biodegradável, sendo sua estrutura um terço hidrofílica e dois terços hidrofóbica, o que está diretamente relacionado a sua solubilidade única em soluções água-álcool e na capacidade de formação de filmes com permeabilidade, resistência térmica e ação antimicrobiana. Os filmes de zeína podem ser usados para a encapsulação de óleos essenciais, aromas e sabores, liberação controlada de aditivos e como um material de embalagem ativa para alimentos (ZHANG et al. 2010; SÁNCHEZ et al. 2015). Filmes de zeína têm sido produzidos pela técnica de *film casting* e apresentam propriedades mecânicas pobres com características extremamente frágeis (FORATO et al., 2013).

Atualmente cresce o desenvolvimento de embalagens com compostos ativos que além de atuarem como barreira à agentes externos e de interagirem com o alimento na sua conservação, mantém a qualidade microbiológica e sensorial dos alimentos. Frequentemente, são adicionadas substâncias antioxidantes, que são capazes de remover o oxigênio do meio ou impedir a reação em cadeia, produzida pelos radicais livres formados durante o processo de oxidação. As reações de degradação por oxidação são consideradas como as mais importantes que ocorrem nos alimentos, já que são responsáveis pela deterioração dos produtos (SANTANA et al., 2012; SANTOS, 2014).

A incorporação de material lignocelulósico para produção de compósitos poliméricos tem recebido maior atenção em particular aplicações onde preços reduzidos e altos volumes de material são exigidos. As vantagens de compósitos de fibra natural são sua baixa densidade, baixo custo, características renováveis, e biodegradabilidade completa (ROSA et al., 2008).

*Araucaria angustifolia* é uma conífera nativa da América do Sul encontrada no Sul e Sudoeste do Brasil e Norte da Argentina. Sua semente é grande, denominada pinhão, de cor marrom, contém grande quantidade de reservas nutritivas. Sua casca, em especial, é rica em taninos que são substâncias responsáveis pelas atividades biológicas e farmacológicas das plantas das quais são isoladas. Na indústria alimentícia o pinhão tem sido introduzido como alternativa ao uso de farinhas tradicionais na elaboração de produtos, porém a parte de interesse utilizada se retém apenas ao interior da semente que é fonte de proteínas, carboidratos e fibras (ALMEIDA, 2003). O pinhão é largamente consumido no sul do Brasil e após seu cozimento em água a sua casca é geralmente descartada no lixo (LIMA et al., 2007).

Considerando tais informações, propõe-se produzir filmes biodegradáveis a partir da zeína com adição de casca de pinhão e de seu extrato hidroalcoólico, como forma de aproveitamento de resíduos e enriquecendo o filme com propriedades antioxidantes e como uma alternativa interessante para aumentar as propriedades mecânicas dos filmes de zeína.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

- Produzir e caracterizar filmes biodegráveis de zeína contendo resíduo de pinhão.

### 2.1. Objetivos Específicos

- Produzir filmes de zeína contendo a casca de pinhão pelo método de *film casting*;
- Obter diferentes extratos da casca de pinhão por extração hidro alcoólica, aquosa e etanólica;
- Produzir filmes de zeína por *film casting* contendo extratos: hidro alcoólico, etanólico e a água de cozimento do pinhão;
- Caracterizar as propriedades mecânicas (em termos de tração), térmicas, atividades antimicrobiana e antioxidantes dos filmes produzidos.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Filmes biodegradáveis obtidos por *film casting*

Materiais de embalagem utilizados para produtos alimentares, como qualquer outro tipo de recipiente de armazenamento de para curtos períodos de tempo, são um problema ambiental sério, assim a utilização de polímeros biodegradáveis nesta área representa uma alternativa interessante (PIZZOLI et al., 2014).

Os materiais de embalagem biodegradáveis ideais são obtidos a partir de recursos renováveis biológicos, sendo chamados de biopolímeros (RHIM et al., 2013). Polímeros biodegradáveis são comumente encontrados em muitas aplicações devido ao avanço biotecnológico e conscientização pública. Contudo, apesar destes avanços, ainda existem algumas desvantagens que impedem sua comercialização mais ampla. Isto se deve principalmente ao desempenho e preço, quando comparado com os polímeros convencionais, o que continua a ser um desafio significativo para os polímeros de base biológica (BABU; O'CONNOR; SEERAM, 2013). Desta forma torna-se interessante o reaproveitamento de resíduos agroindustriais buscando o aumento do desempenho e redução do custo destes materiais.

A técnica de *film casting* é utilizada amplamente em escala laboratorial para produção de filmes de diferentes biopolímeros como isolado proteico de soja (GONZÁLEZ et al., 2015), multicamadas de isolado proteico de soja e poli(ácido láctico) (GONZÁLEZ, 2013), multicamadas de zeína e caseinato de sódio (YIN et al., 2014), etc. A produção de filmes por meio da técnica consiste em verter uma solução filmogênica em pequenas placas ou moldes.

#### 3.2. Zeína

A zeína é uma proteína do tipo prolamina, localizada em pequenas partículas esféricas de 1-2 $\mu$ m de diâmetro, presente no endosperma do milho, constitui 47% das proteínas presentes no grão e é um importante coproduto da produção do amido de milho e subproduto da indústria de bioetanol. É um polímero não tóxico e biodegradável, sendo sua estrutura um terço hidrofílica e dois terços hidrofóbica, o que está diretamente relacionado a sua solubilidade única em soluções água-álcool e na capacidade de formação de filmes com permeabilidade, resistência térmica e ação antimicrobiana. Os filmes de zeína podem ser usados para a encapsulação de óleos essenciais, aromas e

sabores, liberação controlada de aditivos e como um material de embalagem ativa para alimentos (GHANBARZADEH et al., 2006; ZHANG, 2010; SÁNCHEZ et al. 2015). Filmes de zeína têm sido produzidos pela técnica de *film casting* e apresentam propriedades mecânicas pobres com características extremamente frágeis (FORATO et al., 2013).

A zeína por ser um polímero biodegradável, é uma boa opção aos polímeros sintéticos plásticos e derivados do petróleo, possuindo também capacidade de formação de filmes, resistência de barreira de gases atmosféricos e solubilidade, e proteção de compostos ativos. Devido a isto, é estudada como uma possibilidade de biopolímero industrial (KURECK, 2014).

### **3.3. Filmes biopoliméricos contendo resíduos agroindustriais**

Tem sido sugerido que defeitos inerentes de materiais de embalagem à base de biopolímero podem ser superados por tecnologia dos compósitos e nanocompósito. Estes materiais exibem elevadas propriedades de barreira, o aumento da resistência mecânica em comparação aos seus polímeros puros (RHIM et al., 2013).

Vários trabalhos remetem ao uso de fibras vegetais como aditivos viáveis para produção de filmes biodegradáveis, tendo como alguns exemplos os filmes de glúten de trigo reforçados com cânhamo (KUNANOPPARAT et al., 2008), biocompósitos à base de glúten de trigo e fibras de palha de trigo (MONTAÑO-LEYVA et al., 2013), filmes de amido de milho reforçados com fibras de queratina, lignina e abetos de celulose (BODIRLAU; TEACA; SPIRIDON, 2012) e filmes biodegradáveis a base de proteína da torta de mamona reforçadas com fibras de celulose (OLIVEIRA, 2013).

### **3.4. Filmes biodegradáveis ativos**

Os materiais de embalagem produzidos com biopolímeros são excelentes veículos para a incorporação de uma grande variedade de aditivos, tais como antioxidantes, agentes antifúngicos, agentes antimicrobianos, cores e outros nutrientes (IMRAN et al., 2010). Estes filmes são chamados de filmes ativos (TIAN; DECKER; GODDARD, 2013).

Os antioxidantes são aditivos comumente utilizados na indústria dos polímeros para evitar a degradação térmica destes durante o processamento. Tradicionalmente, antioxidantes sintéticos tais como os compostos polifenólicos, organofosforados e tioéster têm sido utilizados, embora a toxicidade potencial derivada de sua migração para produtos

alimentares está a fazer a sua aplicação questionável. Neste sentido, uma abordagem alternativa que vem sendo amplamente estudada é a utilização de antioxidantes naturais, particularmente extratos de plantas e óleos essenciais de ervas e especiarias. Além disso, é relevante mencionar a utilização potencial de resíduos de alimentos industrial como fonte de agentes antioxidantes. A liberação destes antioxidantes naturais da embalagem para os alimentos durante a comercialização do produto é de grande interesse uma vez que este processo pode reduzir a oxidação lipídica e pode até aumentar valor nutritivo dos alimentos (GOMEZ-ESTACA et al., 2014).

### 3.5. Resíduos do Pinhão

*Araucaria angustifolia*, é uma arvores que pertence à família das *Araucariaceae*, e é comumente conhecida como Pinheiro do Paraná ou Pinheiro Brasileiro. Seu estróbilo feminino consiste em sementes, conhecidas como pinhão e brácteas (sementes não desenvolvidas), e tem uma longa história de uso como alimento na região sudeste do Brasil, como farinhas em pratos regionais ou panificação (MOTTA et al., 2014).

A pinha, fruto onde estão aglomerados os pinhões, tem o formato de uma esfera compacta com diâmetro entre 15 cm e 20 cm, chegando a pesar, em média 2,0 kg. Para formação da pinha, entre a floração, polinização, crescimento e amadurecimento, requer um tempo de até três anos. A semente, denominada como pinhão tem cerca de 5 cm de comprimento, com aproximadamente 8,6 gramas e é recoberta por uma casca lisa de cor castanha, perdendo a viabilidade em apenas 120 dias (ARAÚJO; GUIOTOKU, 2010; BATISTA, 2014).

O pinhão é composto de três partes principais: casca, amêndoa e embrião. A casca é a parte externa da semente e possui três camadas, que protegem a amêndoa, a mais externa, cujos tecidos se dispõem longitudinalmente, apresenta uma coloração que vai desde o branco-amarelado até o vermelho escuro. A camada intermediária é bastante delgada e seus tecidos estão dispostos transversalmente, ela é responsável pela maior resistência à casca do pinhão, sua cor é branco-amarelada externamente e castanha clara na face interna. A terceira e última camada é a mais fina e membranácea das três, e está disposta longitudinalmente, possui cor castanha clara na face externa e rosada internamente. No centro da amêndoa há o embrião, um filamento de 4/5 de seu comprimento. A amêndoa é constituída pela massa bastante amilácea, sendo ela a parte comestível do pinhão (GAMA, 2006).

A casca *in natura* do pinhão apresenta uma grande quantidade de fenólicos (4198,75 mg/g), e no cozimento esses compostos migram para água de cozimento (1215,82 mg/g) ou são incorporados no endosperma cozido. A casca fibrosa da semente apresenta ainda altos teores de lignina, sendo responsável por cerca de 26% dos componentes encontrados nela (DAROLT; HELM, 2013).

Assim, torna-se interessante obter materiais biopoliméricos baseados em zeína adicionados de extrato ou casca de pinhão, visando o reaproveitamento deste resíduo agroindustrial bem como a obtenção de filmes ativos para embalagens de alimentos com propriedades melhoradas.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

O pinhão foi adquirido no mercado local de Campo Mourão no período de junho de 2014, embalado e armazenado em freezer convencional. A zeína (Sigma-Aldrich), glicerol (Vetec) e etanol (Dinâmica) foram utilizados para produzir os filmes.

Para as análises de atividade antioxidante utilizaram-se os reagentes: Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), carbonato de sódio (Vetec) e padrão de ácido gálico (Sigma-Aldrich) para determinar a concentração total dos compostos fenólicos. E o radical DPPH (2,2-difenilpicrilhidrazil, Sigma-Aldrich) e FRAP [tampão acetato 0,3 M pH 3,6; TPTZ (2,3,5-cloreto trifeniltetrazolium, Sigma-Aldrich) 10 mM foram utilizados para determinar a capacidade antioxidante. Utilizou-se Agar Muller-Hinton, solução padrão McFarland e culturas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) para as análises de atividade antimicrobiana.

### 4.2. Preparação da casca de pinhão

Cozinhou-se o pinhão na sua forma de consumo convencional em panela de pressão, na proporção de 526 g de pinhão/L de água durante 2 horas. Após o cozimento, separaram-se as sementes das cascas que foram congeladas em seguida. A água de cozimento foi separada e armazenada em freezer convencional, num recipiente fechado.

As cascas foram secas em estufa de convecção forçada (Cienlab) durante 24 horas a 40 °C. Posteriormente trituradas em liquidificador doméstico e classificadas em um conjunto vibratório de peneiras (Mesh tyler -200/+400).

### 4.3. Preparação do Extrato

Além do extrato aquoso, proveniente da água de cozimento, foram produzidos dois tipos de extratos: etanólicos e hidro alcoólico (80% etanol), ambos em proporção de 120 g de solvente para 5 g de casca de pinhão cozido. A mistura foi mantida sob agitação magnética por 5 horas. Ao final da extração, filtrou-se a solução em papel filtro, tendo assim o extrato etanólico e hidro alcoólico da casca de pinhão.

Seguiu-se a mesma metodologia usada na produção dos extratos utilizados nos filmes e para produzir os extratos isolados, utilizados nas análises antioxidantes.

#### **4.4. Produção dos filmes**

Produziram-se 5 formulações de filme de zeína, pela técnica de *film casting*, sendo eles: controle (FZC) (sem adição de nenhum composto do pinhão); adicionado extrato hidro alcoólico (FHA); adicionado zeína com extrato etanólico (FEE); adicionado extrato aquoso (FEA) (água de cozimento) e por fim, adicionado de casca de pinhão cozido (FCP). Os filmes de zeína foram produzidos segundo a metodologia de Phiriyawirut e Maniaw (2012), com modificações. Para o filme controle, solubilizaram-se 19,2 g de zeína com 3,8 g de glicerol em uma solução hidro alcoólica com 24 g água destilada e 96 g etanol a 3.000 rpm de agitação, em sistema rotor estator (Ultra-turrax, T25 IKA).

Para o filme adicionado de casca de pinhão (FCA), adicionou-se 0,48 g da fração classificada à formulação (2,5 % em relação à zeína g/g). No caso do filme contendo extrato hidro alcoólico (FHA) e extrato etanoico (FEE) as soluções resultantes das filtrações das extrações foram utilizadas para solubilização da zeína e do glicerol.

Agitou-se cada formulação por 10 minutos a 3.000 rpm, em sistema rotor estator (Ultra-turrax, T25 IKA) e seguiu para o banho ultrassônico por 15 minutos, para evitar a formação de bolhas no filme pronto. Verteu-se em formas de teflon (30 cm x 20 cm) para secagem em estufa a 50 °C durante 24 horas.

#### **4.5. Caracterização dos filmes**

##### **4.5.1. Espessura do filme**

Determinou-se a espessura dos filmes produzidos utilizando um micrômetro digital com escala de 0-25 mm e precisão de 0,001 mm. Foram utilizados 10 corpos de prova dos filmes, com dimensões de 5 cm x 1 cm para realizar as medidas. O micrômetro foi posicionado em três pontos na superfície de cada corpo de prova, para que uma média da espessura de cada tipo de filme fosse determinada.

##### **4.5.2. Propriedades Mecânicas**

Os testes para determinar as propriedades mecânicas dos filmes baseiam-se na resistência à tração, módulo de Young e alongação na ruptura. Realizaram-se os testes em Texturômetro Stable Micro Systems (modelo TA-XT Express), conforme os métodos e normas da *American Society for Testing and Material* (ASTM D-882-00, 2001). Utilizaram-

se 10 corpos de prova de cada tipo de filme, com dimensões de 5 cm x 1 cm nas seguintes condições: velocidade de teste de 1 mm/s e resolução igual a 400.

#### **4.5.3. Calorimetria Diferencial de Varredura**

A caracterização térmica dos filmes foi realizada utilizando de um Calorímetro Diferencial de Varredura (*Differential Scanning Calorimetry* – DSC, Perkin Elmer, 4000). O equipamento foi inicialmente calibrado com zinco e índio. As amostras analisadas (em torno de 5 mg) foram pesadas dentro de panelas de alumínio. As rampas de aquecimento foram realizadas entre 0 e 300 °C a razão de aquecimento de 20 °C/min sob fluxo de nitrogênio gasoso (20 mL/min).

#### **4.5.4. Atividade Antioxidante**

##### **4.5.4.1. Extração dos compostos fenólicos**

Para solubilizar a matriz do filme contendo os compostos fenólicos, pesou-se 1,5 g do filme e adicionou-se 30 mL de etanol absoluto. Em rotor estator (Ultra turrax, T25 IKA), agitou-se à 16000 rpm até a máxima fragmentação do filme e em seguida manteve-se agitação à 6000 rpm durante 15 minutos. Retirou-se o extrato sobrenadante e adicionou-se novamente 30 mL de etanol 80% ao filme residual e repetiu-se o processo de extração de modo que 3 diluições de extratos de cada tipo de filme fossem produzidas.

##### **4.5.4.2. Curva padrão de ácido gálico**

A partir da solução padrão de ácido gálico foram preparadas em balões volumétricos de 10 mL, soluções de ácido gálico variando a concentração de 0 a 0,35 mg/mL, que foram utilizadas para construir a curva padrão, em que se plotou a leitura da absorbância, a 720 nm, na ordenada e as concentrações de ácido gálico utilizadas, na abscissa.

##### **4.5.4.3. Método FRAP**

A partir das diluições dos extratos obtidas, foram preparadas, em tubos de ensaio, três diluições diferentes (5:5, 1:9 e 9:1 mL de extrato/mL de água destilada). Em ambiente escuro, foram adicionados 90 µL de cada diluição a outro tubo de ensaio contendo 270 µL de água destilada. A essa mistura, foram acrescentados 2,7 mL do reagente FRAP [tampão acetato 0,3 M pH 3,6; TPTZ (2,3,5-cloreto trifeniltetrazolium) 10 mM e solução aquosa de cloreto férrico 20 mM]. Em seguida, os tubos foram homogeneizados e

mantidos em banho maria a 37 °C durante 30 minutos e a leitura foi realizada em espectrofotômetro, em 595 nm. O reagente FRAP foi utilizado como branco para a calibração do equipamento. Os valores foram obtidos comparando as leituras encontradas com a curva padrão de sulfato ferroso (0-2000 µM). O valor final foi expresso em µM sulfato ferroso/g de extrato e o experimento foi realizado em triplicata. Realizou-se paralelamente o mesmo procedimento para todas as três diluições de cada filme e para cada extrato da casca de pinhão produzidos.

#### **4.5.4.4. Método DPPH**

Preparou-se a solução de DPPH para a realização da análise com 0,139 g do reagente DPPH e 100 mL de metanol, em balão volumétrico. Adicionou-se em tubo de ensaio, 2,5 mL de extrato, juntamente com 1 mL da solução metanólica de DPPH. O controle para o extrato do filme e para o extrato da casca de pinhão foi obtido através da solução de metanol com 2,5 mL de extrato, sem o reagente DPPH.

Após 30 min do início da reação dos tubos, os mesmos foram armazenados no escuro e fez-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda a 518 nm, calibrando-o com álcool etílico. Realizou-se paralelamente o mesmo procedimento para todas as três diluições de cada filme e para cada extrato da casca de pinhão produzidos. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram quantificados por uma curva de calibração de trolox com concentrações de 10 a 60 µmol/L ( $y = -0,0168x + 1,0728$ ,  $R^2 = 0,9977$ ), e expressos em micromol equivalente de trolox por 100 g de filme (µmol ET/100) (AABY et al., 2004; STRATIL et al., 2006; SURVESWARAN et al., 2007).

#### **4.5.4.5. Método ABTS**

Preparou-se o radical ABTS pesando-se 0,0414g de ABTS com 0,0071g de persulfato de sódio em 10ml de água destilada, a solução foi homogeneizada e mantida no escuro por 12 horas para que se completasse a reação.

Para as análises, em tubo de ensaio acrescentou-se 2850µl de solução ABTS com 150µl do extrato (filme e casca de pinhão). Para uma amostra de controle para leitura, adicionou-se na mesma quantidade de ABTS, 150µl de etanol 100%. Os tubos foram agitados em vórtex e armazenados no escuro por 2 horas para realização da leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 734nm.

Realizou-se paralelamente o mesmo procedimento para todas as três diluições de cada filme e para cada extrato da casca de pinhão produzidos. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos em micromol equivalente de trolox por 100 g de filme ( $\mu\text{mol ET}/100$ ) (ARNAO; CANO; ACOSTA, 2001).

#### **4.5.4.6. Fenólicos Totais**

Para determinação dos fenólicos totais, utilizou-se o reagente Folin-Ciocateu, adicionando-se com micro pipeta  $150\mu\text{L}$  a um tubo ensaio de  $10\text{mL}$  com  $2370\mu\text{L}$  de etanol 100% e  $30\mu\text{L}$  do extrato. Após 2 minutos, adicionou-se  $450\mu\text{L}$  de carbonato de sódio 15% e os tubos foram armazenados no escuro, por 2 horas. Seguiu-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de  $765\text{ nm}$ .

Realizou-se paralelamente o mesmo procedimento para todas as três diluições de cada filme e para cada extrato da casca de pinhão produzidos. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram obtidos a partir de uma curva padrão de ácido gálico (entre 30 e  $1500\text{ mg/L}$ ), e ao final foram expressos em miligramas equivalente de ácido gálico por 100 g de filme ( $\text{mg EAG}/100\text{ g}$ ) (SINGLETON; ROSSI, 1965).

#### **4.5.5. Atividade Antimicrobiana**

A preparação das amostras dos filmes para análise foi feita de forma que discos com  $6\text{ mm}$  de diâmetro fossem recortados e esterilizados na luz ultravioleta por 15 minutos.

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes, utilizou-se cepas de microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* reativadas em caldo Müller Hinton a  $35\text{ }^\circ\text{C}$ . Inoculou-se  $0,1\text{ mL}$  do microrganismo em placas para cada tipo de filme, no meio Muller-Hinton com auxílio da alça de drigaski. Após o período de 3 minutos para secagem, em cada placa, depositaram-se na superfície do ágar 3 discos de um mesmo tipo de filme, de modo que o espaçamento entre eles fosse igual. O experimento foi realizado em duplicata.

Para o crescimento das colônias, as placas foram embaladas com filme de PVC e incubadas em estufa para cultura (Labstore) a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas. Após o período, verificou-se a presença de halos de inibição (ARAÚJO, 2014; SANTOS, 2014).

#### 4.5.6. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) pelo programa STATISTICA 7 e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados referentes as propriedades mecânicas e espessuras dos filmes estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1 – Propriedades mecânicas dos filmes de zeína.**

Filme	Módulo de Young (MPa)	Resistência à tração (MPa)	Elongação na ruptura (%)	Espessura (mm)
FEHA	6.162,06 <sup>a</sup> ± 2.249,273	3.091,78 <sup>a</sup> ± 1.892,498	1,92 <sup>a</sup> ± 0,893	0,382 ± 0,038
FCA	14.322,08 <sup>ab</sup> ± 8.140,028	6.201,56 <sup>a</sup> ± 7.910,128	2,66 <sup>a</sup> ± 0,404	0,230 ± 0,064
FEA	23.473,79 <sup>bc</sup> ± 2.322,09	17.64,81 <sup>b</sup> ± 3.673,08	3,18 <sup>b</sup> ± 0,646	0,328 ± 0,025
FC	24.619 <sup>bc</sup> ± 11.00824	5.796,56 <sup>a</sup> ± 3.699,107	1,60 <sup>a</sup> ± 0,376	0,198 ± 0,037
FEE	33.181,57 <sup>c</sup> ± 15.806,61	7.883 <sup>a</sup> ± 6.611,304	0,98 <sup>a</sup> ± 0,535	0,160 ± 0,031

Nota: Média dos resultados obtidos através do texturômetro ± desvio padrão, onde: FEHA (filme com extrato hidro alcoólico), FCA (filme com casca), FEA (filme com extrato aquoso do cozimento do pinhão), FEA (filme controle) e FEE (filme com extrato etanólico). Letras minúsculas sobrescritas às médias indicam diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

A determinação da espessura pode avaliar a homogeneidade de um filme, onde as variações nas espessuras ao longo dos corpos de prova dos filmes devido a presença de bolhas, por exemplo, podem causar problemas no desempenho das propriedades mecânicas. As variações obtidas dentre as amostras dos filmes foram relativamente baixas (Tabela 1), isso indica que no processo de produção tipo *casting*, não houveram dificuldades no espalhamento da solução e ocorreu a secagem homogênea através evaporação do solvente (SOBRAL, 1999).

Elevados valores de Módulo de Young (ou módulo de elasticidade) representam materiais rígidos e a adição de materiais fibrosos e *fillers* inorgânicos aos polímeros permitem que estes valores sejam aumentados, produzindo materiais de elevado desempenho (KU et al., 2011; ZARRAD et al., 2015). Os filmes contendo extrato etanólico (FEE) e extrato aquoso (FEA, do cozimento do pinhão) apresentaram valores de Módulo de Young estatisticamente semelhantes ao filme controle de zeína (FC). O maior valor encontrado foi para o filme com extrato etanólico (FEE) e o menor de todos para o extrato hidro alcoólico (FEHA). A mistura de solventes etanol e água possivelmente promoveu a

extração de compostos da casca do pinhão que interagiram com a zeína de forma reduzir a rigidez. Como a zeína apresenta características tanto polares quanto apolares (ZHANG et al., 2011), este extrato pode ter otimizado a interação entre os compostos provenientes da casca e a própria zeína. Jaramillo et al., (2015) produziram filmes de amido contendo extrato de erva mate e observaram que com o aumento da concentração de extrato nos filmes houve uma redução do Módulo de Young. Os autores comentam que este efeito deve estar relacionado com uma redução das forças coesivas da matriz polimérica, efeito semelhante ao proporcionado pelos plastificantes, dessa forma pode-se concluir que moléculas de tamanho reduzido presentes no extrato atuam no mesmo sentido.

Quanto à elongação todos os filmes apresentaram comportamento estatisticamente semelhante ao filme controle de zeína (FC), com exceção do filme com extrato aquoso (FEA, do cozimento do pinhão) que teve sua elongação aumentada em duas vezes com a adição do extrato. Esse comportamento indica que o material apresenta maior tenacidade quando comparado aos demais filmes, ou seja, que apresenta maior capacidade em absorver energia até o momento da ruptura (BANDYOPADHYAY; RAY 2010; FERRARI et al., 2014). Durante o cozimento do pinhão, a água em ebulição pode ter facilitado a extração de compostos resinosos e oleosos. Além disso, a presença da semente no momento da extração pode ter promovido uma composição diferenciada dos demais extratos o que possivelmente promoveu o aumento na plastificação do filme, permitindo uma maior elongação do mesmo. Nos demais extratos estes componentes possivelmente foram extraídos, porém em quantidade menor, o que não permitiu o efeito significativo na propriedade em questão. Nergiz e Donmez (2004) avaliaram a composição química de sementes de *Pinus pinea* L. e observaram a presença de aproximadamente 45% de óleos e gorduras. Cladera-Oliveira et al., (2008) avaliaram a composição centesimal da semente do pinhão (sem as cascas) e determinaram um teor de lipídeos igual a 1,24%. Vasquez et al. (2008) também descrevem que cascas de castanha apresentam açúcares em sua composição. Estes podem ter efeito plastificante em filmes poliméricos (GHANBARZADEH et al., 2006). Dessa forma é esperado que estes compostos lipídicos e açúcares possam ter sido extraídos durante o cozimento e estejam presentes no extrato diferenciando sua composição dos demais.

Com relação à resistência à tração, o filme que apresentou melhor resultado, com diferença estatisticamente significativa com os demais também foi o filme contendo extrato aquoso (FEA), corroborando com o indicativo de comportamento de maior tenacidade. Os

demais filmes apresentaram-se estatisticamente semelhantes não promovendo um aumento na resistência à tração em relação ao controle (FC). A casca de pinhão foi aplicada ao filme com expectativa de aumento na resistência pela formação de um compósito, porém este efeito não foi observado, além disso houve uma diminuição significativa no Módulo de Young. Gupta e Chatterjee (2002) comentam que materiais fibrosos que apresentam elevada capacidade de absorção de umidade podem prejudicar a resistência mecânica de materiais compósitos. Possivelmente a presença das cascas permitiu uma maior absorção de umidade ao material, diminuindo a sua resistência à tração

A plastificação dos filmes de zeína por meio de extratos da casca de pinhão como aditivos plastificantes, indicou uma melhoria das propriedades mecânicas resultando em materiais com maior porcentagem de alongação, assim como é desejado (MALI et al., 2006). No caso da incorporação da água de cozimento (FEA) há maior eficiência nessa melhoria, combinada ao fato do mesmo apresentar altos valores de resistência a tração e Módulo de Young (assim como o FEE). Isso indica que há vantagens quanto a adição dos coadjuvantes melhoradores de propriedades mecânicas, como os extratos utilizados.

A Figura 1 representa as curvas resultantes da análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC), dos filmes de zeína analisados. As amostras analisadas para esse teste foram o filme controle, filme adicionado de casca de pinhão e filme adicionado de extrato hidro alcoólico da casca de pinhão. Uma transição vítrea ( $T_g$ ) pode ser observada para o filme controle em aproximadamente 140°C e no caso do filme com adição de casca em aproximadamente 130 °C. Ghanbarzadeh et al., (2006) observaram que a  $T_g$  do filme de zeína plastificado com ácido oleico foi igual a 101 °C e os filmes plastificados com frutose, glicose e galactose permaneceram entre 60 e 70 °C. Os autores comentam que este efeito provavelmente ocorreu devido ao efeito higroscópico e pela natureza hidrofílica dos açúcares e pela natureza hidrofóbica do ácido oleico. No presente estudo a presença da casca de pinhão possivelmente promoveu uma maior absorção de umidade, como discutido anteriormente com relação as propriedades mecânicas (GUPTA; CHATTERJEE, 2002). A umidade presente no filme possivelmente causou efeito plastificante evidenciado pela redução na  $T_g$ .



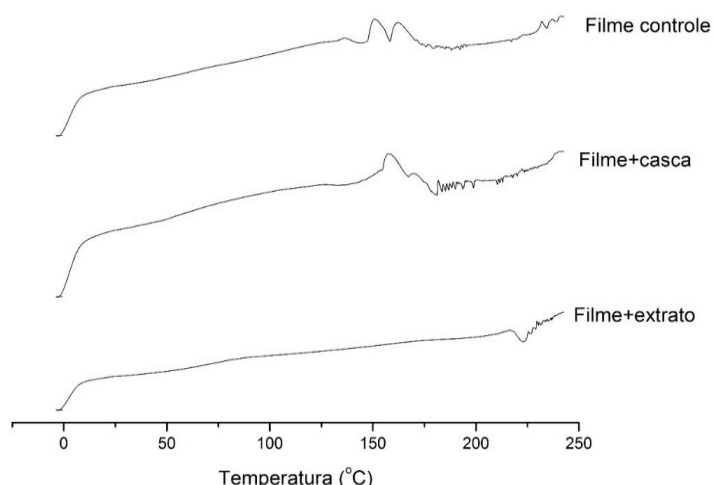


Figura 1 – Curvas obtidas pelo teste de calorimetria diferencial de varredura (DSC) para os filmes de zeína com extrato hidro alcoólico (Filme+extrato), filme de zeína com casca e filme de zeína controle.

Para o filme de zeína com extrato hidro alcoólico (FEHA) a  $T_g$  não está evidente no termograma, não sendo possível concluir se houve efeito plastificante com a adição do extrato à zeína. Neste caso é possível que tenha havido interação entre os compostos fenólicos do extrato e a zeína (MOTTA et al., 2014) alterando a estabilidade térmica do filme. Kureck (2014) observou que micropartículas de zeína contendo extrato de noz-pecã, apresentaram uma maior estabilidade à decomposição térmica devido à presença destes compostos. Vilmar Jr. et al., (2010), indicam que a decomposição dos compostos fenólicos se encontra em torno de 500 e 600 °C.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados referentes a atividade antioxidante dos extratos e dos filmes.

**Tabela 2 – Atividade antioxidante dos extratos da casca do pinhão e filmes.**

Extratos	Fenólicos totais (mg EAG/g)	DPPH ( $\mu\text{mol ET/g}$ )	ABTS ( $\mu\text{mol ET/g}$ )	FRAP ( $\mu\text{mol ET/g}$ )
EA	1,95 <sup>a</sup> $\pm$ 0,038	11,78 <sup>a</sup> $\pm$ 0,276	54,64 <sup>c</sup> $\pm$ 2,487	2,09 <sup>a</sup> $\pm$ 0,014
EE	3,69 <sup>b</sup> $\pm$ 0,826	9,14 <sup>a</sup> $\pm$ 0,382	26,4 <sup>a</sup> $\pm$ 0,453	2,12 <sup>a</sup> $\pm$ 0,031
EHA	6,17 <sup>c</sup> $\pm$ 0,134	8,62 <sup>a</sup> $\pm$ 6,318	49,10 <sup>b</sup> $\pm$ 1,012	8,29 <sup>b</sup> $\pm$ 0,261
FC	9,28 <sup>b</sup> $\pm$ 0,30	3,10 <sup>a</sup> $\pm$ 0,12	36,71 <sup>c</sup> $\pm$ 0,16	18,60 <sup>b</sup> $\pm$ 1,42
FEHA	6,73 <sup>c</sup> $\pm$ 0,16	3,36 <sup>a</sup> $\pm$ 0,11	22,52 <sup>a</sup> $\pm$ 0,73	50,84 <sup>c</sup> $\pm$ 1,15
FEE	9,35 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,21	3,88 <sup>a</sup> $\pm$ 0,14	33,33 <sup>b</sup> $\pm$ 0,58	15,96 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,10
FCA	8,29 <sup>b</sup> $\pm$ 0,01	3,62 <sup>a</sup> $\pm$ 0,06	35,42 <sup>c</sup> $\pm$ 0,48	17,18 <sup>b</sup> $\pm$ 0,47
FEA	6,12 <sup>a</sup> $\pm$ 0,71	4,88 <sup>a</sup> $\pm$ 1,90	43,62 <sup>d</sup> $\pm$ 0,28	13,55 <sup>b</sup> $\pm$ 0,04

Nota: Média dos resultados obtidos através das análises descritas  $\pm$  desvio padrão, onde: EA (extrato aquoso), EE (extrato etanólico), EHA (extrato hidro alcoólico), FEHA (filme com extrato hidro alcoólico), FCA (filme com casca), FEA (filme com extrato aquoso do cozimento do pinhão), FEA (filme controle) e FEE (filme com extrato etanólico). Letras minúsculas sobrescritas às médias indicam diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Com relação aos compostos fenólicos totais todos os extratos diferenciaram-se significativamente entre si ( $p < 0,05$ ). O extrato com maior teor de fenólicos totais foi o

extrato hidro alcoólico (EHA). Vasquez et al., (2008) obtiveram extratos e castanha mais ricos em compostos fenólicos utilizando água como solvente (55,8 g GAE/100 g extrato). O extrato hidro alcoólico (56,8g GAE/100 g extrato) dos autores apresentou semelhança no valor obtido para o extrato aquoso e o solvente que apresentou menor rendimento em relação aos fenólicos foi o etanol (25,6 g GAE/100 g extrato). Sarkis et al., (2014) analisou o efeito de diferentes concentrações de etanol, comparado a água, para extrair os fenólicos totais da semente de sésamo, o rendimento máximo com etanol foi alcançado com a concentração de 19% do solvente puro, o aumento da concentração seguiu-se de uma diminuição no rendimento, com isso, concluiu-se que para se obter o melhor extrato com capacidade antioxidante é preferível utilizar somente água como solvente da semente. Zhao et al., (2006) extraíram antioxidantes da cevada com diferentes misturas de solventes (acetona, etanol, metanol e água) e obtiveram diferenças significativas na sua capacidade de extração e seletividade para os compostos fenólico (determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), levado a diferentes atividades antioxidantes.

No caso das análises de inibição do radical DPPH na presença de um composto antioxidante, todos os extratos responderam estatisticamente da mesma forma ao sequestro dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, reduzindo-a para hidrazina (ALVES et al., 2010).

Os resultados da atividade antioxidante dos extratos encontrados pelo método FRAP indicaram que tanto o extrato etanólico quanto o aquoso tiveram o mesmo efeito quanto a capacidade de redução do complexo férrico-tripiridiltriazina ( $Fe^{3+}$  -TPZ) para o ferroso ( $Fe^{2+}$  -TPZ), na presença de um antioxidante e em condições ácidas. Já o extrato hidro alcóólico teve um aumento em três vezes com relação ao valor encontrado para os demais extratos. Possivelmente a composição do solvente neste caso otimizou a extração de compostos com maior poder antioxidantes nas condições de análise. Vásquez et al (2008) obtiveram valores de aproximadamente 2,9  $\mu$ Mol em ácido ascórbico equivalente/mg de extrato hidro alcoólico de casca de castanha (20% água e 80% etanol), porém o extrato aquoso apresentou maior atividade com 3,5  $\mu$ Mol em ácido ascórbico equivalente/mg de extrato.

Os resultados de atividade antioxidante ABTS indicaram que a água de cozimento possibilitou a extração de compostos com maior capacidade antioxidante frente ao radical sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico). Já o etanol não

favoreceu a extração destes e a mistura dos solventes apresentou capacidade intermediária na extração destes.

Juntachote et al., (2006) avaliaram o efeito da composição do solvente (misturas de água e etanol) na extração de antioxidantes de capim-limão, galanga, manjerição e alecrim. Os resultados mostraram que a proporção de solvente de extração teve o efeito mais significativo sobre o rendimento de extração, reduziu o conteúdo fenólico total, mas não apresentou efeito sobre a atividade antioxidante baseada na oxidação acoplada de  $\beta$ -caroteno e ácido linoleico.

O fato de que a grande variedade de polifenóis presentes em plantas implica na necessidade de estabelecer metodologia eficaz para a sua eficiente extração e caracterização (KAJDZANOSKA; PETRESKAW; STEFOVA, 2011). Além disso Zhao et al., (2006) comentam sobre a dificuldade em obter valores na literatura para comparação da atividade antioxidante de extratos vegetais em função das diferentes técnicas empregadas para sua análise bem como pelos diferentes métodos de obtenção de tais extratos.

Para análise da atividade antioxidante e compostos fenólicos dos filmes, foram realizadas extrações com etanol da matriz polimérica e este extrato obtido foi então analisado. Os extratos obtidos a partir do filme controle, do filme contendo extrato etanólico e do filme com a adição da casca de pinhão apresentaram maiores teores de compostos fenólicos totais e as médias foram consideradas estatisticamente iguais entre si ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2). Isto sugere que os fenólicos foram extraídos de forma mais efetiva a partir destes filmes do que dos filmes contendo extrato hidro alcoólico e extrato aquoso. A presença de água nos extratos em questão possivelmente permitiu a extração de compostos da casca do pinhão que interagiram por ligações de hidrogênio através das hidroxilas presentes nos taninos, que são capazes de formar complexos com a zeína no filme (BALANGE; BENJAKUL, 2009; ZHANG et al., 2010), dificultando sua extração no momento da análise da matriz polimérica. A interação entre taninos e zeína também é confirmada pelos autores Mori et al., (2014), que indicam a miscibilidade da zeína com o tanino através das interações entre os grupos aminocarboxílico da zeína e hidroxilas do tanino. Além disso a zeína já apresenta atividade antioxidante (ZHANG et al., 2011), portanto a adição dos extratos não aumentou significativamente o teor de fenólicos com relação ao filme controle. Isso pode se dar ao fato dos aminoácidos presentes na zeína

se complexarem com os poli fenóis presentes na casca do pinhão e no extrato, apenas mantendo seu efeito antioxidante. Tal justificativa, explica o fato do extrato hidro alcoólico ser o com teor mais elevado que o extrato etanólico e aquoso, sendo a extração dos compostos fenólicos da casca mais eficiente com a solução hidro alcoólica.

Para os resultados da análise de FRAP pode-se observar que o filme adicionado de extrato hidro alcoólico (FEHA), apresentou diferença significativa dos demais tendo maior efeito na produção de íons  $Fe^{2+}$ , indicada pela formação de um complexo corado com o íon ferroso (TUKUN et al, 2014). Essa diferença apresentada pelo FEHA, em frente aos demais corrobora com o fato da capacidade de redução do íon  $Fe^{3+}$  em  $Fe^{2+}$  pelo extrato hidro alcoólico (Tabela 2), confirmando a extração mais eficiente dos compostos fenólicos responsáveis por tal reação.

Os resultados do teste da capacidade antioxidante em frente ao radical ABTS, mostram que o filme com extrato aquoso apresentou capacidade mais alta frente aos demais, os filmes controle e adicionados de casca apresentaram valores significativamente iguais e inferiores ao do extrato aquoso, porém maiores que o extrato etanólico.

Sarkis et al., (2014) também encontraram valores mais elevados quando utilizaram apenas água como solvente para extração dos compostos da semente de sésamo, e relacionaram o fato de que maiores quantidades de proteínas que possuem atividade antioxidante terem sido extraídas com o solvente aquoso.

As Figuras 2a e b, representam as placas resultantes das análises de inibição microbiana com *Staphylococcus aureus* (a) e *Escherichia coli* (b), dos filmes de zeína.

Ao analisar as placas inoculadas com os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, observou-se a ausência de halos de inibição no entorno dos discos de filme em contato com a placa. Isso indica que para todos as formulações de filmes produzidas, não houve atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados. Nobile et al., (2008) avaliaram a eficácia antimicrobiana de timol incorporado a filmes de zeína contra *B. cereus*, *C. lusitaniae*, *Pseudomonas* spp. e *S. thermophilus*. Os resultados mostram que o filme não afetou o crescimento de *S. thermophilus*, mas foi eficaz contra os demais organismos patogênicos e deteriorante investigados. A concentração mínima

de timol nos filmes que permitiu uma atividade antimicrobiana efetiva foi de 20% enquanto que de 5% a 10% apenas desaceleraram seu ciclo de crescimento.

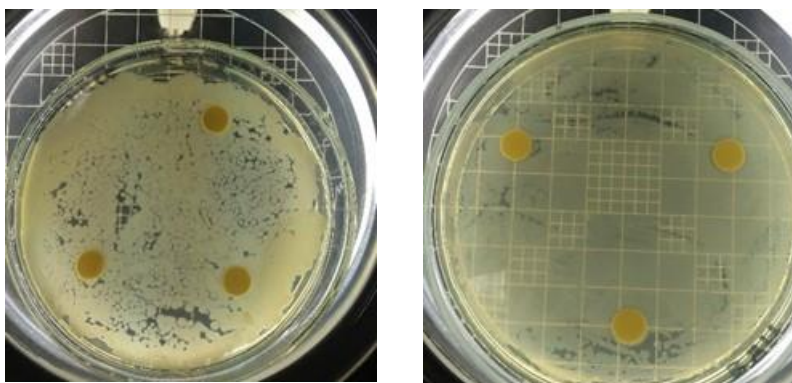


Figura 2 (a) e (b). Filmes de zeína com adição de extrato hidro alcoólico da casca de pinhão, inoculados com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente.

**Fonte:** Autoria própria.

Há necessidade de uma maior avaliação nesta análise visando buscar outras concentrações de extrato no filme ou até mudança na metodologia de análise com menor concentração de microorganismos.

## 6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados das análises realizadas, a produção por *film casting* dos filmes de zeína incorporados com casca de pinhão e diferentes extratos se demonstrou favorável. Os filmes apresentaram boas propriedades mecânicas em geral, ressaltando a melhor aplicação do pinhão à matriz da zeína na forma de extratos. Sendo o filme com extrato aquoso o que apresentou maiores melhorias combinadas, com alto valor do Módulo de Young, e maiores valores de alongação e tensão na ruptura, o que tornou satisfatório o resultado obtido.

Além disso, a capacidade antioxidante presente nos filmes se demonstrou satisfatória, colaborando para o possível uso dos filmes como embalagens ativas. Porém, quanto a capacidade antimicrobiana dos filmes para os microrganismos testados, os resultados não foram positivos. Estudos futuros para a forma de extração dos componentes da casca do pinhão, e diferentes concentrações dos solventes podem ser aprofundados, de modo que a fixação dos compostos (fenólicos e estruturais) da semente seja mais aproveitada.

## 7. REFERÊNCIAS

AABY, K.; HVATTUM, E.; SKREDE, G. Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: Relationship to antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4595-4603, 2004.

AKUNHANMI, T. F.; ATASIE, V. N.; AKINTOKUN, P. O. Chemical Composition and Physicochemical Properties of Cashew nut (*Anacardium occidentale*) Oil and Nut Shell Liquid. **Journal of Agricultural, Food, and Environmental Sciences**. v. 2, 2008.

ALMEIDA, M. T. R. Isolamento e identificação de substâncias ativas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze com potencial atividade antiviral. 110 p. **Dissertação de Mestrado em Farmácia**. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ARAÚJO, G. K. P. Desenvolvimento de filmes biodegradáveis de amido incorporados com extrato de própolis. 43 p. **Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação do Curso Superior de Tecnologia de Alimentos**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

ARAÚJO, G. K.; SOUZA, S. J.; SILVA, M. V.; YAMASHITA, F.; GONÇALVES, O. H.; LEIMANN, F. V.; SHIRAI, M. A. Physical, antimicrobial and antioxidante properties of starch-based film containing ethanolic própolis extract. **International Journal of Food Science and Technology**, 2015.

ARAÚJO, L. F.; GUIOTOKU, M. Casca de pinhão: uma alternativa para obtenção de carvão vegetal. **XVII Encontro de Química da Região Sul**, Curitiba, 2010.

ARNAO, M. B.; CANO, A.; ACOSTA, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.73, p. 239-244, 2001.

BABU, R. P.; O'CONNOR, K.; SEERAM, R. Current progress on bio-based polymers and their future trends. **Prog. Biomaterials**, v. 2, p. 1–16, 2013.

BALANGE, A. K.; BENJAKUL, S. Effect of oxidised tannic acid on the gel properties of mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) mince and surimi prepared by different washing processes. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1693–1701, 2009.

BANDYOPADHYAY, J.; RAY, S. S. Mechanism of enhanced tenacity in a polymer nanocomposite studied by small-angle X-ray scattering and electron microscopy. **Polymer**, v. 51, p. 4860 – 4866, 2010.

BARBOSA, V.; RAMIRES, E. C; RAZERA, I. A. T.; FROLLINI, E. Biobased composites from tannin-phenolic polymers reinforced with coir fibers. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 305-312, 2010.

BATISTA, R. A. **Produção e avaliação sensorial de cerveja com pinhão (*Araucaria angustifolia*)**. 108 p. Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2014.

BEHRECHSEN, L. **Desenvolvimento de Filmes Biodegradáveis de Amido Incorporados com Zeólita**. 46 p. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação do Curso Superior de Tecnologia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

BORDILAU, R.; SPIRIDON, L.; TEACA, C. A.; ANGHEL, N.; ICHIM, M.; COLCERU, S.; ARMATU, A. Anti-inflammatory Constituents from different medicinal plants, **J CIV ENG MANAG.**, v. 8, p. 785-792, 2009.

DAROLT, L. M.; HELM, C. V. Caracterização da composição química e compostos fenólicos do pinhão. **Anais do XI Evento de Iniciação Científica da Embrapa Florestas**. 2012.

NOBILE, D. M. A.; CONTE, A.; INCORONATO, A. L.; PANZA, O. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. **Journal of Food Engineering**, v. 89, p. 57–63, 2008.

FERRARI, V. J.; ARQUEZ, A. P.; HANAI, J. B.; SOUZA, R. A. Development of high performance fiber reinforced cement composites (HPFRCC) for application as a transition



layer of reinforced beams. **Revista Ibracon de Estruturas e Materiais**, v. 7, n. 6, p. 965-975, 2014.

FORATO, L. A.; BRITTO, D.; SCRAMIN, J. A.; COLNAGO, L. A.; ASSIS, O. B. G. Propriedades Mecânicas e Molhabilidade de Filmes de Zeínas Extraídas de Glúten de Milho. **Polímeros**. v. 23, n. 1, p. 42-48, 2013.

GAMA, T. M. M. T. B. Estudo Comparativo dos Aspectos Físico-Químicos do Pinhão Nativo e do Pinhão Proveniente de Processos de Polinização Controlada de Araucaria Angustifolia e da Influência do Tratamento Térmico. **UFPR**. Curitiba, p. 41-44, 2006.

GHANBARZADEH, B.; OROMIEHIE, A. R.; MUSAVI, M.; D-JOMEH, Z. E.; RAD, E. R.; MILANI, J. Effect of plasticizing sugars on rheological and thermal properties of zein resins and mechanical properties of zein films. **Food Research International**, v. 39, p. 882–890, 2006.

GOMEZ-ESTACA, J.; DICASTILLO, C. L.; MUÑOZ, H. P.; CATALÁ, R.; GAVARA. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science and Technology**, v. 35, p. 42-51, 2014.

GONZÁLEZ, A.; IGARZABAL, C. I. Soy protein – Poly (lactic acid) bilayer films as biodegradable material for active food packaging. **Food Hydrocoll**, v. 33, p. 289–296, 2013.

GONZÁLEZ, A.; TÁRTARA, L.I.; PALMA, S.D.; IGARZABAL, C.I. Crosslinked soy protein films and their application as ophthalmic drug delivery system. **Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.**, v. 51, p. 73–79, 2015.

GUPTA, B. S.; CHATTERJEE, P. K. Absorbent Technology. **Textile Science and Technology**, v. 13, cap. VI, 2002.

IMRAM, M.; REVOL-JUNELLES, A.; MARTYN, A.; TEHRANY, E. A.; JACQUOT, M.; LINDER, M.; DESOBRY, S. Active food packaging evolution: transformation from micro to nanotechnology. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, p. 799-821, 2010.

JOSEPH, K.; FILHO, R. D. T.; JAMES, B.; THOMAS, S.; CARVALHO, L. H. A Review On Sisal Fiber Reinforced Polymer Composites. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 3, n. 3, p. 367-379, 1999.

JUNTACHOTE, T.; BERGHOFER, E.; BAUER, F.; SIEBENHANDL, S. The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy basil and rosemary. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p.121-133, 2006.

KAJDZANOSKA, M.; PETRESKA, J.; STEFOVA, M. Comparison of different extraction solvent mixtures for characterization of phenolic compounds in strawberries. **Journal of Agriculture and Chemistry**, v. 10, p. 25-59, 2011.

KU, H.; Wang, H.; PATTARACHAIYAKOOP, N.; TRADA, M. A review on the tensile properties of natural fiber reinforced polymer composites. **Composites: Part B**, v. 42, p. 856–873, 2011.

KUNANOPPARAT; T.; MENUT; P.; MOREL; M.-H.; GUILBERT; S. Reinforcement of plasticized wheat gluten with natural fibers: From mechanical improvement to deplasticizing effect. **Composites: Part A**; v. 39; p 777–785; 2008.

KURECK, I. Obtenção e Caracterização de Micropartículas de Zeína Carregadas com Extratos Antioxidantes de Casca de Noz-Pecã [*Carya illinoensis* (wangenh) C. Koch]. **Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias**, Florianópolis, 2014.

LIMA, E. C.; ROYER, B.; VAGHETTI, J. C. P.; BRASIL, J. L., SIMON, N. M.; SANTOS, A. A.; PAVA, F. A.; DIAS, S. L. P.; BENVENUTTI, E. V.; SILVA, E. A. Adsorption of Cu(II) on *Araucária angustifolia* wastes: Determination of the optimal conditions by statistic desing of experiments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 140, p. 221-220, 2007.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; NARITSKY, N. E. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. **Journal of Food Engineering**, v. 75, p. 453-460, 2006.

MENSITIERI, G.; MAIO, E. ; BUONOCORE, G. G.; NEDI, I.; OLIVIERO, M.; SANSONE, L.; IANNACE, S. Processing and shelf life issues of selected food packaging materials and

structures from renewable resources. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 72-80, 2011.

MONTAÑO-LEYVA, B.; GHIZZI, G. D. S.; GASTALDI, E.; GONTARD, N.; ANGELLIER-COUSSY, H.; TORRES-CHAVEZ, P. Biocomposites from wheat proteins and fibers: Structure/mechanical properties relationships. **Industrial Crops and Products**, v. 43, n. 1, p. 545-555, 2013.

MORI, C. L. S. O.; PASSOS, N. A.; OLIVEIRA, J. E.; MATTOSO, L. H. C.; MORIC, F. A.; CARVALHO, A. G.; FONSECA, A. S.; DENZIN, G. H. Tonolielectrospinning of zein/tannin bio-nanofibers. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 298– 304, 2014.

MOTA, G. S. T.; ARANTES, A. B.; SACCHETTI, G.; SPAGNOLETTI, A.; ZIOSI, P.; SCALAMBRA, E.; VERTUANI, S.; MANFREDINI, S. Antioxidant activity of cosmetic formulations based on novel extracts from seeds of brazilian araucaria angustifolia (Bertoll) kuntze. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 4, p. 190-202, 2014.

NERGIZ, C.; DONMEZ, I. Chemical composition and nutritive value of Pinus pinea L. seeds. **Food Chemistry**, v. 86, p. 365-368, 2004.

OLIVEIRA, F. C.; PETTERMANN, A. C.; NOREÑA, C. P. Z.; WADA, K.; MARCZAK, L. D. F. Thermodynamic properties of moisture desorption of raw pinhão (Araucaria angustifolia seeds). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 900-907, 2008.

OLIVEIRA, T. G. Desenvolvimento de filmes biodegradáveis à base de proteína da torta de mamona (*Ricinus communis L.*) modificada com glioxial e reforçados com fibras de celulose. **Dissertação de mestrado, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos**, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

PAPALIAI, Í. S.; LONDEROI, P. M. G. Extração de zeína e sua aplicação na conservação dos alimentos. **Ciência Rural**, v. 45, n. 2, p. 552-559, 2015.

PEHLIVAN, H.; BALCOSE, D. S.; TIHMINGLIOGLU, U. F. Characterization Of Pure And Silver Exchanged Natural Zeolite Filled Polypropylene Composite Filmes. **Composites Science and Technology**, v. 65, p. 2049-2058, 2005.

PHIRIYAWIRUT, M.; MANIAW, P. Cellulose Microfibril from Banana Peels as a Nanoreinforcing Fillers for Zein Films. **Open Journal of Polymer Chemistry**, v. 2, p. 56-62, 2012.

PIZZOLI, A. P. O. **Produção e caracterização de laminados biodegradáveis e antimicrobianos para embalagens de alimentos**. 73 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Campo Mourão, 2014.

RAZAVI, S. M. A.; AMINI, A. M., ZAHEDI, Y. Characterisation of a new biodegradable edible film based on sage seed gum: Influence of plasticiser type and concentration. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 290–298, 2015.

RHIM, J. W.; PARK, H. M.; HA, C. S. Bio-nanocomposites for food packing applications. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1629-1652, 2013.

ROMERO-BATISDA, C. A.; MARTIN-POLO, M. O.; VELAZQUEZ, G.; TORRES, J. A. Effect of Plasticizer, pH, and Hydration on the Mechanical and Barrier Properties of Zein and Ethylcellulose Films. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 4, n. 4, p. 252-256, 2004.

ROSA, M. F.; CHIOU, B.; MEDEIROS, E. S.; WOOD, D. F.; MATTOSO, L. H. C.; ORTS, W. J.; IMAM, S. H. Biodegradable composites based on starch/EVOH/Glycerol blends and coconut fibers. **Journal of Applied Polymer Science**, p. 612-618, 2008.

SÁNCHEZ, V. A. G.; DOMÍNGUEZ, G. C.; SÁNCHEZ, E. M.; PÉREZ, J.J. C.; CRUZ, G. V.; MÉNDEZ, J. V.; ROJAS, E. T.; REBOLLO, R. R. F. Preparation and characterisation of zein films obtained by electrospraying. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 1–10, 2015.

SANTANA, M. C. C. B.; MACHADO, B. A. S.; SILVA, T. N.; NUNES, I. L.; DRUZIAN, J. I. Incorporação de urucum como aditivo antioxidante em embalagens biodegradáveis a base de quitosana. **Ciência Rural, Santa Maria**, 2012.

SANTOS, A. F. **Produção de filmes ativos a base de amido e zeólita modificada com prata**. 42 p. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação do Curso Superior de Tecnologia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal Do Paraná. Campo Mourão, 2014.

SARKIS, J. R.; MICHEL, I.; TESSARO, I. C.; MARCZAK, L. D. F. Optimization of phenolics extraction from sesame seed cake. **Separation and Purification Technology**, v. 122, p. 506–514, 2014.

SERNA, C. P. **Desenvolvimento de filmes biodegradáveis à base de zeína, caracterização das propriedades funcionais e estruturais e avaliação do uso como cobertura na conservação das características físico-químicas do queijo Minas padrão**. Tese de Doutorado Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. São José do Rio Preto, 2015.

SHEN, Z.; KAMDEM, D. P. Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 289–296, 2015.

SILVA, L. T. **Eficácia da Atividade Antioxidante e Caracterização de Embalagens Ativas Biodegradáveis Formuladas com Amido de Mandioca e Derivados de Cacau e Café**. 148 p. Trabalho de conclusão de curso de especialização (Ciência de Alimentos). Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2009.

SILVA, L. TOSTA. **Eficácia da Atividade Antioxidante e Caracterização de Embalagens Ativas Biodegradáveis Formuladas com Amido de Mandioca e Derivados de Cacau e Café**. 148 p. Trabalho de conclusão de curso de especialização (Ciência de Alimentos). Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2009.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16(3), p. 144-158, 1965.

SOBRAL, P. J. A. Propriedades funcionais de biofilmes de gelatina em função a espessura. **Ciência e Tecnologia**, v. 8, n. 1, p. 60-67, 1999.

STRATIL, P., KLEJDUS, B., KUBAN, V. Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables Evaluation of Spectrophotometric Methods. **Food Chemistry**, v. 54, p. 607-616, 2006.

SURVESWARAN, S.; CAI, Y. Z.; CORKE, H.; SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 102, p. 938–953, 2007.

TIAN, F.; DECKER, E. A.; GODDARD, J. M. Controlling lipid oxidation of food by active packaging technologies. **Food and Function**, v. 4, p. 669-680, 2013.

TUKUN, A. B.; SHAHEEN, N.; BANU, C. D.; MOHIDUZZAMAN, M. D.; ISLAM, S.; BEGUM M. Antioxidant capacity and total phenolic contents in hydrophilic extracts of selected Bangladeshi medicinal plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, p. 568-573, 2014.

VÁZQUEZ, G.; FONTENLA, E.; SANTOS, J.; FREIRE, M. S.; ANTORRENA, G. Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p. 279-285, 2008.

VILMAR, B. J.; RAMIRES, E. C.; RAZERA, I. A. T.; FROLLINI, E. Biobased composites from tannin–phenolic polymers reinforced with coir fibers. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 305–312, 2010.

YIN, Y.C.; YIN, S. W.; YANG, X. Q.; TANG, C. H.; WEN, S. H.; CHEN, Z. Surface modification of sodium caseinate films by zein coatings. **Food Hydrocoll**, v. 36, p. 1–8, 2014.

ZHANG, B.; LUO, Y.; WANG, Q. Development of Silver-Zein Composites as a Promising Antimicrobial Agent. **Biomacromolecules**, v. 11, p. 2366–2375, 2010.

ZHANG, B.; LUO, Y.; WANG, Q. Effect of acid and base treatments on structural, rheological, and antioxidant properties of alpha-zein. **Food Chemistry**, v. 124, p. 210-220, 2011.