UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

Tiara Gomes de Oliveira

Caracterização de filmes à base de gelatina aditivados com extratos vegetais

Pirassununga
2017

Tiara Gomes de Oliveira

Caracterização de filmes à base de gelatina aditivados com extratos vegetais.

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências do programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O48c Oliveira, Tiara Gomes de
Caracterização de filmes à base de gelatina
aditivados com extratos vegetais / Tiara Gomes de
Oliveira ; orientador Prof. Dr. Paulo José do
Amaral Sobral. -- Pirassununga, 2017.
119 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de Zootecnia
e Engenharia de Alimentos, Universidade de São
Paulo.

1. Filmes . 2. Gelatina. 3. Extratos vegetais.
4. antioxidantes. I. Sobral, Prof. Dr. Paulo José
do Amaral, orient. II. Título.

Dedico a meus pais João e Francisca
por todo apoio que me dedicaram e
a minha irmã pela eterna amizade.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado abrindo meus caminhos;

A meus pais João e Francisca, por serem meus maiores exemplos, por sempre me apoiarem e pelo amor incondicional que me oferecem;

À minha irmã Latulia, pela cumplicidade, amizade, risadas e apoio;

Ao meu orientador Prof. Sobral, pelo seu exemplo como pesquisador, pela dedicação, paciência, incentivo e confiança;

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP) pela oportunidade de realização do curso;

À Gisele Lourenço e ao German Ayala, por todas as vezes que me auxiliaram com o projeto e nunca se negarem a tirar minhas dúvidas. Muito obrigado;

A todos do LTA que de alguma forma contribuíram para este trabalho;

A todos meus colegas do curso de pós graduação, em especial: Adja, Cristhian Flaker, Fausto Makishi, Flávia Vargas, Lucas Arantes, Thaysa, Hugo, Volnei, Vitor, Carla Luciano e Jaiber, Rafael (Raj). E aos da graduação Gabriel Mitani, Matheus Siqueira, Vinicius Saggin, sou muito feliz pela oportunidade de ter cada um de vocês na minha vida;

Ao Fabio Perdiz por ter cedido um tempo para leitura da tese, e contribuir com valiosas alterações;

À minha família, em especial à Ana Cristina Mereu, por servir de exemplo e, assim, me incentivar a seguir a área acadêmica. E ao Edilson Mereu por ser meu técnico em informática que nunca se negou a me ajudar;

Às companheiras de república Luana, Jéssica Saito, Eloise, Rafaela, Lívia e Jessica Campos sem vocês estes anos não seriam tão divertidos. Obrigada pela convivência, amizade e compreensão;

À Bianca Gramulia, minha prima, amiga, companheira de casa, irmã;

Aos estagiários do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) em especial as minhas estagiárias: Isabella Strozi e Victoria Dobra e aos da Gisele: Max e Emily, obrigada por toda ajuda;

À Camila, Natália e Julia pela companhia e amizade no tempo que estive na França;

Agradeço à Prof^a Perla Relkin (AgroParis Tech) pela oportunidade de realização do intercâmbio, à Prof^a Marie Noëlle Maillard e o técnico Even Le Roux pelos ensinamentos e auxílio nas análises. Agradeço também a toda equipe da AgroParis Tech – Massy;

Aos técnicos de laboratório Ana Mônica e Rodrigo Lourenço pelas análises realizadas;

À Prof^a Samantha Pinho pela oportunidade de realizar o PAE e assim contribuir com meu desenvolvimento profissional;

Aos funcionários da FZEA pela prestatividade;

À APG-FZEA e todos os participantes ao longo destes anos, muito obrigado pelos ensinamentos;

Ao coletivo Unindo Forças, por ter me proporcionado a oportunidade de participar do CoPGr e poder conhecer a Universidade fora do laboratório;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado (385398/2013-1) e a oportunidade do doutorado sanduíche na Franca (205835/2014-7);

A todos que direta e indiretamente auxiliaram na elaboração deste trabalho;

*Você não pode impedir as mudanças...
assim como não pode impedir o pôr do sol*

Shmi Skywalker

Resumo

Filmes à base de polímeros contendo compostos com atividade antioxidante, podem ser usados na produção de embalagem ativa, que interagem com o alimento contribuindo na sua conservação e no prolongamento da vida de prateleira de alimentos ricos em componentes sensíveis ao oxigênio. Os extratos vegetais são ricos em polifenóis, conhecidos por sua atividade antioxidante e são uma alternativa ao uso dos antioxidantes sintéticos. Assim, o objetivo principal desta tese foi o desenvolvimento de filmes à base de gelatina adicionados de extratos vegetais, com propriedades físicas e funcionais para seu emprego como embalagens bioativas. Foram produzidos extratos aquosos de sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth), folha de amoreira preta (*Morus nigra* L.), carqueja (*Baccharis trimera*), hortelã (*Mentha piperita*) e folha de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). Os extratos produzidos em três temperaturas (30, 45 e 60 °C) foram caracterizados quanto a sua cor instrumental, teor de sólidos solúveis, matéria seca, pH, composição proximal e em relação a sua atividade antioxidante (capacidade redutora, DPPH e ABTS). Os extratos que apresentaram maiores atividades antioxidantes foram utilizados na produção dos filmes. Os filmes foram produzidos pela técnica casting com 8 g de gelatina/100g de solução e glicerol (30 g de glicerol/100 g de gelatina) como plastificante. A quantidade de extrato adicionada foi estudada (0, 50 e 150 g de extrato/100 g de gelatina) para a obtenção das melhores propriedades antioxidantes. Os filmes foram submetidos às seguintes caracterizações: espessura, umidade, solubilidade, cor, opacidade, brilho, permeabilidade ao vapor de água, propriedades mecânicas (tração e perfuração), microestrutura (espectroscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura), propriedades térmicas (DSC), estrutura química com uso de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e determinação da atividade antioxidante (capacidade redutora, DPPH e ABTS). O estudo demonstrou que as amostras vegetais analisadas e as temperaturas de extração escolhidas foram eficientes na produção de extratos com atividade antioxidante, sendo possível sua utilização para produção de filmes ativos. Os extratos que apresentaram maiores atividades antioxidantes foram os extratos de folha de pitangueira, semente de guaraná e hortelã, extraídos a 60 °C, sendo estes escolhidos para a produção dos filmes. Para a caracterização dos filmes, a adição dos extratos em geral não afetou nas propriedades mecânicas (tração e perfuração), umidade e solubilidade, não existindo diferença significativa entre os

filmes controles sem extratos e os com extratos. A cor dos filmes sofreu influência na adição dos extratos, sendo que filmes acrescidos com os extratos apresentaram uma tendência mais escura e amarelada que os filmes controles. Entretanto, observou-se que, como esperado, os filmes com extratos demonstraram um aumento na atividade antioxidante e propriedades de barreira, sendo os acrescidos com extrato de folha de pitangueira, os que apresentaram melhores resultados.

Palavras chaves: antioxidantes, folhas de pitangueira, hortelã, carqueja, folhas de amoreira preta, guaraná

Abstract

Films based on biopolymers containing compounds with antioxidant activity can be used to produce active packaging, which interact with the food, contributing to its conservation and the increasing of the shelf life of the food rich in compounds oxygen sensitive. Plant extracts are rich in polyphenols, known for their antioxidant capacity and are an alternative to the use of synthetic antioxidants. Thus, the general goal of this thesis was to develop gelatin-based films added with vegetal extracts, with physical and functional properties for their use as bioactive packaging. Liquid extracts of Guarana (*Paullinia cupana* Kunth) seeds, mulberry (*Morus nigra* L.) leaves, carqueja (*Baccharis trimera*.), peppermint (*Mentha piperita*) and pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves were produced. The extracts produced in three temperatures (30, 45 and 60 °C) were characterized by their antioxidant capacity (total phenols, DPPH and ABTS), instrumental color, soluble solids, dry matter, pH and proximal composition. The extracts with the highest antioxidant activity were used in the film's production. The films were produced by the casting technique with 8 g of gelatin / 100 g of solution and glycerol (30 g of glycerol/100 g of gelatin) as plasticizer. The amount of extract added to study the antioxidant properties were : 0, 50 and 150 g of extract / 100 g of gelatin. The films were subjected to the following characterizations: thickness, mechanical properties (traction and perforation), color, opacity, gloss, humidity, solubility, water vapor permeability, microstructure (Atomic force spectroscopy and scanning electron microscopy), thermal properties (DSC), determination of the antioxidant capacity, determination of reducing capacity and chemical structure using Fourier transform infrared spectroscopy. The study demonstrated that the analyzed plant samples and the chosen extraction temperatures were efficient in the production of extracts with antioxidant activity, being possible its use for the production of active films. Extracts of pitanga leaves, guarana seed and peppermint, produced at 60 °C, were chosen due to their high antioxidant activity. In general, the characterization of the films shown that the addition of the extracts did not affect in the mechanical, solubility and humidity properties, having no significant difference between the control films, with no extract, and those with extracts. The colour of the films were influenced by the addition of the extract, with the increase of darkness and yellowness of the films, when films were added with the extracts. As expected, it was observed that the films with extracts showed an increase in the

antioxidant capacity and barrier properties, being that films added with extracts of pitanga leaves presented the better results.

Keywords: antioxidants, pitanga leaves, peppermint, carqueja, mulberry leaves, guaraná

Lista de Figura

Figura 1 – Ressonância do anel aromático presentes nos compostos fenólicos.....	22
Figura 2 - Estrutura química dos principais antioxidantes fenólicos sintéticos	23
Figura 3 - Estrutura química dos principais compostos antioxidantes fenólicos	24
Figura 4 - Pitangueira	26
Figura 5 - Guaraná.....	27
Figura 6 - Amoreira preta	28
Figura 7 - Carqueja	29
Figura 8 – Hortelã (<i>Mentha piperita</i> L.).....	30
Figura 9 - Amostras vegetais moídas	32
Figura 10 - Produção dos extratos vegetais	33
Figura 11 Reação entre o radical DPPH e o antioxidante para formação do DPPH	36
Figura 12: Formação do radical ABTS a partir da reação de ABTS com persulfato de potássio	38
Figura 13 - Preparação dos extratos para a análise de UHPLC-DAD-MS.....	40
Figura 14 - Extratos vegetais extraídos a 60 °C	56
Figura 15 - Correlação entre os resultados das análises de capacidade de redução e captura do radical ABTS dos extratos vegetais.....	65
Figura 16 - Correlação entre os resultados das análises de capacidade de redução e captura do radical DPPH dos extratos vegetais.....	65
Figura 17 - Correlação entre os resultados das análises de captura do radical DPPH e captura do radical ABTS dos extratos vegetais.....	66
Figura 18 - Cromatograma do extrato aquoso de hortelã analisado por UHPLC/DAD/MS imediatamente após a preparação (preto) e depois de 16 h de armazenamento (vermelho)	68
Figura 19 - Cromatograma do extrato aquoso de hortelã analisado por UHPLC/DAD/MS após 16 h de armazenamento	69
Figura 20 - Filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais	75
Figura 21 - Microscopias da superfície dos filmes de gelatina sem adição de extrato vegetal	89
Figura 22 - Microscopia da superfície dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais em contato com a placa.....	90
Figura 23 - Microscopia da superfície dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais em contato com o ar.....	91

Figura 24 - Microscopia superfície interna dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais, crioaturadas.....	92
Figura 25 - Microscopia de força atômica das superfícies 2 D e 3D do filme de gelatina sem adição de extrato vegetal	94
Figura 26 - Microscopia de força atômica das superfícies dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extrato vegetal	95
Figura 27 – Espectros de FTIR de filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais	96
Figura 28 – Espectros no UV/Visível dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais	98
Figura 29 - Exemplos de termogramas para os filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais.....	99

Lista de tabela

Tabela 1 - Descrição das amostras vegetais utilizadas	31
Tabela 2 - Composição proximal das amostras vegetais em base seca	52
Tabela 3 - Sólidos solúveis dos extratos vegetais.	54
Tabela 4 - Teor de matéria seca dos extratos vegetais	55
Tabela 5 - Cor dos extratos vegetais.....	57
Tabela 6 - Rendimento dos extratos vegetais.	58
Tabela 7 - pH dos extratos vegetais.....	59
Tabela 8 - Atividade antioxidante dos extratos vegetais pelo método de captura do radical DPPH	60
Tabela 9 - Atividade antioxidante dos extratos vegetais pelo método de captura do radical ABTS	62
Tabela 10 - Capacidade redutora total dos extratos.....	63
Tabela 11 - Compostos identificados no extrato de hortelã estocado por 16 h a 4 °C obtidos por UHPLC/DAD/MS/ ESI-	70
Tabela 12 - Quantificação de flavonoídes e ácidos fenólicos no extrato aquoso de hortelã	73
Tabela 13 - Conteúdo de compostos fenólicos.....	74
Tabela 14 - Teor de matéria seca de extrato nos filmes com diferentes concentrações de extratos vegetais	76
Tabela 15 - Espessura dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais	76
Tabela 16 - Parâmetros L*, a* e b* de filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais	79
Tabela 17 - Valores de diferença total de cor (ΔE^*) e opacidade para os filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais.	80
Tabela 18 - Brilho de filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais..	82
Tabela 19 - Umidade e solubilidade de filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais	83
Tabela 20 - Valores de permeabilidade do vapor de água de filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais	84
Tabela 21 - Tensão na ruptura (TR), alongação na ruptura (ER) e módulo de elasticidade (ME) dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais	86

Tabela 22 - Valores da força na perfuração (FP), deformação na perfuração (DP) dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais.....	88
Tabela 23 – Rugosidade dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais	93
Tabela 24 - Análise térmica dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais	100
Tabela 25 - Atividade antioxidante dos filmes de gelatinas com diferentes concentrações de extratos vegetais obtidas pelo método de captura do radical DPPH.	102
Tabela 26 - Atividade antioxidante dos filmes de gelatinas com diferentes concentrações de extratos vegetais obtidas pelo método de captura do radical ABTS.	103
Tabela 27 - Capacidade redutora total dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais	104

Sumário

1	Introdução	16
2	Objetivo e hipótese	18
3	Revisão Bibliográfica	19
3.1	Embalagens Ativas	20
3.2	Compostos fenólicos	22
3.3	Pitangueira	25
3.4	Guaraná.....	26
3.5	Amoreira Preta.....	27
3.6	Carqueja.....	28
3.7	Hortelã	29
4	Material e métodos	31
4.1	Material.....	31
4.2	Preparo das amostras vegetais	32
4.3	Composição proximal das amostras vegetais	33
4.4	Preparo dos extratos	33
4.5	Análises dos extratos	34
4.5.1	Determinação do teor de sólidos solúveis totais e matéria seca dos extratos.....	34
4.5.2	Análise instrumental de cor dos extratos.....	34
4.5.3	Análise do pH e rendimento dos extratos.....	35
4.5.4	Análises de atividade antioxidante e capacidade redutora dos extratos	35
4.5.4.1	Método da captura do radical DPPH (DPPH•).....	36
4.5.4.2	Método da captura do radical ABTS (ABTS•+).....	37
4.5.4.3	Capacidade redutora dos extratos	39
4.5.5	Cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC).....	40
4.6	Produção dos filmes	42
4.7	Caracterização dos filmes	42
4.7.1	Espessura dos filmes.....	43
4.7.2	Cor e opacidade dos filmes.....	43
4.7.3	Brilho dos filmes	44
4.7.4	Umidade e Solubilidade em Água dos filmes	44
4.7.5	Permeabilidade ao Vapor de Água	45
4.7.6	Propriedades mecânicas dos filmes	46
4.7.6.1	Propriedades mecânicas dos filmes por testes de tração	46

4.7.6.2	Propriedades mecânicas dos filmes por testes de perfuração	47
4.7.7	Microestrutura dos filmes	47
4.7.8	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	48
4.7.9	Propriedades de barreira à luz visível dos filmes	48
4.7.10	Propriedades térmicas dos filmes	48
4.7.11	Análises de atividade antioxidante e capacidade redutora dos extratos	49
4.7.11.1	Método da captura do radical DPPH (DPPH•).....	49
4.7.11.2	Método de captura do radical ABTS (ABTS•+).....	50
4.7.11.3	Capacidade redutora dos filmes.....	50
4.8	Análise estatística	51
5	Resultados e discussões	52
5.1	Caracterização das amostras vegetais.....	52
5.1.1	Composição proximal das amostras vegetais	52
5.2	Caracterização dos extratos	53
5.2.1	Determinação de sólidos solúveis e matéria-seca dos extratos.	53
5.2.2	Análise instrumental de cor dos extratos	55
5.2.3	Determinação do pH e rendimento dos extratos.....	58
5.2.4	Análises de Atividade Antioxidante e Capacidade Redutora dos Extratos	59
5.2.4.1	Método da captura do radical DPPH (DPPH•).....	59
5.2.4.2	Método da captura do radical ABTS	61
5.2.4.3	Capacidade redutora dos extratos	62
5.2.5	Correlação entre os ensaios antioxidantes	64
5.2.6	Cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC/DAD/MS).....	67
5.2.6.1	Identificação dos compostos fenólicos presentes na hortelã.	67
5.2.6.2	Quantificação.....	72
5.3	Características e propriedades dos filmes.....	74
5.3.1	Aspectos visuais e espessura	74
5.3.2	Cor e opacidade dos filmes.....	77
5.3.3	Brilho dos filmes	81
5.3.4	Umidade e solubilidade	82
5.3.5	Permeabilidade ao vapor de água (PVA)	84
5.3.6	Propriedades mecânicas.....	85
5.3.6.1	Propriedades mecânicas dos filmes por testes de tração	85
5.3.6.2	Propriedades mecânicas dos filmes por testes de perfuração	87

5.3.7	Microestrutura dos filmes	88
5.3.7.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	88
5.3.7.2	Microscopia de força atômica.....	93
5.3.8	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	96
5.3.9	Propriedade de barreira luz/UV	97
5.3.10	Temperatura de transição vítrea	99
5.3.11	Análises de Atividade Antioxidante e Capacidade Redutora dos filmes	101
5.3.11.1	Método da captura do radical DPPH	101
5.3.11.1	Método da captura do radical ABTS	103
5.3.11.2	Capacidade redutora dos filmes.....	104
6	Conclusão	106
7	Referências Bibliográficas.....	107

1 Introdução

As preocupações ambientais associadas à gestão de resíduos de plástico têm enfatizado a importância do desenvolvimento de materiais biodegradáveis (FANG et al., 2005). Plásticos biodegradáveis de fontes renováveis, além de diminuir a sobrecarga de aterros, também ajudam a preservar a não renovabilidade de fontes e contribuir para um desenvolvimento sustentável (REN, 2003).

A gelatina foi um dos primeiros biopolímeros estudados na tecnologia de filmes, devido à sua capacidade de formação de filme, sendo ainda de interesse por ser um material abundante, de preço relativamente baixo e excelentes propriedades funcionais (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2007; NÚÑEZ-FLORES et al., 2012). Esse interesse pode ser visto na literatura científica focada no desenvolvimento de filmes biodegradáveis e/ou comestíveis, com inúmeras referências em relação à gelatina, utilizada na forma pura ou misturada com outros biopolímeros (ANDREUCCETTI et al., 2011; CARVALHO et al., 2008; GIMÉNEZ et al., 2009a; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2007; JRIDI et al., 2014; NÚÑEZ-FLORES et al., 2013; TONGNUANCHAN; BENJAKUL; PRODPRAN, 2013).

Uma importante função da embalagem, quando considerada como uma tecnologia de conservação de alimentos, é impedir a contaminação do produto, retardando sua deterioração, estendendo o prazo de validade, mantendo a qualidade e a inocuidade dos alimentos embalados (LÓPEZ-RUBIO et al., 2004). Embalagens ativas fornecem novas abordagens para a melhoria das embalagens tradicionais, interagindo diretamente com o produto, com resultados benéficos para este (LÓPEZ-RUBIO et al., 2004; ROONEY, 2002). Alguns exemplos de sistemas de embalagens ativas incluem antioxidantes, adsorventes de umidade, sistemas enzimaticamente ativos e sistemas antimicrobianos (LÓPEZ-RUBIO et al., 2004). Embalagem com liberação de antioxidante é uma categoria de sistema de conservação de alimentos, no qual um antioxidante ou uma mistura de antioxidantes é incorporado ao filme, o que contribui para a extensão da vida útil dos alimentos (GIMÉNEZ et al., 2009b). No âmbito dos agentes naturais, recentemente, extratos de frutas e vegetais ganharam um mercado considerável nas indústrias de alimentos (AKHTAR et al., 2012).

Filmes contendo extratos de plantas têm sido desenvolvidos para uso em embalagens com potencial atividade antioxidante (CAMO et al., 2011; KANATT et al., 2012; MORADI

et al., 2012; NORAJIT; KIM; RYU, 2010; QUILAQUEO GUTIÉRREZ et al., 2012; SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010).

Entre as plantas, a folha de pitangueira (*Eugenia uniflora* L., Myrtaceae) apresenta quantidades elevadas de flavonóides e taninos, conhecidos pelo poder antioxidante (FIUZA et al., 2008). As sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) são ricas em cafeína e também contém teobromina, teofilina, taninos, catequina, epicatequina, proantocianidinas (KLEIN et al., 2015; PAGLIARUSSI; FREITAS; BASTOS, 2002; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007). A análise de composição da carqueja (*Baccharis trimera* L., Asteraceae) aponta a presença de muitos compostos bioativos, como flavonóides, diterpenos, triterpenos, flavonóides, lactonas, carquejol, entre outros (PÁDUA et al., 2010; SILVA et al., 2009). A hortelã (*Mentha piperita*, Lamiaceae) apresenta em sua composição muitos compostos com propriedades antioxidantes tais como ácidos fenólicos (ácido cafeíco, ácido coumárico, ácido rosmarínico e ácido sinápico), flavonóides (flavol-3-ol: galato de galocatequina; flavonóis: rutina e quercetina; flavanonas: hesperidina) (CHOUDHURY; KUMAR; GARG, 2006). A folha de amoreira preta (*Morus nigra* L., Moraceae) apresenta compostos fenólicos (principalmente rutina, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido ferúlico e o ácido sinápico), incluindo flavonóides totais em sua composição (ERCISLI; ORHAN, 2007; MEMON et al., 2010; RADOJKOVIC et al., 2012). Desta forma, a carqueja, a hortelã, a folha de pitangueira, a folha de amoreira preta e a semente de guaraná apresentam-se como uma boa alternativa como fontes de princípios ativos naturais.

2 Objetivo e hipótese

O objetivo geral desta tese foi o desenvolvimento de filmes à base de gelatina aditivados com extratos aquosos da carqueja, hortelã, folha de pitangueira, folha de amoreira preta ou semente de guaraná; com propriedades físicas e funcionais para seu emprego como embalagens bioativas.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliação das condições de extração e sua interferência nas propriedades antioxidantes, através das caracterizações quanto a cor, pH, teor de sólidos solúveis, matéria seca, composição mineral, atividade antioxidante, capacidade redutora e atividade antibacteriana.
- Estudo das relações entre as propriedades dos filmes e a adição de diferentes extratos em concentrações pré-determinadas.

Hipótese:

A hipótese considerada baseia-se na existência de atividade antioxidante nos extratos aquosos vegetais, e que tais atividades podem ser acrescentadas aos filmes à base de gelatina, como forma de elaborar embalagens ativas.

3 Revisão Bibliográfica

A utilização de biopolímeros e aditivos naturais para a proteção de alimentos pode ser vantajosa em termos de sustentabilidade ambiental e de aceitabilidade pelo consumidor. Materiais biodegradáveis e comestíveis derivados de plantas e animais, tais como proteínas (gelatina, caseína, glúten, soja), polissacarídeos (amido, alginato, ágar, carragena, pectina, celulose e seus derivados, chitosana) e lipídeos (cera de abelha), mostraram uma potencial habilidade para serem usados na produção filmes biodegradáveis (ETXABIDE et al., 2016, KANMANI; RHIM, 2014).

As proteínas são polímeros com sequências de aminoácidos e estrutura molecular específicas, que podem sofrer uma ampla gama de interações e reações químicas (PÉREZ-GAGO, 2011, TONGNUANCHAN; BENJAKUL; PRODPRAN, 2012). Dependendo da ordem sequencial dos aminoácidos, a proteína irá assumir estruturas diferentes ao longo da cadeia polimérica que irá determinar as estruturas secundárias, terciárias e quaternárias. Estas estruturas das proteínas podem ser modificadas para otimizar a configuração da proteína, as interações das proteínas, e as propriedades do filme resultante (PÉREZ-GAGO, 2011).

Os filmes à base de proteínas são finos, transparentes e flexíveis, e apresentam altas propriedades de barreira de oxigênio, dióxido de carbono e compostos voláteis, em comparação com filmes sintéticos sob baixa condição de umidade relativa, embora não apresentem efetividade para a permeabilidade ao vapor de água (BERGO; SOBRAL, 2007; CARVALHO; GROSSO, 2004; TONGNUANCHAN; BENJAKUL; PRODPRAN, 2012).

Dentre as proteínas, merece destaque a gelatina, que foi um dos primeiros insumos empregados na formação de biomateriais e tem sido um dos biopolímeros mais estudados devido a sua excelente propriedade formadora de filmes, e por ser uma matéria prima abundante, produzida praticamente em todo o mundo e de relativo baixo custo (NÚÑEZ-FLORES et al., 2012; THOMAZINE; CARVALHO; SOBRAL, 2006).

As gelatinas são produzidas em grande escala, a partir de peles e ossos de mamíferos (principalmente bovina e suína) por hidrólise parcial do colágeno envolvendo tratamento com álcali ou ácido (COPPOLA; DJABOUROV; FERRAND, 2012; DUAN et al., 2011; GÓMEZ-ESTACA, 2009b; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2007). O processo ácido produz a gelatina do Tipo A com um ponto isoelétrico entre 7 e 9, enquanto o processo alcalino

produz à gelatina do Tipo B com um ponto isoelétrico entre 4,6 e 5,2 (PÉREZ-GAGO, 2011).

A gelatina tem uma sequência única de aminoácidos que são responsáveis pela sua capacidade de formar géis, sendo que a glicina (26,4-30,5%) prolina (14,8-18%), hidroxiprolina (13,3-14,5%), ácido glutâmico (11,1-11,7%) e alanina (8,6-11,3%) são os aminoácidos mais comuns. Os restantes dos aminoácidos em ordem decrescente são arginina, ácido aspártico, lisina, serina, leucina, valina, fenilalanina, treonina, isoleucina, hidroxilenosina, histidina, metionina e tirosina (KEENAN,1997; NUR HANANI et al., 2012).

3.1 Embalagens Ativas

A embalagem ativa de alimentos tem sido definida como um sistema em que o produto alimentar, a embalagem e o ambiente interagem de forma positiva para prolongar a vida útil (LEE, 2011). As interações positivas entre as embalagens ativas, compreendem a remoção de gases indesejáveis (tais como oxigénio, vapor de água, etc.) a partir do espaço livre da embalagem, a emissão de gases desejados (tais como dióxido de carbono, etanol, etc.), a liberação de compostos ativos (tais como antimicrobianos, antioxidantes, enzimas, sabores, nutracêuticos, etc.) para a superfície dos alimentos e transferência de calor controlada (LEE, 2011).

Embalagem liberadora de antioxidantes é um dos tipos de sistemas de preservação, no qual um antioxidante ou mistura de antioxidantes é incorporado na embalagem, contribuindo para a extensão de vida de prateleira do alimento (GIMÉNEZ et al., 2009b). O uso de antioxidantes em filmes pode minimizar as limitações da adição direta de antioxidantes em alimentos que incluem limite específico de atividade, devido à sua participação em reações complexas em sistemas de alimentos e falta de seletividade para atingir a superfície de alimentos, onde ocorre a maioria das reações oxidativas (JAMSHIDIAN; TEHRANY; DESOBRY, 2012).

A principal motivação para o uso de antioxidantes é estender a vida de prateleira dos alimentos e reduzir o desperdício, inibindo a oxidação. A reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados, que provoca a oxidação e, por conseguinte a deterioração dos alimentos, ocorre em três etapas (RAMALHO; JORGE, 2006): na iniciação, ocorre a formação dos radicais livres do ácido graxo devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo, em condições favorecidas por luz e calor (RAMALHO; JORGE, 2006), na fase de propagação, o radical reage rapidamente com o O₂, produzindo um radical peroxila, os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando em um processo autocatalítico (BIANCHI; ANTUNES, 1999; RAMALHO; JORGE, 2006; RIBEIRO; SERAVALLI, 2004). Na fase da terminação, dois radicais combinam-se, formando produtos estáveis (produtos secundários de oxidação) obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis), etapa caracterizada pela redução do consumo de oxigênio e redução da concentração de peróxidos (RAMALHO; JORGE, 2006; RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação dos alimentos por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação. Estes interferem na fase de iniciação da reação, produzindo compostos que não participam da reação em cadeia de radicais livres e, com isso tem excelente efeito retardador (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004; SOARES, 2002). O segundo mecanismo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, com a doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (SOARES, 2002).

Uma das mais recentes tendências de pesquisa centrou-se na incorporação de extratos naturais bioativos em materiais à base de polímero, sendo que o enriquecimento destes filmes pode aumentar as propriedades funcionais dos filmes biodegradáveis e produzir uma embalagem ativa (NÚÑEZ-FLORES et al., 2013). Filmes contendo extratos de plantas têm sido desenvolvidos para a utilização em embalagens ativas com potencial antioxidante: filmes de polipropileno (polímero sintético) contendo extrato de orégano (CAMO et al., 2011), filmes ativos à base de quitosano e poli(vinil álcool) contendo extrato aquoso de menta e extrato da casca de romã (KANATT et al., 2012), filmes de quitosano com óleo essencial de *Zataria multiflora Boiss* e extrato de semente de uva (MORADI et al., 2012), filmes de alginato contendo extrato de ginseng (NORAJIT; KIM; RYU, 2010), filmes de quitosano com extrato de chá verde (SIRIPATRAWAN; HARTE, 2010), filmes

nanocompósitos de carboximetilcelulose–montmorillonita ativados com extratos de folhas de murta (*Ugni molinae Turcz*) (GUTIÉRREZ et al., 2012), filmes à base de gelatina extraídas de atum e acrescidos com extrato de orégano e alecrim (GÓMEZ-ESTACA et al., 2009c), filmes de gelatina extraída de atum acrescidos com extratos de folhas de murta (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2007) são alguns exemplos encontrados na literatura especializada.

3.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos nas formas simples ou de polímeros, podendo ter origem natural ou sintética (ANGELO; JORGE, 2007). As substâncias com núcleo fenólico apresentam destaque especial como antioxidante, por atuarem como eficientes captadores de espécies reativas de oxigênio (EROs), além de reduzirem e quelarem íons férricos que catalisam a peroxidação lipídica (ANDRADE et al., 2007). O radical fenoxi formado por reação de um fenol com um radical lipídico é estabilizado por elétrons desemparelhados em torno do anel aromático (Figura 1) (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992).

Figura 1 – Ressonância do anel aromático presentes nos compostos fenólicos

Fonte: adaptado de SHAHIDI, JANITHA, WANASUNDARA. Phenolic antioxidants. Critical reviews in food science & nutrition v. 32, n. 1, p. 67–103, 1992.

Antioxidantes fenólicos sintéticos, como o hidroxianisol de butila (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), propilgalato (PG) e terc-butil hidroquinona (TBHQ) (Figura 2), são comumente utilizados em alimentos, entretanto, um recente receio do consumidor quanto a sua segurança, alimentação mais natural e também devido ao seu uso ser limitado

e regulado pela Food and Drug Administration (FDA) (SHAHIDI; ZHONG, 2015), fez com que as pesquisas dirigissem seus estudos à busca de produtos naturais com atividade antioxidantes (SOARES, 2002).

Figura 2 - Estrutura química dos principais antioxidantes fenólicos sintéticos

Fonte: adaptado de SHAHIDI, JANITHA, WANASUNDARA. Phenolic antioxidants. Critical reviews in food science & nutrition. v. 32, n. 1, p. 67–103, 1992.

O grande interesse em relação a antioxidantes naturais iniciou-se nos últimos anos, principalmente devido à evidência epidemiológica e clínica sugerindo uma relação inversa entre o consumo de legumes e frutas e o risco de desenvolver doenças crônicas, e a crença pública de que fitoquímicos são inerentemente mais seguros do que produtos químicos sintéticos e podem ser assimilada facilmente pelo corpo (EMBUSCADO, 2015; URIBE et al., 2016). Muitas ervas, cereais, frutas, legumes, óleos, especiarias e materiais vegetais, possuem propriedades antioxidantes, principalmente por causa do teor de compostos fenólicos (RADOJKOVIC et al., 2012).

Várias fontes de antioxidantes naturais são conhecidas e algumas são amplamente encontradas no reino vegetal (ANGELO; JORGE, 2007). Entre os antioxidantes naturais mais utilizados podem ser citados os tocoferóis (JONGJAREONRAK et al., 2008), a canela (BONILLA; SOBRAL, 2016; HOQUE; BENJAKUL; PRODPRAN, 2011; LV et al., 2012) e extratos de plantas como alecrim (GÓMEZ-ESTACA et al., 2009a; ÖZCAN; ARSLAN, 2011; PIÑEROS-HERNANDEZ et al., 2016; VARGAS et al., 2016), e sálvia (MEKINIĆ et al., 2014; WOJDYLO; OSZMIANSKI; CZEMERYS, 2007).

Entre as estruturas químicas presentes nos extratos naturais às quais se atribui atividade antioxidante e conseqüentemente sua função fisiológica, destacam-se os

compostos fenólicos tais como ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonóides (Figura 3) (FURLONG et al., 2003).

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (ANGELO; JORGE, 2007). Os fenólicos, em plantas, são essenciais no crescimento e reprodução dos vegetais, além de atuarem como agente antipatogênico e contribuírem na pigmentação. Em alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa (ANGELO; JORGE, 2007). Os antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e, algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (RAMALHO; JORGE, 2006)

Figura 3 - Estrutura química dos principais compostos antioxidantes fenólicos

Fonte: Adaptado de LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. Food Chemistry, v. 125, n. 2, p. 288–306, 2011.

Extratos vegetais têm sido utilizados como alternativa ao uso de antioxidantes sintéticos, de diversas fontes: alecrim do campo (MARTINEZ-CORREA et al., 2012), sementes de uvas (DELGADO-ADÁMEZ et al., 2012a), folhas de ameixeiras-japonesas (DELGADO-ADÁMEZ et al., 2012b). Alguns autores sugeriram o uso de extratos de folha

de hortelã e curry como alternativa de antioxidantes em carne de porco (BISWAS; CHATLI; SAHOO, 2012), de carqueja em ovos (LÁZARO et al., 2013), de extratos de cravo, alecrim, casca de cássia, alcaçuz, noz-moscada, e cardamomo em carne de porco (KONG; ZHANG; XIONG, 2010), dentre outros.

Dentre estas fontes de extratos naturais, a semente de guaraná, as folhas de pitangueira, a carqueja, as folhas de amoreira preta e a hortelã foram escolhidas para este estudo.

3.3 Pitangueira

A pitangueira (*Eugenia uniflora* L., Myrtaceae) é uma árvore (Figura 4) amplamente distribuída em países da América do sul, principalmente Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (AMORIM et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2006). As folhas da pitangueira são conhecidas pelas inúmeras propriedades, sendo utilizada pela medicina popular como anti-inflamatório, anti-glicêmico e anti-hipertensão (GARMUS et al., 2014).

As folhas de pitangueira apresentam grande quantidade de flavonóides (quercetina e miricetina) e proantocianidinas, taninos e ácidos fenólicos, componentes conhecidos por suas atividades antioxidantes (FIUZA et al., 2008; FORTES et al., 2015; GARMUS et al., 2014; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987). Estas substâncias apresentam destaque especial como antioxidantes por atuarem como eficientes captadores de espécies reativas de oxigênio (EROs), além de reduzirem e quelarem íons férricos, que catalisam a peroxidação lipídica (ANDRADE et al., 2007). Por isso, além de trazer benefícios à saúde humana, estes componentes também são importantes para retardar ou prevenir a oxidação de produtos alimentícios (CELLI; PEREIRA-NETTO; BETA, 2011).

Os extratos das folhas desta espécie além de comprovada atividade antioxidante possui ainda atividade antimicrobiana e antifúngica (GARMUS et al., 2014; MARTINEZ-CORREA et al., 2011).

Figura 4 - Pitangueira

(a) Pitangueira (b) Fruto da pitanga. Fonte Própria autoria

3.4 Guaraná

O guaraná (*Paullinia cupana*, Sapindaceae) (Figura 5a), também conhecido como guaraná-da-amazonia, guaranaina, guarauva, uarana ou narana, é um fruto nativo da bacia Amazônica central, sendo o Brasil praticamente o único país a cultivá-la comercialmente, tendo aproximadamente 70 % da sua produção destinada para a indústria de bebidas (DALONSO; PETKOWICZ, 2012; SCHIMPL et al., 2013; VEIGA et al., 2014).

A semente do guaraná, além de ser utilizada como base para refrigerantes ou produtos dietéticos, em forma de pós ou doces, também pode ser utilizada para fins terapêuticos, como um estimulante do sistema nervoso (em casos de estresse físico ou intelectual), ou mesmo como antidiarréicos, diurético e agente antineural (BASILE et al., 2005; MATTEI et al., 1998). A semente de guaraná não apresenta toxicidade (MATTEI et al., 1998).

As sementes (Figura 5b) são separadas a partir dos frutos maduros e são conhecidas por seu alto teor de cafeína (3,2-7,0 %) (PAGLIARUSSI; FREITAS; BASTOS, 2002). Em sua composição também são encontrados em menor quantidade alcaloides, como metilxantinas (ex.: cafeína, teofilina e teobromina), taninos, catequinas, epicatequinas, proantocianidinas (KLEIN et al., 2015; PAGLIARUSSI; FREITAS; BASTOS, 2002; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007).

A semente de guaraná apresenta, além da atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e antifúngica comprovadas em diversos trabalhos (BASILE et al., 2005; MAJHENIČ; ŠKERGET; KNEZ, 2007).

Figura 5 - Guaraná

(a) Guaraná. Fonte: SCHIMPL, F.C. et al. Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *Journal of ethnopharmacology*, v. 150, n. 1, p. 14–31, 2013. (b) Semente de guaraná. Fonte: Própria autoria

3.5 Amoreira Preta

As amoreiras (*Morus* sp.) (Figura 6) encontram-se difundidas em uma vasta área de zonas tropicais, subtropicais e temperadas da Ásia, Europa do Norte e América do Sul e África, sendo as mais amplamente difundidas, *Morus alba*, *Morus rubra*, e *Morus nigra* (ÖZGEN; SERÇE; KAYA, 2009). A *Morus nigra*, conhecida como 'amora preta', tem frutos levemente ácidos e ganhou uma posição importante na indústria de alimentos, por ser rica em antocianinas (ÖZGEN; SERÇE; KAYA, 2009).

Esta espécie adapta-se facilmente a diferentes condições climáticas e topográficas e, por isso, o perfil químico das folhas e frutos pode ser bastante variado (RADOJKOVIC et al., 2012). No entanto, alguns estudos indicam grande presença de compostos fenólicos (principalmente rutina, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido ferrúlico, ácido sinápico e antocianinas), inclusive flavonóides totais, tanto nas folhas como nas frutas (ERCISLI; ORHAN, 2007; MEMON et al., 2010; PÉREZ-GREGORIO et al., 2011; RADOJKOVIC et al., 2012), com comprovada ação antioxidante e antimicrobiana do gênero *Morus* (FUKAI; KAITOU; TERADA, 2005; NAKAMURA et al., 2003; PÉREZ-GREGORIO et al., 2011).

Figura 6 - Amoreira preta

Fonte: Própria autoria

3.6 Carqueja

A Carqueja (*Baccharis trimera* (Less.), Asteraceae), (Figura 7) é uma espécie da América do Sul, amplamente distribuída no sul e leste do Brasil (GARCIA et al., 2014). A planta é comumente usada na medicina popular para o tratamento de doenças hepáticas, gastrointestinais, disfunções estomacais, processos inflamatórios e diabetes (DIAS et al., 2009; GAMBERINI et al., 1991; GARCIA et al., 2014).

A carqueja possui uma série de compostos antioxidantes, por exemplo, flavonóides (eupatorina, eupatrina, cirsimarina, circiliol, canferol e quercetina) e terpenos (GARCIA et al., 2014; PÁDUA et al., 2010; SILVA et al., 2009). Estudando a atividade antioxidante do extrato hidroalcolico da carqueja, Pádua et al. (2010) demonstraram que este é capaz de reduzir a liberação e/ou produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em neutrófilos. Assim, os compostos naturais presentes na *Baccharis trimera* podem proteger o corpo dos radicais livres e retardar o progresso de muitas doenças crônicas.

Figura 7 - Carqueja

Fonte: Própria autoria

3.7 Hortelã

A *Mentha* (vulgarmente conhecida como hortelã ou pudina) (Lamiaceae) tem sido usada devido ao seu valor medicinal e como ingrediente aromatizante (BIMAKR et al., 2011; CHAUHAN et al., 2009). Existem entre 25 e 30 espécies no gênero *Mentha*, incluindo hortelã, hortelã-pimenta, hortelã-brava, hortelã milho, bergamota, menta americana e menta coreana (CHOUDHURY; KUMAR; GARG, 2006). A hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) (Figura 8) é conhecida por ser um híbrido da *M. spicata* L. e da *Mentha aquatic* (ARSLAN; ÖZCAN; MENGEŞ, 2010).

Entre os principais componentes encontrados nas folhas de hortelã-pimenta estão os ácidos graxos, tais como linoleico, linolénico e ácido palmítico, compostos voláteis, principalmente mentol, mentona e isomenthona, sendo o mentol reconhecido pelo seu poder antimicrobiano (FIGUEROA PÉREZ et al., 2014; SANDASI et al., 2011). A hortelã apresenta também em sua composição muitos compostos com propriedades antioxidantes tais como ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido coumárico, ácido rosmarínico e ácido sinápico), flavonóides (flavol-3-ol: galato de galocatequina; flavonóis: rutina e quercetina; flavanonas: hesperidina) (CHOUDHURY; KUMAR; GARG, 2006).

Figura 8 – Hortelã (*Mentha piperita* L.)

Fonte: Própria autoria

4 Material e métodos

4.1 Material

Produziu-se extratos a partir de diferentes partes da amoreira-preta (*Morus nigra* L.), carqueja (*Baccharis trimera* Less.), hortelã (*Mentha piperita*), pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) e guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) (Tabela 1). As sementes de guaraná, as folhas de amoreira preta, a carqueja e a hortelã foram obtidas da empresa Flores e Ervas (Florien LTDA/Piracicaba/ São Paulo), enquanto as folhas de pitangueira foram obtidas de plantas da região de Pirassununga/SP. A origem e a metodologia de produção das plantas obtidas pela empresa Florien são desconhecidas.

Tabela 1 - Descrição das amostras vegetais utilizadas

Amostra vegetal	Partes utilizadas para a produção do extrato
Pitangueira	Folhas
Amoreira preta	Folhas e talos
Carqueja	Caules alados, dessecados e fragmentados
Hortelã	Partes aéreas
Guaraná	Grãos

Fonte: Própria autoria

Para a produção dos filmes utilizou-se a gelatina de pele suína, do Tipo A, adquirida da indústria Gelita do Brasil Ltda (São Paulo, Brasil) e glicerol, como plastificante (Synth). Para o acondicionamento dos filmes, foi utilizada solução saturada de brometo de sódio (Synth).

A análise de atividade antioxidante foi realizada utilizando os seguintes reagentes: reagente de Folin-Ciocalteu (Merck), carbonato de sódio (Merck), ácido gálico (Sigma Aldrich), 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) (Sigma Aldrich), 2,2'-azinobis (3-

etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) (Sigma Aldrich), persulfato de potássio (Merck), etanol anidro (Dinâmica) e trolox (Sigma Aldrich).

Os padrões utilizados na análise de cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC/DAD/MS) foram catequina, quercetina e ácido cafeíco (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e o eriodictiol e a luteolina (Extrasynthèse, Genay, France).

4.2 Preparo das amostras vegetais

As folhas de pitangueira foram secas em estufa de secagem com circulação forçada a 30 °C por 72 h. A carqueja, a hortelã, o guaraná e as folhas de amoreira preta foram obtidas na forma seca. As plantas secas e as sementes foram trituradas em um liquidificador doméstico e peneiradas (48 mesh) para a uniformização das partículas (Figura 9). Em seguida as amostras foram armazenadas sob refrigeração e em ausência de luz.

Figura 9 - Amostras vegetais moídas

Fonte: Própria autoria

4.3 Composição proximal das amostras vegetais

Para determinação da composição proximal das amostras vegetais, foram determinados os teores de matéria seca, matéria mineral, proteína e extrato etéreo. Estas análises foram realizados segundo Silva e Queiroz (2006) e Vargas et al. (2016).

A determinação de matéria seca foi realizada por método gravimétrico em estufa a 105 °C por 12 h. O mesmo material destas análises foi incinerado em mufla a 550 °C por 24 h para a determinação da matéria mineral.

A determinação do extrato etéreo foi realizada com o uso de Soxhlet e éter de petróleo para extração. A determinação de proteína foi feita pelo método de Kjeldahl, utilizando-se o fator de 6,25 para conversão de nitrogênio total em proteína bruta.

4.4 Preparo dos extratos

Os extratos vegetais foram produzidos com 1 g de planta seca em 10 mL de solvente (água). A extração foi feita em banho termostático (MA 184 Marconi), na ausência de luz, nas temperaturas de 30, 45 e 60 °C com o uso de agitador mecânico (TE039 Tecnal) a 100 rpm, por 30 minutos. Os extratos foram filtrados em papel filtro (Whatman, nº 1) e, em seguida, foram armazenados em ambiente refrigerado ao abrigo da luz, por no máximo 48 h até a realização das análises (Figura 10).

Figura 10 - Produção dos extratos vegetais

(A) Extração sob agitação constante em banho termostático (B) filtração dos extratos.

Fonte: Própria autoria

4.5 Análises dos extratos

Os extratos produzidos nas três temperaturas foram caracterizados com relação ao seu teor de sólidos solúveis, cor instrumental, pH, rendimento, matéria seca, atividade antioxidante (Capacidade redutora, DPPH e ABTS) e UHPLC, cujas metodologias estão apresentadas mais abaixo. Os resultados determinaram a condição de extração utilizada na produção dos filmes à base de gelatina.

4.5.1 Determinação do teor de sólidos solúveis totais e matéria seca dos extratos

O teor de sólidos solúveis totais (°Brix) foi determinado utilizando-se um refratômetro Abbe. A leitura das amostras foi realizada a 20°C.

A matéria-seca dos extratos foi determinada gravimetricamente, por desidratação de amostras (≈ 2 g) a 105 °C por 24 h, utilizando-se estufa (modelo 315 SE, Fanem), em triplicatas (GONTARD et al., 1994). A matéria-seca foi calculada com a equação 1.

$$\text{Matéria – seca(\%)} = \left(\frac{m_f}{m_i} \right) \times 100 \quad 1$$

Onde: m_i : massa da amostra antes da secagem (g), m_f : massa da amostra seca (g)

4.5.2 Análise instrumental de cor dos extratos

As medições de cor foram realizadas em colorímetro Miniscan XE (HunterLab) operando com lâmpada D65 (daylight), ângulo de observação de 10°, e abertura da célula de medida de 60 mm. Os valores foram obtidos com o sistema CIELab que utiliza os padrões de cor: L^* (luminosidade), a^* (intensidade da cor vermelho-verde) e b^* (intensidade da cor

amarelo-azul). Amostras de 20 ml dos extratos foram colocadas em uma cubeta de quartzo para a determinação dos parâmetros de cor, em triplicata.

4.5.3 Análise do pH e rendimento dos extratos

O valor de pH do extrato foi determinado com um pHmetro de bancada (modelo PG 2000, Gehaka).

O rendimento dos extratos foi obtido medindo-se o volume final com auxílio de uma proveta de 50 ml. O cálculo foi realizado a partir do volume inicial de água adicionada com a seguinte equação 2:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{V_f \times 100}{V_i} \quad 2$$

Onde: V_f : volume final do extrato em mL, V_i : volume inicial de água em mL.

4.5.4 Análises de atividade antioxidante e capacidade redutora dos extratos

Considerando-se que existem diferentes mecanismos de ação dos compostos antioxidantes, que podem contribuir para a capacidade antioxidante, foram realizadas duas análises diferentes para os extratos vegetais, sendo estas, a de método da captura do radical DPPH (DPPH•) (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e do método da captura do radical ABTS (ABTS•+) [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]. Foi igualmente analisado a capacidade redutora dos extratos pelo método de Folin Ciocalteu.

4.5.4.1 Método da captura do radical DPPH (DPPH•)

O ensaio DPPH tornou-se bastante popular em estudos de antioxidantes naturais. Uma das razões é que este método é simples e altamente sensível (MOON; SHIBAMOTO, 2009). Este ensaio baseia-se na teoria de que um doador de hidrogênio é um antioxidante. Quando uma solução de radical DPPH é misturada com a de uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio, então o radical DPPH dá origem à forma reduzida (Figura 11). A cor passa de roxo para amarelo seguido pela formação de DPPH. Esta reação é estequiométrica em relação ao número de átomos de hidrogênio absorvidos. O efeito antioxidante é proporcional ao desaparecimento da radical DPPH nas amostras (MOLYNEUX, 2004; MOON; SHIBAMOTO, 2009).

Figura 11 Reação entre o radical DPPH e o antioxidante para formação do DPPH

Fonte: Adaptado de MOON, J-K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Easton: v. 57, p. 1655–1666, 2009.

A análise de atividade antioxidante pelo método da captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi realizada com o método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e Rufino et al. (2007b). Para essa análise, preparou-se solução de radical DPPH, dissolvendo-se 2,4 mg de DPPH em álcool etílico, completando o volume para 100 mL em um balão volumétrico, sendo a absorbância corrigida para $0,7 \pm 0,05$ nm a 517 nm em espectrofotômetro UV/Visível (Lambda 35, Perkin Elmer), com a utilização de etanol 99 % para a diluição.

Para as análises dos extratos vegetais, foram feitas 10 diluições dos extratos em etanol 99 %. Em seguida, em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH (preparado anteriormente) sendo que foi preparado, para cada diluição, uma solução controle (0,1 mL da diluição + 3,9 mL de etanol), sendo todas as soluções homogeneizadas em agitador de tubos.

A leitura das absorbâncias, realizada ao tempo de estabilização de cada amostra, (determinado em estudo prévio) foi feita em espectrofotômetro UV/Visível (Lambda 35, Perkin Elmer) a 517 nm. O resultado foi obtido utilizando o cálculo do EC 50, que leva em consideração a quantidade de substância antioxidante necessária para a redução da absorbância do radical DPPH em 50%. O resultado é dado em mg/mL.

4.5.4.2 Método da captura do radical ABTS (ABTS^{•+})

Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}), que pode ser gerado por uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Para a determinação da atividade antioxidante é gerado um radical colorido sintético, através da reação com persulfato de potássio (Figura 12), sendo que a capacidade de uma amostra biológica para capturar o radical é monitorada por espectrofotômetro, medindo a redução do radical como a percentagem de inibição da absorbância a 734 nm (FLOEGEL et al., 2011; MOON; SHIBAMOTO, 2009; RUFINO et al., 2007a).

Figura 12: Formação do radical ABTS a partir da reação de ABTS com persulfato de potássio

Fonte; Adaptado de MOON, J-K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Easton: v. 57, p. 1655–1666, 2009.

O método da captura do radical ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foi realizado segundo a metodologia descrita por Re et al. (1999) e Rufino et al. (2007a). Amostras dos extratos vegetais foram diluídas em etanol 99% (10 e 30 µL/mL). Neste método foi necessária a preparação prévia do radical pela reação de uma solução do reagente ABTS em água destilada (7 mM) e uma solução de persulfato de potássio a 140 mM. Essa solução (440 µL de persulfato de potássio + 25 mL ABTS) reagiu no escuro em temperatura ambiente por no mínimo 16 h. Após esse período de tempo, a absorbância da solução do radical foi corrigida para $0,7 \pm 0,05$ nm em espectrofotômetro UV/Visível (Lambda 35, Perkin Elmer) a 734 nm, com a utilização de etanol 99 % para a diluição.

Alíquotas de 30 µL de cada diluição dos extratos foram adicionadas em 3 mL de solução do radical ABTS e a leitura das absorbâncias foi feita no tempo necessário para a estabilização desse radical (6 min). O branco foi obtido acrescentando alíquotas de 30 µL em etanol 99%. A porcentagem de inibição do radical ABTS foi calculada com a equação 3

$$\% \text{ Inibição da ABS} = \left[\frac{\text{ABS}_{\text{inicial}} - \text{ABS}_{\text{final}}}{\text{ABS}_{\text{inicial}}} \right] \times 100 \quad 3$$

Onde: $\text{ABS}_{\text{inicial}}$: ABS sem amostra, $\text{ABS}_{\text{final}}$: ABS contendo a amostra após tempo de estabilidade do consumo de radical pelo antioxidante

Foi feita uma curva de calibração com o antioxidante sintético TROLOX e etanol 99% em 10 diluições que variaram de 25 a 2500 $\mu\text{mol/L}$ para o cálculo dos resultados, que foram expressos em TROLOX equivalente (mg de Trolox/g de matéria seca) (RE et al., 1999; RUFINO et al., 2007a).

4.5.4.3 Capacidade redutora dos extratos

O conteúdo fenólico total (TPC) é outro parâmetro importante relacionado com a capacidade antioxidante total (TAC) e é amplamente utilizado para a avaliação de extratos antioxidantes, incluindo extratos de ervas, especiarias e frutas, cereais e leguminosas, entre outros (SHAHIDI; ZHONG, 2015). A quantificação de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de métodos; todavia, o método utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu é o mais extensamente empregado. O ensaio Folin-Ciocalteu tem como vantagens, a sua simplicidade, reprodutibilidade e robustez. Ele, no entanto, sofre de várias desvantagens sendo um teste sensível ao pH, à temperatura e ao tempo de reação. A superestimação do conteúdo fenólico total é uma preocupação importante nas análises de Folin-Ciocalteu, devido à contribuição de agentes redutores não fenólicos presentes no sistema para a redução do reagente de Folin-Ciocalteu (SHAHIDI; ZHONG, 2015; OLIVEIRA et al., 2009).

Este método consiste de mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstico, na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI) (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$, e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras que, não necessariamente, precisam ter natureza fenólica (OLIVEIRA et al., 2009). Assim, o ensaio de Folin-Ciocalteu é como um ensaio baseado no poder redutor dos antioxidantes fenólicos, sendo assim, e pelo erro inerente deste método em quantificar o conteúdo fenólico, optou-se em denomina-lo em capacidade redutora total.

A determinação da capacidade redutora dos extratos vegetais foi realizada com o método descrito por Singleton e Rossi Jr (1965) com o uso do reagente de Folin-Ciocalteu.

Os extratos foram previamente diluídos em água destilada em duas concentrações (5 e 10 $\mu\text{L/mL}$). Para a preparação dos reagentes, 250 μL de amostra diluída ou do padrão foram colocados em um tubo de ensaio, em seguida foram adicionados 2 mL de água destilada e 250 μL do reagente de Folin-Ciocalteu. O tubo foi agitado, e após 3 minutos foram adicionados 250 μL de carbonato de sódio (Na_2CO_3). Os tubos foram colocados em um banho termostático (MA 184 Marconi) a 37 °C por 30 minutos. Decorrido esse tempo foi realizada a leitura em um espectrofotômetro UV/Visível (Lambda 35, Perkin Elmer) à 750 nm. O cálculo foi realizado a partir da curva padrão, elaborada com soluções de ácido gálico em concentrações que variam de 0 a 0,080 mg de ácido gálico/mL de água destilada.

4.5.5 Cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC)

Para a análise de UHPLC-DAD-MS, a extração foi realizada de maneira levemente modificada para prevenir as contaminações das colunas. Amostras secas e moídas (2 g) foram adicionadas a 20 mL de água ultrapura (System Simplicity 185, Millipore) em um becker coberto com papel alumínio e, em seguida, extraídos sobre agitação magnética a 30, 45 e 60 °C durante 30 min, utilizando-se um banho maria sob um prato termostático (IKA). Os extratos aquosos foram colocados em tubos eppendorf (Figura 13) e centrifugados a 1000 g por 10 min em temperatura ambiente com centrífuga Heraeus Biofuge fresco D 37520. Os sobrenadantes foram filtrados com um filtro de nylon 0,2 μm (VWR).

Figura 13 - Preparação dos extratos para a análise de UHPLC-DAD-MS

Fonte: Própria autoria

A análise dos compostos fenólicos foi realizada com o emprego de um Cromatógrafo líquido de ultra performance acoplado com um detector diode array UV-visível e um espectrômetro de massa (UHPLC-DAD-MS). O sistema utilizado (Waters® Acquity UPLC® H-Class) consistiu de uma bomba binária Quaternário Solvent Manager, um detector de UV –VIS Acquity e um espectrômetro de massa HR Xevo G2- S Tof. A fase estacionária de Acquity UPLC® foi um BEH C18 (comprimento 10 mm, diâmetro interno de 2,1 milímetros de tamanho de partícula 1.7µm) termostatizada a 30 °C e equipado com uma pré-coluna (5 x 2,1 mm) da mesma qualidade Acquity Vaanguard.

A eluição foi realizada com o auxílio de duas fases moveis A (água contendo 0,1% de ácido fórmico) e B (acetonitrila contendo 0,1% v/v de ácido fórmico). O gradiente de eluição foi: 90 % A a 0 min, 80 % A a 6.70 min, 25 % A a 7.51 min, 25 % A a 15.66 min, 0 % A a 15.81 min, 0% A a 17.50 min, 90 % A a 18 min e 90 % A a 20 min. A taxa de fluxo foi de 0,490 mL / min e o volume injetado de 0,5 ul.

As medidas de absorbância foram feitas entre 190 e 500 nm utilizando-se um detector DAD. As condições de ionização utilizadas no espectro de massa foram: voltagem capilar 0,5 kV, voltagem de cone 40, fonte offset 80 V, temperatura da fonte 130 °C, temperatura do gás de solvatação 550°C, taxa de cone do gás de solvatação 50 L/h e taxa de solvatação da amostra 1200 L/h. Utilizando-se ES no modo negativo e MSE com amplitude m/z de 50 a 1200 com taxa de 0,2 s/scan. A energia de colisão usada foi respectivamente para a baixa energia de função e rampa de alta energia, cerca de 6 eV e 15 eV a 45. A análise espectros de massa foi feita com MassLynx® MSe e analisador de dado.

A amostra foi analisada em cromatógrafo em três intervalos distintos, sendo estes, imediatamente (TO), após de 16 h e 72 h depois de estocada em 4°C, para análise de sua estabilidade. Para a identificação dos compostos, utilizou-se os extratos produzidos a 60 °C e com 16 h de estocagem.

A quantificação foi realizada pela metodologia de padrão externo, sendo feito uma estimativa da evolução do perfil fenólico baseado nas diferentes temperaturas de extração. Os extratos foram preparados em triplicata nas temperaturas de 30, 45 e 60 °C e em seguida injetados no UHPLC-DAD-MS (modo negativo). As curvas de calibração foram estabelecidas com 5 componentes representantes de cada família identificada no extrato de hortelã, sendo, ácido cafeíco para ácidos fenólicos, catequina para flavon-3-ols, eriodictiol para flavanones, luteolina para flavonas e quercetina para flavonols. Cada padrão foi preparado com metanol (ácido cafeíco com 0,537 mg/mL, luteolina com 0,519 mg/mL,

eriodictiol com 0,455 mg/mL, quercetina com 0,475 mg/mL e catequina com 0,483 mg/mL) e as curvas de calibração foram diluídas em fatores de 10 a 10000.

Para a análise de quantificação de ácidos fenólicos e flavonóides na planta, foram obtidos os extratos nas 3 temperaturas supracitadas, entretanto apenas o tempo de estocagem de 16 h foi analisado. Cada extrato foi preparado três vezes para repetibilidade das amostras.

4.6 Produção dos filmes

Os filmes foram produzidos com a técnica de casting, com 8 g de gelatina/100g de solução, segundo Sobral et al. (2001) e Valencia et al. (2016). Para o preparo da solução filmogênica, elaborada com gelatina, inicialmente a proteína foi hidratada durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi solubilizada em banho termostático (MA 184 Marconi) a 70 °C por 30 minutos. Então, foram adicionados os extratos das plantas, sob agitação magnética (TE 085 Tecnal) por 5 minutos. A quantidade adicionada estudada foi 0; 50 e 150 g de extrato/100 g de gelatina, visando a obtenção das melhores propriedades antioxidantes. E em seguida, o plastificante (glicerol: 30 g de glicerol/100 g de gelatina) foi adicionado e a solução mantida em agitação por mais 1 minuto para homogeneização.

As soluções filmogênicas foram aplicadas em placas de petri (150 x 15 mm) (Bioplax) com a mesma quantidade de massa (16 g) para garantir uma espessura constante. Estas soluções foram desidratadas em estufa com circulação e renovação de ar (Marconi, MA037) a 30 °C e umidade relativa controlada (55-65%), por 16 horas (SOBRAL et al., 2001).

4.7 Caracterização dos filmes

Os filmes foram submetidos às seguintes caracterizações: espessura, propriedades mecânicas (tração e perfuração), cor, opacidade, brilho, umidade, solubilidade,

permeabilidade ao vapor de água, microestrutura (por microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura), propriedades térmicas (DSC), determinação da capacidade antioxidante e estrutura química com uso de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e propriedades térmicas.

Antes das caracterizações, os filmes foram acondicionados em dessecadores contendo soluções saturada de NaBr (58 % umidade relativa, RH) a 25 °C por 7 dias. Para as análises de microscopia de força atômica, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e calorimetria diferencial de varredura, os filmes foram acondicionados em dessecadores contendo sílica gel, por pelo menos 7 dias.

4.7.1 Espessura dos filmes

A espessura dos filmes foi determinada utilizando-se um micrometro digital (0,001 mm, MITUTOYO) com escala de 0-25 mm e probe de 6,4 mm de diâmetro. Foram realizadas dez medidas aleatoriamente ao longo de cada amostra, sendo a espessura obtida pelas médias destas (THOMAZINE; CARVALHO; SOBRAL, 2005).

4.7.2 Cor e opacidade dos filmes

A cor dos filmes foi medida utilizando-se os padrões CIELab: L^* (luminosidade), variando de 0 (preto) a 100 (branco); a^* , do verde (-) ao vermelho (+); e b^* , do azul (-) ao amarelo (+) (ASTM D2244 – 11, 2011), determinados com um colorímetro Miniscan XE (HunterLab, modelo Miniscan EZ) trabalhando com D_{65} e luz do dia. Os filmes foram colocados na superfície de uma placa branca padrão, e os padrões L^* , a^* e b^* foram medidos e transferidos em tempo real, para um microcomputador. A diferença total de cor (ΔE^*) foi calculada com a equação 4.

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad 4$$

Onde: $\Delta L^* = L^*_{amostra} - L^*_{padr\tilde{a}o}$ ($92,58 \pm 0,92$); $\Delta a^* = a^*_{amostra} - a^*_{padr\tilde{a}o}$ ($-0,88 \pm 0,06$); $\Delta b^* = b^*_{amostra} - b^*_{padr\tilde{a}o}$ ($1,26 \pm 0,02$).

A opacidade foi determinada utilizando-se o mesmo aparelho e programa de computador, usados nas medidas de cor. Os filmes foram colocados sobre o padrão branco e sobre o padrão preto para medida, sempre em triplicata. O cálculo da opacidade (entre 0 e 100%), foi realizado automaticamente no microcomputador, pelo programa Universal software 3.2 (Hunter Associates Laboratory, 1997) (SOBRAL, 2000), utilizando a equação 5.

$$Y = \frac{Y_p}{Y_b} \quad 5$$

Onde: Y_p : opacidade com padrão preto e Y_b , com padrão branco.

4.7.3 Brilho dos filmes

O brilho dos filmes foi determinado com o emprego de um glossímetro Novo Gloss Lite, Rhopoint NGL 20/60, no ângulo de 60° (VILLALOBOS et al., 2005). Foram realizadas 10 medidas aleatórias pela placa de filme e os resultados foram obtidos no lado do filme em contato com ar. Foram realizadas triplicatas para cada formulação.

4.7.4 Umidade e Solubilidade em Água dos filmes

Para a análise de umidade, sempre em triplicata, as amostras foram cortadas, para cada replicata, em três discos de 2 cm de diâmetro, sendo em seguida colocadas em pesa filtros e levadas a estufa a 105°C por 24 h (GONTARD et al., 1994). A umidade foi calculada com a equação 6.

$$\text{Umidade(\%)} = \left(1 - \frac{m_f}{m_i}\right) \times 100 \quad 6$$

Onde: m_i : massa da amostra antes da secagem (g), m_f : massa da amostra seca (g)

A solubilidade foi determinada seguindo a metodologia descrita por Gontard et al (1994). A amostra foi cortada para cada replicata em 3 discos de 2 cm de diâmetros e pesadas, antes da imersão em 50 mL de água destilada, onde foram mantidas por 24 h sob agitação mecânica (Mesa Agitadora Marconi-MA141), a 25°C. Após este período o material foi filtrado e pesado e, em seguida, desidratado em estufa a 105 °C por 24 h para determinação do peso da matéria seca não dispersa em água, em triplicata. Considerando que a massa seca da amostra era conhecida, a solubilidade foi calculada segundo a equação 7.

$$\text{Solubilidade (\%)} = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i}\right) \times 100 \quad 7$$

Onde: m_i : massa da amostra inicial (g), m_f : massa da amostra seca, após dispersão durante 24 h de imersão em água (g).

4.7.5 Permeabilidade ao Vapor de Água

A permeabilidade ao vapor de água foi determinada gravimetricamente de acordo com o método ASTM E96/E96M (ASTM, 2010b). A amostra foi fixada na célula de alumínio contendo sílica gel (0% UR), com área exposta de 31,17 cm². Estas células foram colocadas em dessecador com água destilada (100% de umidade relativa) e mantidas a temperaturas controladas (25 ± 0,2 °C).

O vapor de água transferido pelo filme e absorvido pela sílica foi determinado pelo ganho de massa do sistema, composto pela célula, o filme e a sílica, realizando-se pesagens as 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Foram realizadas triplicatas para cada formulação.

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) do filme foi calculada com a equação 8.

$$PVA = \frac{W \times e}{A \times t \times P_0 \times (UR_1 - UR_2)} \quad 8$$

Onde: W/t: coeficiente angular calculado por regressão linear entre o ganho de peso do sistema (g) versus tempo t (horas); e: espessura do filme (mm); A: área exposta do filme (cm²); (UR1-UR2): diferença entre a umidade relativa (%), Po: Pressão de vapor da água (Pa) na temperatura do teste.

4.7.6 Propriedades mecânicas dos filmes

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas por de testes de tração (tensão na ruptura, alongação na ruptura e módulo de elasticidade) e de perfuração (força e deformação na perfuração) utilizando-se um texturômetro TA.XT Plus (TA Instruments) (SOBRAL et al., 2001). Os dados foram analisados com o auxílio do programa Exponent Lite Express (v. 4.013.0 XT express).

4.7.6.1 Propriedades mecânicas dos filmes por testes de tração

Para a determinação das propriedades mecânicas por teste de tração, os filmes foram cortados em tiras de 15 mm de largura e 90 mm de comprimento, que foram fixas em garras com uma distância inicial (lo) de 50 mm, e separadas com velocidade de 1,0 mm/s, para a realização do teste. Para essas análises, pelo menos 10 replicatas de cada filme foram utilizadas, sendo feitas triplicatas para cada formulação (ASTM D882 – 10, 2010a).

A tensão na ruptura (MPa) foi calculada como a tensão máxima que o filme pode suportar antes de se romper. Esta foi calculada dividindo-se a máxima carga suportada pelo filme pela sua área de seção transversal. A alongação na ruptura (%) foi calculada como a porcentagem de alteração no comprimento original do filme. O módulo elástico (ME, em MPa/%) foi obtido a partir do cálculo da inclinação da porção linear da curva tensão versus deformação (BILBAO-SÁINZ et al., 2010).

4.7.6.2 Propriedades mecânicas dos filmes por testes de perfuração

Para o teste de perfuração, os filmes foram cortados em círculos e fixados em células com 46 mm de diâmetro de abertura e perfurados com sonda de 3 mm de diâmetro, movendo-se a uma velocidade de 1 mm/s, sendo medidos a força máxima (N) e o descolamento da sonda na perfuração. A deformação na perfuração (%) foi, então, calculada a partir da distância percorrida pela sonda, com a equação 9.

$$\text{Deformação}(\%) = \left[\frac{\sqrt{(d^2 + l_0^2)} - l_0}{l_0} \right] \times 100 \quad 9$$

Onde: Onde: d é a distância percorrida pela sonda (mm), l_0 é o comprimento inicial do filme, correspondendo ao raio da célula porta amostra (mm).

4.7.7 Microestrutura dos filmes

A estrutura interna (em amostras criofraturadas) e da superfície dos filmes (em contato com o ar e com a placa) foram analisadas empregando-se um microscópio de varredura eletrônica Hitachi TM3000 (Tokyo, Japão) operando com feixe a 5 kV, de acordo com Carvalho e Grosso (2004).

Análises da microscopia de força atômica foram realizadas utilizando um microscópio de força atômica (modelo NT-MDT Solver-Rússia), equipado com um software para análise de imagens (New Model PX 3.1.0). Os filmes foram cortados em áreas de 2 x 2 cm para utilização na AFM. O equipamento foi operado em modo semi-contato utilizando ponta NSG, a taxas de varredura de 0,3 Hz, força de contato de 5 N/m e com uma frequência de ressonância 150 kHz com resolução de 0,2 um/pixel.

As análises foram realizadas em áreas de 50 μm $\times$ 50 μm , utilizando 3 espécimes diferentes. A rugosidade média (R_a) e a rugosidade média quadrática (R_q) foram calculadas utilizando o software de Image Analyses 3.2.5 e as imagens foram obtidas através de subtrações de 3 ordem

4.7.8 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Essas análises foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro Perkin Elmer (Spectrum One) munido de acessório UATR, de acordo com Vicentini et al. (2005). Foram realizadas varreduras na faixa espectral de 650 a 4000 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} e 20 varreduras. Os dados foram coletados e tratados com o software Spectrum One (Spectrum One, versão 5.3).

4.7.9 Propriedades de barreira à luz visível dos filmes

As propriedades de barreira à luz visível e ultravioleta dos filmes à base de gelatina foram determinadas utilizando-se um espectrofotômetro UV/Visível (Lambda 35, Perkin Elmer) com comprimento de onda variando de 200 a 800nm. Foi obtida a transmitância dos filmes como resposta. Para a análise os filmes foram cortados em tiras de 10 cm de comprimento e 1,0 cm de largura e colocados no lugar da cubeta de forma que o feixe de luz passasse através do filme, o local da cubeta do branco foi mantido vazio. Estas análises foram realizadas em triplicata (BITENCOURT et al., 2014; FANG et al., 2002).

4.7.10 Propriedades térmicas dos filmes

As amostras foram analisadas por calorimetria diferencial de varredura, utilizando-se um DSC TA 2010 controlado por um módulo TA 5000 (TA Instruments, USA) com um acessório para resfriamento criogênico (SOBRAL et al., 2001). As amostras foram pesadas (~10 mg) em balança de precisão ($\pm 0,0001$ g) (Scientech, SA210) e colocadas em panelinhas herméticas. O sistema foi aquecido com taxa de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, entre -150 e 150 $^{\circ}\text{C}$, em atmosfera inerte (45 mL/min de N_2). Como referência, foi utilizada uma panelinha vazia.

A temperatura de transição vítrea (T_g) foi calculada como o ponto médio de inflexão da linha de base, causada pela descontinuidade do calor específico da amostra. A temperatura de fusão (T_m) foi calculada onde ocorreu o pico endotérmico. A entalpia (ΔH_m) da transição sol-gel foi determinada pela área do pico endotérmico. As propriedades foram calculadas com auxílio do software Universal Analysis V1.7F (TA Instruments). Essas análises foram realizadas em triplicata (SOBRAL et al., 2001).

4.7.11 Análises de atividade antioxidante e capacidade redutora dos extratos

Os filmes foram submetidos a análises para determinação da capacidade antioxidante total com os métodos da captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), o de captura do radical ABTS 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). Foi obtido a capacidade redutora dos filmes pelo método de Folin Ciocalteu. Para a realização estas análises os filmes foram solubilizados ($\approx 0,1$ mg) em água destilada em banho maria por 10 min à 55°C.

4.7.11.1 Método da captura do radical DPPH (DPPH•)

A atividade antioxidante dos filmes foi determinada pelo método do radical DPPH de acordo com a metodologia proposta por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com modificações. Inicialmente foi preparada uma solução de radical DPPH similar ao item 4.5.2.1. Em seguida, 0,5 mL do filme solubilizado foram adicionados a 2,5 mL da solução de radical DPPH e a solução foi mantida na ausência de luz por um período de 1 h. Após esse período, determinou-se a absorbância a 517 nm. A atividade antioxidante foi calculada seguindo a seguinte equação 3.

Foi feita uma curva de calibração com o antioxidante sintético TROLOX e etanol em 10 diluições que variaram de 25 a 2500 $\mu\text{mol/L}$ para a interpretação dos resultados, que foram

expressos em TROLOX equivalente (g de Trolox/g de filme) (RE et al., 1999; RUFINO et al., 2007a).

4.7.11.2 Método de captura do radical ABTS (ABTS•+)

Para a avaliação da atividade antioxidante determinada pelo método de captura do radical ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), foi utilizada a metodologia descrita por Bitencourt et al. (2014).

Primeiramente, foi preparada uma solução de radical de ABTS similar ao do item, 4.5.2.2. Em seguida, uma amostra da solução solubilizada do filme (60 µL) foi adicionada à solução trabalho (2940 mL). Os tubos foram colocados em um banho termostático (MA 184 Marconi) a 37 °C por 30 minutos após este tempo, a amostra foi centrifugada (Thermoieci, Centrapp8r, EUA) à 3000 rpm por 5 min. A atividade antioxidante foi calculada seguindo a seguinte equação 3.

Foi feita uma curva de calibração com o antioxidante sintético TROLOX e etanol em 10 diluições que variaram de 25 a 2500 µmol/L para a interpretação dos resultados, que foram expressos em TROLOX equivalente (mg de Trolox/g de filme) (RE et al., 1999; RUFINO et al., 2007a).

4.7.11.3 Capacidade redutora dos filmes

A determinação da capacidade redutora dos extratos vegetais foi realizada utilizando com o método descrito por SINGLETON; ROSSI JR (1965) com o uso do reagente de Folin-Ciocalteu e ácido gálico utilizado como padrão para a obtenção das curvas de calibração. A metodologia utilizada foi similar a do item 4.5.2.3

4.8 Análise estatística

As análises estatística foram realizadas utilizando-se o teste ANOVA 2-way, sendo as diferenças identificadas pelo de Tuckey ($p < 0,05$). As diferenças significativas foram identificadas com letras diferentes, com distinção de maiúsculo e minúsculo para cada fator. A relação entre o poder redutor e a atividade antioxidante dos extratos vegetais foi determinada pela correlação de Pearson. Todos os dados foram analisados com uso do programa estatístico "Statistical Analysis Systems" – SAS (OLIVEIRA et al., 2015).

5 Resultados e discussões

5.1 Caracterização das amostras vegetais

5.1.1 Composição proximal das amostras vegetais

As proteínas foram os componentes majoritários nas encontrados nas amostras, seguidos de cinzas e lipídios (Tabela 2). As amostras apresentaram teores de matéria seca que variam de 89,5 a 91,7 g/ 100 g de amostra seca, sendo que a folha de amoreira e a carqueja apresentaram os maiores valores ($p < 0,05$) e a folha de pitangueira demonstrou menor quantidade de água que os demais extratos vegetais. Para o conteúdo de matéria mineral, todas as amostras apresentaram valores estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$), sendo que a hortelã o apresentou maior valor (13,9 g/ 100 g de amostra seca), seguido da folha de amoreira (7,2 g/ 100 g de amostra seca), folha de pitangueira (6,7 g/ 100 g de amostra seca), carqueja (6,2 g/ 100 g de amostra seca) e semente de guaraná (1,7 g/ 100 g de amostra seca).

Tabela 2 - Composição proximal das amostras vegetais em base seca

Amostras	MS	MM	PB	EE
Amoreira	91,7 $\pm$ 0,0 ^a	7,2 $\pm$ 0,0 ^b	12,8 $\pm$ 0,2 ^c	5,0 $\pm$ 0,5 ^a
Carqueja	91,4 $\pm$ 0,1 ^a	6,2 $\pm$ 0,0 ^d	9,5 $\pm$ 0,2 ^d	0,9 $\pm$ 0,4 ^c
Guaraná	90,9 $\pm$ 0,1 ^b	1,7 $\pm$ 0,0 ^e	17,2 $\pm$ 0,2 ^b	2,7 $\pm$ 0,0 ^b
Hortelã	90,6 $\pm$ 0,0 ^b	13,9 $\pm$ 0,1 ^a	21,8 $\pm$ 0,4 ^a	2,6 $\pm$ 0,4 ^{b,c}
Pitangueira	89,5 $\pm$ 0,0 ^c	6,7 $\pm$ 0,0 ^c	16,4 $\pm$ 0,1 ^b	2,3 $\pm$ 0,6 ^{b,c}

Resultados expressos na matéria seca a 105°C em g/100 g de amostra seca. Onde: MS (matéria seca); MM (matéria mineral); PB (proteína bruta); EE (extrato etéreo). a-e letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os pós de amostras vegetais. Dados expressos em (média $\pm$ desvio padrão). Fonte: Própria autoria.

Os teores de proteínas brutas variaram entre 21,8 e 9,5 g/ 100 g de amostra seca (Tabela 2), sendo os maiores valores encontrados no extrato de hortelã e os menores na carqueja. As

amostras de semente de guaraná e de folha de pitangueira apresentaram teores de proteínas estaticamente ($p > 0,05$) iguais. Os teores de extrato etéreo apresentaram valores entre 5,0 g/100 g de amostra seca para a folha de amoreira e 0,9 g/100 g de amostra seca para a carqueja.

A semente de guaraná apresentou valores de composição proximal próximos de estudos anteriores com guaraná em pó. Martins (2010), estudando guaraná em pó, encontrou teores 95,75 g/100 g de amostra para o conteúdo de matéria seca, 12,84 g/100 g de amostra para o conteúdo de proteína, 1,65 g/100 g de amostra para o teor de cinzas e 2,85 g/100 g de amostra para o teor de lipídios. Estudando a composição proximal de produtos da Amazônia, Aguiar (2016) encontrou valores para o guaraná em pó de 91,83 g/100 g de amostra, 16,46 g/100 g de amostra, 1,03 g/100 g de amostra e 2,76 g/100 g de amostra para teores de matéria seca, proteínas, cinzas e lipídios, respectivamente. Abdel-Wareth e Lohakare (2014) estudando a hortelã encontrou teores de 94,2 g/100 g, 16,2 g/100 g, 14,9 g/100 g de amostra e para teores de matéria seca, proteínas e cinzas respectivamente.

A composição proximal da folha de pitangueira apresentou resultados semelhantes ao encontrado no estudo de Vargas et al. (2016) que produziu extratos de folha de pitangueira com temperatura de secagem a 65 °C e obtiveram valores médios de matéria seca 92,6 g/100 g de amostra, 8,9 g/100 g de amostra para matéria mineral, 12,5 g/g de amostra para proteína e 4,2 g/g de amostra para teores de lipídio.

Em estudo com diferentes espécimes de folhas de amoreira foi obtido para a espécie *Morus nigra*, similar a utilizada nesta tese, Iqbal et al., (2012) encontraram valores médios de 93,3 g/100 g de amostra para teores de matéria seca, 9,2 g/100 g de amostra para teores de cinza, 5,13 g/100 g de amostra para os teores de lipídios e 19,76 g/100 g de amostra para os teores de proteína. Estes valores estão próximos aos obtidos nesta tese.

5.2 Caracterização dos extratos

5.2.1 Determinação de sólidos solúveis e matéria-seca dos extratos.

Os maiores valores de sólidos solúveis ($p < 0,05$) foram observados nos extratos de folha de pitangueira (Tabela 3), seguidos do extrato de hortelã, para todas as temperaturas de extração. Entretanto para os extratos obtidos a 60 °C notou-se que existe menor variação entre

os teores de sólidos solúveis dos extratos de hortelã, guaraná, carqueja e folha de amoreira, não havendo diferença entre os teores de sólidos solúveis destes extratos ($p > 0,05$).

Tabela 3 - Sólidos solúveis dos extratos vegetais.

Extratos	°Brix		
	T30	T45	T60
Amoreira	$2,1 \pm 0,2^{C,b}$	$2,6 \pm 0,1^{C,a}$	$2,5 \pm 0,0^{B,a}$
Carqueja	$2,1 \pm 0,3^{C,b}$	$2,0 \pm 0,0^{D,b}$	$2,7 \pm 0,0^{B,a}$
Guaraná	$2,0 \pm 0,3^{C,b}$	$2,0 \pm 0,00^{D,b}$	$3,0 \pm 0,2^{B,a}$
Hortelã	$3,0 \pm 0,0^{B,b}$	$2,9 \pm 0,2^{B,b}$	$3,7 \pm 0,5^{A,B,a}$
Pitangueira	$4,2 \pm 0,3^{A,a}$	$4,2 \pm 0,0^{A,a}$	$4,7 \pm 1,0^{A,a}$

Onde: T 30: temperatura de extração a 30 °C; T 45: temperatura de extração a 45 °C; T 60: temperatura de extração a 60 °C; A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos para a mesma temperatura de extração. a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes temperaturas no mesmo extrato. Dados expressos em (média $\pm$ desvio padrão). Fonte: Própria autoria.

Quando avaliado o efeito da temperatura de extração para cada extrato, constatou-se que os extratos produzidos a 60 °C, em geral, apresentaram maiores teores de sólidos solúveis ($p < 0,05$), exceto para o extrato de folha de amoreira, onde não se observou diferença significativa entre os teores dos extratos produzidos a 45 e 60 °C. O teor de sólidos solúveis do extrato de folha de pitangueira não sofreu efeito da temperatura de extração ($p > 0,05$) (Tabela 5).

Vargas et al. (2016), estudando os sólidos solúveis de extratos aquosos de guaraná e folha de pitangueira, produzidos a extraídos a 90 °C sob agitação mecânica, durante 30 min, obtiveram valores de 2,0 e 3,6 °Brix para os teores de sólidos solúveis do extrato de guaraná e da folha de pitangueira, respectivamente, valores próximos aos obtidos nesta tese.

Em todos os extratos, os valores de matéria seca foram inferiores aos de sólidos solúveis, indicando que alguns componentes dos extratos podem ter sido destruídos no processo de secagem, por serem termosensíveis (Tabela 4). Assim como para os teores de sólidos solúveis, os maiores ($p < 0,05$) valores de matéria seca foram obtidos em extrações que utilizaram maiores temperaturas, exceto para o extrato de folha de pitangueira, que não apresentou

diferenças entre os teores de matéria seca dos extratos obtidos nas temperaturas estudadas, corroborando com o teor de sólidos solúveis.

Em todas as temperaturas estudadas, o extrato de folha de pitangueira apresentou os maiores valores de matéria seca ($p < 0,05$), resultado em concordância com resultados obtidos pelo teor de sólidos solúveis.

Tabela 4 - Teor de matéria seca dos extratos vegetais

Extratos	Teor de matéria seca g de matéria seca/100 g de extrato		
	T30	T45	T60
Amoreira	$1,6 \pm 0,1$ ^{C,b}	$1,9 \pm 0,1$ ^{C,a}	$2,1 \pm 0,1$ ^{C,a}
Carqueja	$1,3 \pm 0,0$ ^{D,c}	$1,4 \pm 0,0$ ^{E,b}	$1,8 \pm 0,0$ ^{E,a}
Guaraná	$1,3 \pm 0,0$ ^{D,c}	$1,5 \pm 0,0$ ^{D,b}	$1,9 \pm 0,1$ ^{D,a}
Hortelã	$2,1 \pm 0,0$ ^{B,c}	$2,4 \pm 0,0$ ^{B,b}	$2,7 \pm 0,0$ ^{B,a}
Pitangueira	$2,6 \pm 0,1$ ^{A,b}	$3,0 \pm 0,0$ ^{A,a}	$3,1 \pm 0,0$ ^{A,a}

Onde: T 30: temperatura de extração a 30 °C; T 45: temperatura de extração a 45 °C; T 60: temperatura de extração a 60 °C; A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos para a mesma temperatura de extração. a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes temperaturas no mesmo extrato. Dados expressos em (média $\pm$ desvio padrão). Fonte: Própria autoria.

5.2.2 Análise instrumental de cor dos extratos

Os extratos apresentaram diferentes colorações, sendo que não houve alteração visível da coloração dos extratos produzidos em diferentes temperaturas. Na Figura 14 estão apresentados os extratos obtidos à 60 °C.

Figura 14 - Extratos vegetais extraídos a 60 °C

Onde: A: extrato de folha de amoreira, C: extrato de carqueja, H: extrato de hortelã, G: extrato de guaraná, P: extrato de folha de pitangueira. Fonte: Própria autoria.

Com relação aos parâmetros de cor L^* , a^* e b^* (Tabela 5), observou-se que, para os extratos produzidos a 30 e 45 °C, os extratos de folha de amoreira e hortelã apresentaram os menores valores de L^* ($p < 0,05$), o que indica uma tonalidade mais escura, que pode ser visualizada na Figura 14. O extrato de guaraná apresentou uma tonalidade mais clara, com os maiores valores de L^* .

A temperatura de extração não exerceu influência na luminosidade do extrato de carqueja ($p > 0,05$). Entretanto, para os demais, notou-se que os extratos produzidos a 45°C apresentaram menores valores ($p < 0,05$). Esta diferença apesar de ser estatisticamente significativa, pode ser considerada irrelevante, visto que a mudança na coloração é muito pequena.

Em relação ao parâmetro a^* , as diferentes temperaturas de extração não alteraram a coloração dos extratos de hortelã, carqueja e folha de amoreira preta ($p > 0,05$) (Tabela 5). Entretanto, para o extrato de folha de pitangueira notou-se que o parâmetro a^* foi ligeiramente maior nos extratos obtidos a 30 °C. Efeito inverso pode ser notado para o extrato de guaraná, onde os menores valores foram obtidos a 30 °C ($p < 0,05$).

De maneira geral, verificou-se uma tonalidade mais esverdeada (menores valores de a^*) para os extratos de folha de amoreira em relação às demais amostras vegetais, quando analisada na mesma temperatura de extração.

Quando avaliado o parâmetro b^* , que varia do amarelo ($+b^*$) e azul ($-b^*$), observou-se que os extratos apresentaram uma tendência mais amarelada, com valores positivos de b^* , sendo que o extrato de guaraná apresentou maior valor (Tabela 5). Para diferentes temperaturas, os resultados não tiveram grandes variações deste parâmetro.

Tabela 5 - Cor dos extratos vegetais

Extratos	L*			a*			b*		
	T30	T45	T60	T30	T45	T60	T30	T45	T60
Pitangueira	34,1 ± 2,6 ^{B,a}	28,7 ± 0,2 ^{B,b}	26,4 ± 1,15 ^{A,B,b}	17,3 ± 0,5 ^{B,a}	14,2 ± 0,6 ^{B,b}	14,7 ± 0,6 ^{A,b}	51,8 ± 5,0 ^{B,a}	37,7 ± 1,0 ^{B,b}	35,8 ± 0,5 ^{B,b}
Guaraná	48,4 ± 1,7 ^{A,a}	43,1 ± 1,6 ^{A,a,b}	38,9 ± 3,5 ^{A,b}	20,1 ± 1,5 ^{A,B,b}	24,1 ± 0,7 ^{A,a}	25,4 ± 0,7 ^{A,a}	72,6 ± 4,4 ^{A,a}	67,7 ± 2,0 ^{A,a}	62,3 ± 7,5 ^{A,a}
Hortelã	8,5 ± 2,6 ^{C,a}	5,6 ± 0,2 ^{C,b}	10,9 ± 0,4 ^{B,a}	24,6 ± 1,9 ^{A,a}	22,7 ± 0,3 ^{A,a}	25,4 ± 0,3 ^{A,a}	14,4 ± 3,3 ^{C,a,b}	9,7 ± 0,4 ^{C,b}	17,0 ± 0,8 ^{B,C,a}
Amoreira	3,5 ± 2,9 ^{C,a,b}	1,7 ± 0,8 ^{C,b}	11,2 ± 5,54 ^{B,a}	6,5 ± 5,3 ^{C,a}	5,2 ± 5,0 ^{C,a}	9,18 ± 14,6 ^{A,a}	5,0 ± 4,1 ^{C,a}	2,6 ± 1,5 ^{C,a}	8,8 ± 14,5 ^{B,a}
Carqueja	29,4 ± 2,4 ^{B,a}	26,0 ± 2,4 ^{B,a}	29,58 ± 13,0 ^{A,a}	23,8 ± 0,8 ^{A,B,a}	23,8 ± 2,1 ^{A,B,a}	23,9 ± 2,13 ^{A,a}	47,1 ± 3,9 ^{B,a}	36,7 ± 7,5 ^{B,a}	36,7 ± 14,0 ^{B,a}

Onde: T 30: temperatura de extração a 30 °C; T 45: temperatura de extração a 45 °C; T 60: temperatura de extração a 60 °C; A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos para a mesma temperatura de extração. a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes temperaturas no mesmo extrato. Dados expressos em (média ± desvio padrão). Fonte: Própria autoria.

5.2.3 Determinação do pH e rendimento dos extratos

Quanto ao rendimento dos extratos, encontrou-se valores entre 41,7 e 54,5 mL/100 mL, sendo que não se observou diferenças entre os resultados de rendimento dos extratos produzidos a 30 °C e 60 °C ($p > 0,05$) (Tabela 3). Entretanto, foi verificado nos extratos obtidos a 45 °C, que os extratos de folha de pitangueira, hortelã e semente de guaraná apresentaram os maiores rendimentos na extração ($p < 0,05$). Quando avaliado o efeito da temperatura de extração para o rendimento de cada amostras vegetais, notou-se que este não apresentou efeito sobre os resultados ($p > 0,05$).

Tabela 6 - Rendimento dos extratos vegetais.

Extratos	Rendimento mL/100 mL		
	T30	T45	T60
Amoreira	45,0 ± 6,6 ^{A,a}	41,7 ± 1,0 ^{B,a}	48,0 ± 7,0 ^{A,a}
Carqueja	46,7 ± 3,1 ^{A,a}	44,0 ± 4,0 ^{B,a}	47,3 ± 4,2 ^{A,a}
Guaraná	46,0 ± 5,3 ^{A,a}	54,5 ± 2,3 ^{A,a}	47,3 ± 3,1 ^{A,a}
Hortelã	51,3 ± 5,0 ^{A,a}	49,3 ± 4,2 ^{A,Ba}	49,3 ± 6,1 ^{A,a}
Pitangueira	49,3 ± 5,0 ^{A,a}	52,7 ± 3,1 ^{A,a}	45,3 ± 5,0 ^{A,a}

Fonte: Própria autoria. Onde: T 30: temperatura de extração a 30 °C; T 45: temperatura de extração a 45 °C; T 60: temperatura de extração a 60 °C; A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos para a mesma temperatura de extração para o mesmo parâmetro. a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes temperaturas no mesmo extrato para o mesmo parâmetro. Dados expressos em (média ± desvio padrão).

Os extratos apresentaram pH que variaram entre 4 e 6,9 (Tabela 4). Os extratos de folha de pitangueira apresentaram os valores mais altos de pH entre os extratos produzidos ($p < 0,05$). Já os valores mais baixos foram encontrados nos extratos de folha de amoreira preta. Este estudo demonstrou que, para as temperaturas de extração analisadas, não houve alteração no pH final dos extratos ($p > 0,05$).

Tabela 7 - pH dos extratos vegetais.

Extratos	pH		
	T30	T45	T60
Amoreira	4,2 ± 0,2 ^{D,a}	4,0 ± 0,0 ^{C,a}	4,0 ± 0,0 ^{C,a}
Carqueja	5,4 ± 0,1 ^{C,a}	5,2 ± 0,2 ^{B,a}	5,3 ± 0,0 ^{B,a}
Guaraná	6,1 ± 0,0 ^{B,a}	6,0 ± 0,0 ^{A,a}	6,1 ± 0,1 ^{A,a}
Hortelã	5,7 ± 0,5 ^{B,C,a}	5,2 ± 0,0 ^{B,a}	5,2 ± 0,1 ^{B,a}
Pitangueira	6,9 ± 0,1 ^{A,a}	6,5 ± 0,3 ^{A,a}	6,4 ± 0,3 ^{A,a}

Fonte: Própria autoria. Onde: T 30: temperatura de extração a 30 °C; T 45: temperatura de extração a 45 °C; T 60: temperatura de extração a 60 °C; A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos obtidos na mesma temperatura de extração. a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes temperaturas para o mesmo extrato. Dados expressos em (média ± desvio padrão).

Vargas et al. (2016), produzindo extratos aquosos de fontes vegetais, extraídos a 90 °C sob agitação mecânica, durante 30 min, obtiveram os valores de pH de 5,94 a 4,5, para o de extrato de guaraná e folha de pitangueira, respectivamente.

5.2.4 Análises de Atividade Antioxidante e Capacidade Redutora dos Extratos

5.2.4.1 Método da captura do radical DPPH (DPPH•)

Para a determinação da atividade antioxidante dos extratos pelo método de captura pelo radical DPPH, foram realizados testes prévios para a avaliação do tempo de estabilização de cada amostra. Este tempo de estabilização é relacionado com a amostra independente da temperatura de extração. A análise de estabilização determinou que os tempos eram de 5 min para a folha de pitangueira, 20 min para o guaraná, 10 min para a hortelã, 5 min para a carqueja e 15 min para a folha de amoreira.

Para a análise de DPPH, o resultado obtido foi expresso pelo índice EC 50, que trata da concentração mínima de extrato necessária à inibição do radical DPPH em 50%. Sendo que quanto menor estes valores, maior a atividade antioxidante do extrato.

Os resultados de captura do radical DPPH (Tabela 8) sugerem que os extratos são capazes de eliminação de radicais livres e, portanto, podem ser utilizado para a prevenção da iniciação/propagação de reações em cadeia de radicais livres, através da estabilização de espécies reativas antes da participação destes nas reações (DORMAN et al., 2009).

Os extratos apresentaram resultados de capacidade de captura do radical DPPH semelhantes quando os estes eram obtidos a 30 e 60 °C, sendo que, sob estas condições de extrações, os extratos aquosos de folha de pitangueira e guaraná apresentaram melhores atividades antioxidantes, sendo estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$). Estes foram seguidos dos extratos de hortelã, folha de amoreira e carqueja que demonstraram diferenças entre suas atividades antioxidantes ($p < 0,05$).

Tabela 8 - Atividade antioxidante dos extratos vegetais pelo método de captura do radical DPPH

Extratos	DPPH mg/ml		
	T30	T45	T60
Amoreira	29,4 ± 0,8 ^{B,a}	27,6 ± 0,7 ^{B,a}	19,5 ± 1,2 ^{B,b}
Carqueja	45,1 ± 2,8 ^{A,a}	35,1 ± 0,7 ^{A,b}	28,5 ± 1,2 ^{A,c}
Guaraná	5,1 ± 0,3 ^{D,a}	4,4 ± 0,1 ^{D,b}	3,5 ± 0,2 ^{D,c}
Hortelã	11,0 ± 1,4 ^{C,a}	9,6 ± 0,9 ^{C,a,b}	7,5 ± 0,8 ^{C,b}
Pitangueira	2,7 ± 0,2 ^{D,a}	2,5 ± 0,1 ^{E,a}	2,5 ± 0,2 ^{D,a}

Fonte: Própria autoria. Onde: T 30: temperatura de extração a 30 °C; T 45: temperatura de extração a 45 °C; T 60: temperatura de extração a 60 °C; A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos para a mesma temperatura de extração para o mesmo parâmetro. a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes temperaturas no mesmo extrato para o mesmo parâmetro. Dados expressos em (média ± desvio padrão).

Para os extratos obtidos a 45 °C, os extratos de hortelã, folha de amoreira e carqueja apresentaram menores atividades antioxidantes. Os extratos produzidos com guaraná e a folha de pitangueira apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si, sendo este último o extrato que apresentou maior capacidade de captura do radical DPPH. Oh et al. (2013) também

observaram diferença da atividade antioxidante entre os extratos aquosos de hortelã e folha de amoreira (*Morus Alba*), produzidos a 30 °C.

Capacidade de captura do radical DPPH para os extratos aquosos de hortelã foi reportada por Farnad et al. (2014) em estudo utilizando como solventes, o metanol, etanol e mistura metanol e etanol. Os autores encontraram valores entre 10,02 a 14,77 mg/ml para EC50, valores próximos aos obtidos nesta tese. Por outro lado, valores divergentes dos encontrados nesta tese foram obtidos Dorman et al. (2003), em estudo avaliando diferentes espécies de hortelã, a *Mentha piperita* apresentou valores de EC 50 em torno de 0,15 mg/ml. Entretanto, estes valores foram obtidos em extratos liofilizados, o que pode contribuir para a melhoria da atividade antioxidantes dos extratos (DORMAN et al., 2003).

O efeito da temperatura de extração nas atividades antioxidantes dos extratos aquosos de guaraná, também foi observado por Majhenič, Škerget e Knez (2007) em estudos realizados com extratos obtidos a temperatura ambiente e a temperatura de ebulição (100 °C). Entretanto, os autores observaram comportamento contrário ao observado nesta tese, sendo que as maiores porcentagens de inibição foram observadas nos extratos obtidos em menores temperaturas.

Dias et al. (2009), analisando extratos hidroalcóolicos 70% liofilizados de carqueja, obtiveram um EC 50 de 0,021 mg/mL, valores divergentes do obtido por este estudo, que podem ser justificados pela diferença de solvente utilizada e pela liofilização dos extratos.

5.2.4.2 Método da captura do radical ABTS

Foi analisada a atividade antioxidante dos extratos segundo o método de captura pelo radical ABTS, e os valores foram expressos em equivalente Trolox (TEAC), que foi utilizado para a curva de calibração. Para os todas as temperaturas estudadas a folha de pitangueira e o extrato de guaraná apresentaram valores de atividade antioxidantes superiores aos demais extratos.

Em todas as amostras vegetais, a atividade antioxidantes dos extratos, utilizando-se o método de captura do radical ABTS, não sofreram alteração ($p > 0,05$) em relação a temperatura utilizada para a extração, demonstrando que a atividade antioxidantes eram independentes da temperaturas de extração utilizadas.

Tabela 9 - Atividade antioxidante dos extratos vegetais pelo método de captura do radical ABTS

Extratos	ABTS		
	mg de trolox/ g de amostra seca		
	T30	T45	T60
Amoreira	11,0 ± 0,8 ^{B,a}	12,7 ± 3,1 ^{B,a}	21,4 ± 7,2 ^{B,a}
Carqueja	8,1 ± 5,1 ^{B,a}	9,3 ± 5,5 ^{B,a}	10,6 ± 5,2 ^{B,a}
Guaraná	76,4 ± 2,9 ^{A,a}	78,7 ± 2,3 ^{A,a}	80,0 ± 2,1 ^{A,a}
Hortelã	18,5 ± 7,9 ^{B,a}	17,1 ± 8,5 ^{B,a}	28,5 ± 11,5 ^{B,a}
Pitangueira	80,9 ± 4,3 ^{A,a}	71,3 ± 24,0 ^{A,a}	77,2 ± 3,5 ^{A,a}

Fonte: Própria autoria. Onde: T 30: temperatura de extração a 30 °C; T 45: temperatura de extração a 45 °C; T 60: temperatura de extração a 60 °C; A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos para a mesma temperatura de extração para o mesmo parâmetro. a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes temperaturas no mesmo extrato para o mesmo parâmetro. Dados expressos em (média ± desvio padrão).

Oh et al. (2013) avaliando a atividade antioxidante pelo método de captura do radical ABTS de variadas fontes de folhas para produção de chás, verificaram que a folha de hortelã apresentava valores de atividade antioxidante superiores aos do extrato de folha de amoreira, resultado que neste estudo foi observado apenas em extratos produzidos a 30 °C. Dorman et al. (2003) relataram valores atividade antioxidantes, pelo método captura do radical ABTS, para extratos aquosos de hortelã por volta de 0,34 mg de trolox/g de amostra.

5.2.4.3 Capacidade redutora dos extratos

Os resultados dos ensaios sobre a capacidade redutora dos extratos aquosos, expressos em equivalente de ácido gálico (EAG) apresentaram uma grande variação em relação a diferentes extratos, variando de 0,08 a 0,87 EAG/g amostra seca (Tabela 8). Para os extratos obtidos a 30 °C, o extrato de folhas de pitangueira apresentou os maiores valores ($p < 0,05$), independente da temperatura de extração, seguida pelo extrato de semente de guaraná. O extrato da carqueja apresentou a menor capacidade redutora.

Para as extrações a 45 e 60 °C, os extratos que apresentaram menores valores foram de hortelã, folhas de amoreira e carqueja, que foram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$). Para a extração a 45°C as capacidade redutoras dos extratos de folha de pitangueira e guaraná mostraram-se semelhantes, entretanto para a extração a 60 °C, houve diferença significativa entre eles, sendo que o extrato de folha de pitangueira apresentou os maiores valores. Este resultado pode ser atribuído também ao teor de sólidos totais e teor de matéria seca, que apresentou maiores valores para folha de pitangueira.

Tabela 10 - Capacidade redutora total dos extratos

Extratos	Capacidade redutora mg de EAG/g amostra seca		
	T30	T45	T60
Amoreira	$0,24 \pm 0,05$ ^{C,a}	$0,26 \pm 0,02$ ^{B,a}	$0,25 \pm 0,01$ ^{C,a}
Carqueja	$0,10 \pm 0,02$ ^{D,a}	$0,11 \pm 0,02$ ^{B,b}	$0,13 \pm 0,03$ ^{C,a}
Guaraná	$0,51 \pm 0,07$ ^{B,b}	$0,71 \pm 0,09$ ^{A,a}	$0,55 \pm 0,02$ ^{B,a,b}
Hortelã	$0,25 \pm 0,04$ ^{C,a}	$0,24 \pm 0,04$ ^{B,a}	$0,30 \pm 0,02$ ^{C,a}
Pitangueira	$0,78 \pm 0,01$ ^{A,a}	$0,74 \pm 0,07$ ^{A,a}	$0,87 \pm 0,13$ ^{A,a}

Fonte: Própria autoria. Onde: T 30: temperatura de extração a 30 °C; T 45: temperatura de extração a 45 °C; T 60: temperatura de extração a 60 °C; EAG: equivalente ácido gálico, A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos para a mesma temperatura de extração para o mesmo parâmetro. a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes temperaturas no mesmo extrato para o mesmo parâmetro. Dados expressos em (média $\pm$ desvio padrão).

Não se observou efeito da temperatura sobre o poder redutor nos extratos de folha de pitangueira e folha de amoreira-preta, hortelã e carqueja ($p > 0,05$). Em contrapartida, foi determinado maior poder redutor total quando utilizada a temperatura 45°C, para o extrato de semente de guaraná, em relação às demais temperaturas de extração.

Majhenič, Škerget e Knez (2007) avaliaram o efeito da temperatura nas atividades antioxidantes dos extratos aquosos de guaraná. Em estudos realizados com extratos com diferentes solventes (água, metanol, mistura de aquosa de 35% acetona e 60 % etanol), extraídos a temperatura ambiente e a 100 °C, os autores observaram que geralmente os extratos obtidos em maiores temperaturas apresentaram maiores capacidades redutores, exceto pelos extratos obtidos com água, que apresentaram valores de 119 e 186 mg EAG/g de extrato para os extratos

obtidos na temperatura ambiente e 100 °C respectivamente. Martins (2010) determinou capacidades redutoras inferiores (entre 32,82 e 46,74 mg de EAG/ g de resíduo seco) para extratos aquosos de guaraná. Valores inferiores aos obtidos nesta tese foram reportados por Basile et al. (2005), avaliando o poder redutor de extratos etanólicos de guaraná, em torno de 8,43 mg de EAG/g.

Oh et al. (2013) observaram diferenças entre os extratos obtidos da hortelã e da folha de amoreira, sendo estes respectivamente, 75,31 mg de EAG/g extrato e 11,64 mg de EAG/g extrato, contrariamente ao que esta tese revelou, os extratos aquosos de folha de hortelã e folha de amoreira apresentam capacidade redutoras semelhantes.

Dorman et al. (2003), em estudo avaliando diferentes espécies de hortelã, o extrato da *Mentha piperita*, apresentou valores de poder redutor de 0,23 g de EAG/g de amostra seca de extrato, corroborando com os obtidos nesta tese. Farnad et al. (2014), utilizando a hortelã como matéria prima na produção de extratos com capacidade antioxidante, encontrou valores entre 0,02 e 0,04 g de EAG/ g de pó de hortelã quando os solventes eram o metanol, etanol e mistura metanol e etanol.

Radjokovic et al (2016), avaliando o efeito de diferentes tipos de maceração nas propriedades das amostras encontrou-se valores de capacidade redutora entre 0,12 e 0,14 mg de EAG/ g de amostra em estudo com folha de amoreira negra, resultados semelhantes aos obtidos por este estudo.

5.2.5 Correlação entre os ensaios antioxidantes

As atividades antioxidantes de uma amostra podem ser atribuídas a diferenciados mecanismo de ação, sendo assim utiliza-se mais de uma metodologia de para obtenção dos valores de atividades antioxidantes. Uma maneira de correlacionar estas análises e verificar o grau de relação entre estas, é a utilização da correlação de person. Este coeficiente varia entre os valores -1 e 1. Os valores próximos a zero indicam inexistência ou fraca relação entre as análises e valores próximos a 1 indicam uma excelente relação linear. Valores negativos próximos a -1 indicam uma relação linear ótima porém inversamente proporcional, ou seja quando uma das variáveis aumenta a outra diminui.

A correlação de Pearson obtida entre os ensaios de atividades antioxidantes e a capacidade redutora dos extratos estudados e são apresentadas nas Figuras 15, 16 e 17.

Figura 15 - Correlação entre os resultados das análises de capacidade de redução e captura do radical ABTS dos extratos vegetais

Onde ABTS: Método da captura do radical ABTS, expresso em g de trolox/g de pó seco e CR: Capacidade Redutora dos extratos, expresso em mg de ácido gálico/g de pó seco. Fonte: Própria autoria

Figura 16 - Correlação entre os resultados das análises de capacidade de redução e captura do radical DPPH dos extratos vegetais

Onde DPPH: Método da captura do radical DPPH, expresso em mg/ml e CR: Capacidade Redutora dos extratos expresso em mg de ácido gálico/g de pó seco. Fonte: Própria autoria

Figura 17 - Correlação entre os resultados das análises captura do radical DPPH e captura do radical ABTS dos extratos vegetais

Onde ABTS; Método da captura do radical ABTS, expresso em g de trolox/g de pó seco e DPPH: Método da captura do radical DPPH expresso em mg/ml. Fonte: Própria autoria

Todas as correlações entre os ensaios realizados foram altas ($r > 0,8$). Correlação positiva foi obtida entre as análises de captura de radical ABTS e a capacidade redutora dos extratos (0,94).

A capacidade redutora e o poder de captura do radical DPPH foi negativamente correlacionado (-0,80), o que indicou que com o aumento da capacidade redutora houve aumento nas atividades antioxidantes pelo método de captura do radical DPPH. Forte associação entre as análises de captura de radical DPPH e capacidade redutora foram relatadas em outros estudos encontrados na literatura. Avaliando a capacidade antioxidantes de diferentes variedades de hortelã, observou-se alta relação entre a análise de DPPH e de compostos fenólicos, inclusive na variedade *Mentha piperita*, utilizada nesta tese (DORMAN et al., 2003).

Correlação negativa foi obtida quando associados os resultados de captura de radical ABTS e DPPH (-0,84), o que é esperado visto que a análise de DPPH apresenta os resultados em termos de quanto maior melhor sua capacidade antioxidante, ao contrário do radical ABTS.

5.2.6 Cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC/DAD/MS)

5.2.6.1 Identificação dos compostos fenólicos presentes na hortelã.

A análise Cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC/DAD/MS) foi realizada durante doutorado sanduíche na França. Em função do tempo disponível, foi realizada apenas análise dos extratos de hortelã, que segundo a literatura, apresentavam uma composição mais condizente com o perfil de análises do laboratório.

A amostra foi analisada em cromatógrafo em três intervalos distintos, sendo estes, imediatamente (TO), após 16 h e 72 h depois de estocagem em 4°C, para análise de sua estabilidade. A identificação dos compostos foi realizada com os extratos obtidos a 60°C, visto que foi esta a temperatura escolhida para a produção dos filmes, a escolha do tempo de estoque de 16 h foi devido a este ser o tempo médio entre as extrações e a realização das análises antioxidantes, com intuito de se estabelecer uma comparação com entre as análises antioxidantes, de capacidade redutora e a composição dos extratos de hortelã obtidos por UHPLC. A quantificação dos compostos foi obtida nos extratos produzidos nas três temperaturas (30, 45 e 60°C)

Os extratos foram analisados em diferentes tempos de estocagem, com a proposta de analisar sua estabilidade. Cromatogramas obtidos neste estudo (Figura 18) apontam uma diminuição do pico correspondente à apigenina 7-O-rutinosídeo, que foi menor no tempo de 16 h horas de estocagem (T16) em relação ao extrato analisado imediatamente após a extração. Um pequeno decréscimo também pode ser percebido nos compostos luteolina 7-O-rutinosídeo, erictidiol 7-O-rutinosídeo e apigenina 7-O-glucunónico. Estas variações, entretanto, não são tão perceptíveis. Futuras análises necessitam ser realizadas para avaliar a estabilidade do extrato em relação ao tempo de armazenamento por períodos mais longos.

Figura 18 - Cromatograma do extrato aquoso de hortelã analisado por UHPLC/DAD/MS imediatamente após a preparação (preto) e depois de 16 h de armazenamento (vermelho)

Fonte: Própria autoria

A identificação dos compostos fenólicos foi obtida com base nos seus tempos de retenção comparados com moléculas padrão (analisado ou descrito na literatura), espectro UV-visível e espectro de massa no modo negativo (peso molecular e fragmentos de massa) (Figura 19). Dentre os flavonoides presentes no extrato de hortelã, estão flavan-3-ols (e.g. epigallocatequina), flavonas (e.g. luteolina 7-O-rutinosídeo, luteolina 7-O-glucurnido, apigenina 7-O-rutinosídeo, apigenina 7-O-glucurónido, diosmina), flavanonas (e.g. eriodictiol 7-O-rutinosídeo, hesperidina) e ácidos fenólicos: cafeíco, rosmarínico, salvianólico e hidróxido 4-O-glucosídeo (Tabela 11).

Figura 19 - Cromatograma do extrato aquoso de hortelã analisado por UHPLC/DAD/MS após 16 h de armazenamento

Fonte: Própria autoria

O pico 3 (TR = 2,38 min) (Tabela 11) mostra uma razão entre a massa e a carga (m/z) (obtida pelo espectro de massa) à 179,0336 [M-H]⁻ e a presença de uma fragmentação a m/z 134,0326 [M - H - CO₂]⁻, resultante da perda de molécula do dióxido de carbono, significando que o espectro de massa do pico corresponde ao ácido cafeíco, por comparação com a literatura (KAPP et al., 2013) e por comparação com o tempo de retenção e espectro de massa de padrões. A presença de ácido cafeíco foi encontrado em outros estudos utilizando a *Mentha piperita* (FARNAD; HEIDARI; ASIANPOUR, 2014; FIGUEROA PÉREZ et al., 2014; ZGÓRKA; GŁOWNIAK, 2001). O pico 18 (TR = 7,97) apresenta fragmentos m/z a 359,0998 e 719,1873, correspondente ao ácido rosmarínico, um derivado do ácido cafeíco, a determinação deste composto foi atribuída a fragmentação semelhante encontrado em outros estudos envolvendo outras plantas, onde os autores identificaram o ácido rosmarínico (HOSSAIN et al., 2010; NUENGCHAMNONG; KRITTASILP; INGKANINAN, 2011). A presença destes do ácido rosmarínico foi igualmente relatada em outros estudos utilizando a *Mentha piperita* (AREIAS et al., 2001; FIGUEROA PÉREZ et al., 2014; ZGÓRKA; GŁOWNIAK, 2001). Assim, como encontrado por Figueroa Pérez et al. (2014) e por Zgórk e Główniak (2001) esta tese demonstrou a presença do ácido p-coumarico na *Mentha piperita*.

Tabela 11 - Compostos identificados no extrato de hortelã estocado por 16 h a 4 °C obtidos por UHPLC/DAD/MS/ ESI-

Pico	RT MS (min)	spectro UV (nm)	Espectro de massa (m/z)		Moléculas propostas
			[M-H] ^{-a}	Fragmentos ^b	
1	1,60	294 (max)	299,0779	179,0339	Ácido hydroxybenzoico 4-O- glucosídeo
2	1,96	295 (sh); 323 (max)	353,0894	201,0148	Derivado do ácido cafeíco
3	2,38	295 (sh); 323 (max)	179,0336	135,0415	Ácido cafeico**
4	2,56	317 (max); 484	305,0684	96,9535; 225,1122; 267,0312; 118,9365	Galocatequina ou Epigallocatequina
5	2,66	295 (max)	305,0827	96,9535; 225,1153	Epigallocatequina (ou isômero)
6	2,98	329 (max); 484	387,1692	207,1020; 163,1095	Lignina (Medioresinol or Trachelogenina)*
7	3,33	325 (max)	594,11544	353,0663; 473,1068; 383,0762	Apigenin 6,8-di-C-glucoside
8	3,92	308 (max) ; 485	163,0363	119,0437; 159,0416	Ácido <i>p</i> -coumarico
9	3,98	344 (max); 485	634,1062	285,0420; 351,0577; 453,1805; 593,1520	Luteolina-di-O-glucuronídeo
10	5,69	ND	609,1451	300,0273; 151,1077	Quercetina 7-O-rutinosídeo
11	5,74	284 (max)	595,1908	287,0695; 151,0074; 135,0472	Eriodictiol 7-O-rutinosídeo
12	5,99	344 (max); 484	593,1520	285,0420; 284,0338	Luteolina 7-O-rutinosídeo
13	6,14	348 (max)	461,0750	285,0420 ; 133,0250 ; 150,9996	Luteolina 7-O-glucuronídeo
14	7,22	331 (max); 485	577,1553	269,0454	Apigenina 7-O-rutinoside*
15	7,64	283 (max)	445,0771	269,0454	Apigenina 7-O-glucuronide
16	7,85	340 (max)	607,1664	299,0567; 284,0338	Diosmina* Diosmetina-7-O-rutinosídeo
17	7,92	285 (max) ; 330	301,0853	301,0853; 299,0694	Hesperidina Hesperetina-7-O-rutinosídeo
18	7,97	290 (sh); 329 (max)	359,0998	161,0223; 197,0445 ; 179.0336; 135,0415	Ácido Rosmanínico
19	8,00	285 (sh); 330 (max)	461,0750	285,0420	Luteolina 7-O-glucuronídeo*
20	8,19	285 (max); 335(sh)	493,1161	360,0811	Ácido salvianolico

Onde TR: tempo de retenção; ND: Não detectado em UV; Para espectro UV - max: altura máxima do pico, sh: shoulder; a: dados experimentais b: fragmentos (mostrados da maior pra menor intensidade); * Identificação baseada na literatura ** Identificação baseada na literatura e análises de padrão.

Espécies de mentha são ricas em flavonóides, particularmente em flavonas e flavanonas. Os compostos predominantes identificados na hortelã foram glicosídeos de flavanones e flavonas. A luteolina foi encontrada glicosilada como luteolina 7-O-glucuronídeo e luteolina 7-

O-rutinosídeo. Estes compostos foram identificados com o auxílio do espectro da luteolina aglicona (m/z 285,0420), que demonstrou a presença de seus derivados na hortelã. A fragmentação padrão do pico 12 demonstrou m/z 308, que provavelmente foi devido a rutinose desidratada (HOSSAIN et al., 2010; PAREJO et al., 2004). Compatível com a presença de íons de fragmentação m/z 133,0250 e m/z 150,9996, o pico 19, pode corresponder com a luteolina 7-O-glucuronídeo (KAPP et al., 2013). A presença deste componente foi igualmente relatada por outros autores (AREIAS et al., 2001; GUEDON; PASQUIER, 1994). Os dois compostos mostrando o mesmo padrão UV e de fragmentação, característicos da luteolina-glucuronídeo, mas com tempos de retenção diferentes (picos 13 e 19) foram encontrados em outros estudos, que atribuiu esta particularidade ao fato do glicosídeo estar ligado em diferentes posições das moléculas da luteolina (KRZYZANOWSKA et al., 2011).

A *Mentha piperita* contém formas mono-O glicosídeos da apigenina, como apigenina 7-O-glucuronídeo e apigenina 7-O-rutinosídeo (GUEDON; PASQUIER, 1994) que foram identificadas devido à presença da fragmentação do íon a m/z 269,0454 (KAPP et al., 2013; PAREJO et al., 2004), que corresponde a fragmentos resultantes da perda de $[M-H-176]^-$ para o glucuronídeo e $[M-H-308]^-$ para o rutinosídeo (PAREJO et al., 2004). Igualmente, foi possível detectar a presença de derivados de di-C-glicosídeos, a apigenina-6-8-di-C-glucosídeo, na composição do extrato de hortelã analisada nesta tese, bem como em outros estudos (AREIAS et al., 2001).

Outros componentes foram identificados como flavonoídes-rutinosídeos, devido à presença de fragmentos resultantes da perda de $[M-H-308]^-$ no espectro de massa. Eles correspondem ao erictidiol 7-O-rutinosídeo (eriocitrina), quercetina 7-O-rutinosídeo (rutina), e diosmetina-7-O-rutinosídeo (diosmina), e foram identificados por comparação de seus fragmentos com dados da literatura (HOSSAIN et al., 2010; KAPP et al., 2013; PAREJO et al., 2004). Estes compostos foram identificados em vários estudos envolvendo a *Mentha piperita* (AREIAS et al., 2001; FARNAD; HEIDARI; ASIANPOUR, 2014; GAO et al., 2012; GUEDON; PASQUIER, 1994).

A lignina foi encontrada na forma de medioresinol, identificada pelos fragmentos de íons m/z 387,1692; 207,1020; 163,1095 que foram semelhantes aos encontrados na literatura (HOSSAIN et al., 2010).

Em oposição a estudos prévios utilizando a *Mentha piperita*, no presente estudo não foi encontrado o ácido sinápico (FIGUEROA PÉREZ et al., 2014), nem a narigina (FIGUEROA PÉREZ et al., 2014; GUEDON; PASQUIER, 1994), ácido chlorogenico (FARNAD;

HEIDARI; ASIANPOUR, 2014; MEKINIĆ et al., 2014; MOLDOVAN et al., 2014), ácido ascórbico (FARNAD; HEIDARI; ASIANPOUR, 2014), ácido gálico (FARNAD; HEIDARI; ASIANPOUR, 2014), ácido ferulico (FARNAD; HEIDARI; ASIANPOUR, 2014), pebrellina (AREIAS et al., 2001; GAO et al., 2012), kaempferol 7-O-rutinosídeo (GAO et al., 2012), luteolina 7-O- neohesperidosídeo (GAO et al., 2012), narirutina (GAO et al., 2012) o gardenina (GAO et al., 2012). A ausência destes compostos nas amostras desta tese pode ser explicada pela diferença de polaridade dos extratos utilizados pelos demais autores que podiam ser: metanol e etanol (FARNAD; HEIDARI; ASIANPOUR, 2014), uma mistura de metanol e água (GAO et al., 2012), metanol e etanol (FARNAD; HEIDARI; ASIANPOUR, 2014) ou éter de petróleo, cloroformio, etil éter, etil acetona, acetona, etano, metanol (AREIAS et al., 2001). Por outro lado, nesta tese foi demonstrada a identificação pela primeira vez do composto apigenina 7- O-glucuronídeo na *Mentha piperita*.

5.2.6.2 Quantificação

Apenas os compostos que identificados que apresentaram boa resolução foram quantificados. Com isso, foi possível quantificar 3 famílias químicas: flavonas, flavononas e ácidos fenólicos, podendo expressar suas respectivas concentrações em erictidiol, luteolina e ácido cafeíco equivalente (Tabela 12). Os compostos foram quantificados utilizando as áreas dos picos à 323 nm para os ácidos fenólicos, 288 nm para as flavononas e 348 para as flavonas. As flavonas foram apigenina 6,8-di-C-glucosida, luteolina 7-O-rutinosídeo, luteolina 7-O-glucuronida e apigenina 7-O-glucuronídea, e os ácidos fenólicos foram ácido cafeíco, ácido rosmarínico e ácido p-coumarínico e a flavonona foi erictidiol 7-O-rutinosídeo.

Os resultados mostram maior variabilidade nos extratos produzidos a 30 °C (coeficientes de variações entre 15 e 70%) comparados com os extratos obtidos a 45 e 60 °C.

Os ácidos fenólicos mais abundantes encontrados neste estudo foram os ácidos cafeíco e o rosmarínico, similarmente a resultados obtidos em outros estudos (DORMAN et al., 2009; LV et al., 2012). Esta tese revelou que para a amostra utilizada a luteolina 7-O-glucuronídeo era o composto flavonoíco majoritário no extrato aquoso de hortelã. Em contrapartida, pode-se observar altos valores de ericitrina e luteolina 7-O-rutinosídeo em estudos feitos por outros autores (FECKA; TUREK, 2007; KAPP et al., 2013). A diferença de composições obtidas por

esta tese e por outros autores pode estar relacionada à variabilidade da planta, que apresenta alterações devido a diversos fatores, como solo, local do plantio, variações de temperaturas, entre outros.

Tabela 12 - Quantificação de flavonoídes e ácidos fenólicos no extrato aquoso de hortelã

Composto	Quantificação (mg/mL)		
	T30	T45	T60
Apigenina 6.8-di-C-			
glucosídio	0,007 ± 0,001 ^a	0,011 ± 0,007 ^a	0,008 ± 0,000 ^a
Luteolina 7-O-rutinosídeo	0,012 ± 0,009 ^a	0,007 ± 0,002 ^a	0,013 ± 0,002 ^a
Luteolina 7-O-glucuronida	0,074 ± 0,019 ^a	0,077 ± 0,010 ^a	0,105 ± 0,008 ^a
Apigenin 7-O-glucuronida	0,003 ± 0,001 ^a	0,003 ± 0,001 ^a	0,004 ± 0,000 ^a
Ácido cafeíco	0,059 ± 0,038 ^b	0,060 ± 0,027 ^b	0,195 ± 0,037 ^a
Ácido p-coumarico	0,013 ± 0,004 ^a	0,012 ± 0,001 ^a	0,007 ± 0,000 ^a
Ácido rosmarínico	0,059 ± 0,038 ^b	0,060 ± 0,027 ^b	0,195 ± 0,037 ^a
Eriodictiol 7-O-rutinosídeo	0,016 ± 0,005 ^a	0,015 ± 0,002 ^a	0,018 ± 0,001 ^a

Fonte: Própria autoria. Onde: T 30: temperatura de extração a 30 °C; T 45: temperatura de extração a 45 °C; T 60: temperatura de extração a 60 °C; a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes temperaturas no mesmo extrato para o mesmo parâmetro. Dados expressos em (média ± desvio padrão).

A Tabela 13, mostra a soma das concentrações dos componentes das famílias de compostos fenólicos. Os conteúdos de ácidos fenólicos foram determinados pela soma dos conteúdos de ácido cafeíco, ácido p-cumárico e ácido rosmarínico. As flavanonas pela soma dos conteúdos da apigenina 6,8-di-C-glucosida, luteolina 7-O-rutinosídeo, luteolina 7-O-glucuronida e apigenina 7-O-glucuronídea e a flavonona foi atribuído o valor do conteúdo do erictidiol 7-O-rutinosídeo.

O conteúdo fenólico foi superior nos extratos obtidos à 60 °C, havendo um aumento de até 3 vezes em comparação com os extratos produzidos a 30 e 45 °C. Não foram observadas diferenças entre os conteúdos de flavonas e flavanonas.

Tabela 13 - Conteúdo de compostos fenólicos

Família de compostos fenólicos	Conteúdo fenólico mg/mL		
	T30	T45	T60
Flavonas	0.096 ^a	0.098 ^a	0.130 ^a
Flavanonas	0.016 ^a	0.015 ^a	0.018 ^a
Ácidos fenólicos	0.130 ^b	0.132 ^b	0.397 ^a

Fonte: Própria autoria. Onde: T 30: temperatura de extração a 30 °C; T 45: temperatura de extração a 45 °C; T 60: temperatura de extração a 60 °C; a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes temperaturas no mesmo extrato para o mesmo parâmetro.

5.3 Características e propriedades dos filmes

5.3.1 Aspectos visuais e espessura

Para a produção dos filmes bioativos foi escolhido os extratos de folha de pitangueira, guaraná e hortelã, pois este apresentaram os melhores resultados nas análises de atividades antioxidantes. A temperatura de 60°C foi escolhida, pois apresentou melhores resultados na atividade antioxidante pelo método de captura do radical DPPH. Os filmes (Figura 20) apresentaram aspecto homogêneo e facilidade de remoção das placas. Os filmes com extrato apresentaram uma coloração mais amarronzada que os filmes controle, sendo esta alteração de cor menos pronunciada em filmes com extratos de guaraná, isto está relacionado com a tonalidade mais clara destes extratos. Os extratos de hortelã e folha de pitangueira, por ser visivelmente mais escuros, acarretaram em filmes com tonalidades mais fortes e divergiram mais na aparência que os filmes sem adição de extratos.

Figura 20 - Filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais

Onde Controle: formulação sem adição de extrato; 50P: formulação com 50 g de extrato de folha de pitanga/100g de gelatina; 150P: formulação com 150 g de extrato de folha de pitanga/100g de gelatina. 50G: formulação com 50 g de extrato de guaraná/100g de gelatina; 150P: formulação com 150 g de extrato de guaraná /100g de gelatina. 50H: formulação com 50 g de extrato de hortelã/100g de gelatina; 150P: formulação com 150 g de extrato de hortelã/100g de gelatina. Fonte: Própria autoria

Para especificar a influência dos extratos nos filmes estudados, foi calculado o teor de matéria seca de extrato nos filmes, com o propósito de aproximar o teor dos compostos vegetais nos filmes. Este cálculo foi obtido com base nos teores encontrados na Tabela 4, exposta no item 5.2.1, considerando a massa de extrato acrescida por 100 g de solução filmogênica. Os valores indicados na Tabela 14 sugerem que as concentrações utilizadas do extrato apresentaram baixos valores de matéria seca, o que poderia corroborar com a baixa influência da incorporação dos extratos em determinadas características dos filmes, que serão discutidas nos itens a seguir. Em outras palavras, o efeito dos extratos sobre as propriedades dos filmes seria provavelmente, por algum tipo de interação química entre os seus constituintes e a gelatina.

Tabela 14 - Teor de matéria seca de extrato nos filmes com diferentes concentrações de extratos vegetais

Extrato vegetal	Teor de matéria seca mg de m.s de extrato/100 g de solução	
	50	150
Pitangueira	124,4	373,2
Guaraná	77,2	231,6
Hortelã	107,2	321,6

Fonte: Própria autoria. 50: formulação com 50 g de extrato/100g de gelatina; 150: formulação com 150 g de extrato/100g de gelatina.

As espessuras dos filmes se mantiveram em torno 0,077 mm (Tabela 15), não apresentando diferença entre os filmes analisados ($p > 0,05$), demonstrando que a adição dos extratos não exerceu efeito sobre esta característica. Esta uniformidade da espessura foi igualmente relatada por Bitencourt et al. (2014) em estudo com filmes de gelatinas com extrato de cúrcuma, por Kanmani e Rhim (2014) em filmes de carragena com de extrato de semente de uva e por Gómez-Estaca et al. (2009c) em filmes de gelatinas de peixe e bovina com extratos de orégano e alecrim, o que demonstra que a adição de extrato não interfere na espessura dos filmes de gelatina.

Tabela 15 - Espessura dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais

Extrato vegetal	Espessura mm		
	Controle	50	150
Pitangueira	0,075 ± 0,008 ^a	0,076 ± 0,001 ^{A,a}	0,081 ± 0,001 ^{A,a}
Guaraná	0,075 ± 0,008 ^a	0,078 ± 0,004 ^{A,a}	0,077 ± 0,000 ^{A,a}
Hortelã	0,075 ± 0,008 ^a	0,074 ± 0,002 ^{A,a}	0,079 ± 0,003 ^{A,a}

Fonte: Própria autoria. Controle: formulação sem adição de extrato; 50: formulação com 50 g de extrato/100g de gelatina; 150: formulação com 150 g de extrato/100g de gelatina. A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos para a mesma concentração de extrato. a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes concentrações do mesmo extrato. Dados expressos em (média ± desvio padrão).

Em relação ao efeito da concentração, foi igualmente relatado por Wu et al. (2013) que em filmes à base de gelatina de carpa prateada com diferentes concentrações de extrato de chá verde, esta adição não interferiu na espessura dos filmes.

5.3.2 Cor e opacidade dos filmes

A adição dos extratos vegetais nos filmes a base de gelatina exerceu influência nos parâmetros L^* , a^* e b^* (Tabela 16). Quando correlacionados as diferentes variedades de extratos na mesma concentração, pôde-se notar que a adição de hortelã acarretou em diminuição do parâmetro L^* (claro/escuro) ($p < 0,05$). Este resultado é devido aos menores valores de L^* dos extratos de hortelã observados na Tabela 5. Entretanto, apesar desta mudança, todos os filmes apresentaram valores acima de 87, o que indica que todos os filmes produzidos apresentaram tonalidades muito claras.

Para o parâmetro a^* , a adição de extrato de guaraná não demonstrou interferência ($p > 0,05$) em relação à cor do filme controle, independentemente da concentração analisada. Entretanto, a adição de extrato de pitangueira e de hortelã acarretou em valores menores de a^* , o que indica uma tendência mais esverdeada dos filmes. Esta tendência também sofreu interferência em relação à variação das concentrações adicionadas nos filmes, sendo que maiores concentrações de extratos de folhas de pitangueira e hortelã acarretavam em filmes tendendo para esverdeados.

Quando avaliado o parâmetro b^* , que representa as variações de cor entre o azul e o amarelo, em todas as variedades de extratos adicionados observou-se que a adição destes colabora para uma coloração mais amarelada dos filmes e que tal tendência também é observada com adição de maiores concentrações de extratos nos filmes.

Entretanto, quando avaliado cada variedade de extratos em uma mesma concentração, observou-se que, para a concentração de 50 g de extrato/100 g de gelatina, existiu diferença entre os filmes acrescidos de extratos de guaraná quando comparados com os filmes com extratos de folhas de pitangueira e hortelã. Este efeito não pode ser observado nos filmes produzidos com a concentração de 150 g de extrato/ 100 g de gelatina onde não existiu diferença entre os extratos.

Siripatrawan e Harte (2010), estudando filmes de quitosana com extrato de chá verde, verificaram um decréscimo no valor L^* (de $87,50 \pm 1,43$ a $65,70 \pm 0,97$), similarmente ao observado nesta tese. Estes autores observaram uma tendência amareladas (aumento no valor b^*) para os filmes acrescidos de extrato de chá verde em relação ao filme sem extrato, entretanto os filmes com extratos de plantas apresentaram maiores tendências avermelhadas (aumento no valor a^*).

Em estudo com extratos etanólicos de guaraná, canela, boldo e alecrim adicionados em filmes de gelatina de porco, Bonilla e Sobral (2016) encontram valores L^* (91,7), a^* (-0,74) e b^* (2,56) para os filmes controles, similares aos obtidos por este estudo. Por outro lado, os resultados de parâmetros de cor de filmes de gelatina acrescidos com guaraná demonstraram valores díspares aos detectados por esta tese para os parâmetros b^* (2,65) e a^* (0,713), esta desigualdade pode estar relacionada ao solvente aplicado e a concentração de extrato no filme.

Tabela 16 - Parâmetros L*, a* e b* de filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais

Extrato vegetal	L*			a*			b*		
	Controle	50	150	Controle	50	150	Controle	50	150
Pitangueira	91,3 ± 0,2 ^a	90,2 ± 0,2 ^{A,b}	89,3 ± 0,1 ^{A,c}	- 0,77 ± 0,02 ^a	-1,39 ± 0,12 ^{C,b}	-2,31 ± 0,19 ^{C,c}	2,6 ± 0,0 ^c	7,0 ± 0,8 ^{A,b}	12,3 ± 1,7 ^{A,a}
Guaraná	91,3 ± 0,2 ^a	90,5 ± 0,3 ^{A, B,b}	89,8 ± 0,4 ^{A,c}	- 0,77 ± 0,02 ^{a,b}	-0,75 ± 0,02 ^{A,a}	-0,80 ± 0,02 ^{A,b}	2,6 ± 0,0 ^c	4,1 ± 0,5 ^{B,b}	7,3 ± 0,8 ^{A,a}
Hortelã	91,3 ± 0,2 ^a	89,9 ± 0,3 ^{B,b}	87,2 ± 0,5 ^{B,c}	- 0,77 ± 0,02 ^a	-1,04 ± 0,03 ^{B, b}	-1,41 ± 0,07 ^{B,c}	2,6 ± 0,0 ^c	6,7 ± 0,5 ^{A,b}	14,7 ± 1,4 ^{A,a}

Fonte: Própria autoria. Controle: formulação sem adição de extrato; 50: formulação com 50 g de extrato/100g de gelatina; 150: formulação com 150 g de extrato/100g de gelatina. A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos para a mesma concentração de extrato para o mesmo parâmetro. a,b,c letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes concentrações do mesmo extrato para o mesmo parâmetro. Dados expressos em (média ± desvio padrão).

A adição dos extratos nos filmes em geral provocava uma alteração na diferença de cor dos filmes de gelatina (Tabela 17), sendo que a única exceção foi observada para os filmes com adição de extrato de guaraná em baixas concentrações, que não implicou em diferença estatística com relação ao filme controle. As diferentes concentrações de extratos nos filmes igualmente influenciaram a diferença de cor (ΔE^*) dos filmes ($p < 0,05$), sendo que para maiores concentrações de extrato, maiores os valores de ΔE^* .

Para a concentração de 150 g de extrato/100g de gelatina, houve diferença significativa entre os valores de ΔE^* para os três extratos, sendo que os filmes com extrato de hortelã apresentaram os maiores valores seguidos dos filmes com extratos da folha de pitangueira e do guaraná. Entretanto, para a concentração de 50 g de extrato/100g de gelatina, a adição de extrato de hortelã e folha de pitangueira no filme afetou de maneira similar a diferença de cor.

Tongnuanchan, Benjakul e Prodpran (2013), estudando filmes à base de gelatina de peixe acrescidos com extrato de óleo essencial de raiz de gengibre e raiz de cúrcuma, determinaram valores de diferença total de 2,87 para os filmes controles, valores ligeiramente inferiores aos obtidos nesta tese. Esses autores encontraram valores distintos para diferentes fontes de extratos e diferentes concentrações acrescidas nos filmes.

Tabela 17 - Valores de diferença total de cor (ΔE^*) e opacidade para os filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais.

Extrato vegetal	ΔE^*			Opacidade		
	Controle	50	150	Controle	50	150
Pitangueira	$3,6 \pm 0,2^c$	$6,5 \pm 0,6^{A,b}$	$11,5 \pm 1,5^{B,a}$	$0,3 \pm 0,1^a$	$0,3 \pm 0,1^{C,a}$	$0,3 \pm 0,0^{A,a}$
Guaraná	$3,6 \pm 0,2^b$	$4,8 \pm 0,5^{B,b}$	$7,3 \pm 0,9^{C,a}$	$0,3 \pm 0,1^b$	$1,0 \pm 0,2^{B,a}$	$0,4 \pm 0,2^{A,b}$
Hortelã	$3,6 \pm 0,2^c$	$6,7 \pm 0,5^{A,b}$	$14,7 \pm 1,7^{A,a}$	$0,3 \pm 0,1^b$	$1,5 \pm 0,3^{A,a}$	$1,0 \pm 0,7^{A,a,b}$

Fonte: Própria autoria. Controle: formulação sem adição de extrato; 50: formulação com 50 g de extrato/100g de gelatina; 150: formulação com 150 g de extrato/100g de gelatina. A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos para a mesma concentração de extrato para o mesmo parâmetro. a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes concentrações do mesmo extrato para o mesmo parâmetro. Dados expressos em (média $\pm$ desvio padrão).

Os resultados obtidos demonstram que em concentrações menores (50 g de extratos/100 g de proteína) existe uma alteração da opacidade em relação ao extrato adicionado ($p < 0,05$) (Tabela 17). Entretanto, tal tendência não pode ser observada em maiores concentrações de

extratos. A adição do extrato de folha de pitangueira não influenciou a opacidade. Entretanto, a adição de extratos de guaraná e hortelã provocou um aumento dos valores de opacidade dos filmes. Em geral, filmes com extratos foram menos transparentes do que os filmes controle. Pode dizer que, independentemente dos efeitos estatísticos, os filmes tiveram, no geral, baixa opacidade (opacidade $\leq 1,5$), ou seja, foram muitos transparentes, típico de filmes de gelatina.

Siripatrawan e Harte (2010) constataram que filmes de quitosana sem extrato de chá verde foram mais transparentes (menores valores de opacidades) que os filmes de quitosana acrescidos de extrato de chá verde, este aumento de opacidade também foi reportado por Gómez-Estaca et al. (2009a) em estudo de filmes de gelatina contendo extrato de borragem.

Bonilla e Sobral (2016), em estudo com extratos etanólicos de guaraná acrescidos em filmes de gelatina de porco, determinaram valores de opacidades semelhantes para os filmes controles (0,3) e para os filmes acrescidos com extrato de guaraná (0,4). Igualmente ao constatado por Bonilla e Sobral (2016), a adição de extratos de diferentes fontes vegetais pode acarretar em diferença de opacidade nos filmes, sendo relatados valores entre 0,233 e 0,4 para filmes acrescidos com extratos etanólicos de canela, alecrim, boldo e guaraná (BONILLA; SOBRAL, 2016).

5.3.3 Brilho dos filmes

Os filmes apresentaram valores de brilhos entre 141,2 e 151,2 (Tabela 18) sendo que a adição dos extratos vegetais não afetou brilho dos filmes de gelatina ($p > 0,05$), independente da concentração adicionada.

Em estudo com filmes à base de gelatina de porco, Bonilla e Sobral (2016) determinaram valores de brilhos próximos a 90, inferiores aos obtidos nesta tese. Por outro lado, a incorporação de extratos etanólicos de semente de guaraná em filmes apresentou valores semelhantes aos nossos, com valores de próximos a 150.

Tabela 18 - Brilho de filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais

Extratos vegetais	Brilho (GU) – 60 °		
	Controle	50	150
Pitangueira	148,9 ± 5,8 ^a	149,4 ± 3,8 ^{A,a}	145,7 ± 2,9 ^{A,a}
Guaraná	148,9 ± 5,8 ^a	151,2 ± 1,1 ^{A,a}	150,5 ± 0,8 ^{A,a}
Hortelã	148,9 ± 5,8 ^a	141,2 ± 0,3 ^{B,a}	148,9 ± 1,0 ^{A,a}

Fonte: Própria autoria. Controle: formulação sem adição de extrato; 50: formulação com 50 g de extrato/100g de gelatina; 150: formulação com 150 g de extrato/100g de gelatina. A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos para a mesma concentração de extrato para o mesmo parâmetro. a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes concentrações do mesmo extrato para o mesmo parâmetro. Dados expressos em (média ± desvio padrão).

Bitencourt et al. (2014) relataram que a adição de extrato diminui o brilho dos filmes gelatina de pele de porco tipo A acrescidos com extratos alcoólico de cúrcuma, sendo que, diferentes concentrações de cúrcuma acarretava em diferenças significativas no brilho dos filmes ($p < 0,05$).

5.3.4 Umidade e solubilidade

A umidade dos filmes de gelatinas não sofreu efeito com a adição dos extratos vegetais, permanecendo em torno de $15,4 \pm 0,6 \%$ ($p > 0,05$) (Tabela 19). Os valores de umidades dos filmes estão de acordo com os obtidos por diversos autores utilizando-se a gelatina como matriz (BITENCOURT et al., 2014; THOMAZINE; CARVALHO; SOBRAL, 2006; VALENCIA et al., 2016).

Bitencourt et al. (2014) notaram efeito da concentração de extrato vegetal na matriz biopolimérica sobre a umidade dos filmes em estudo com filmes a base de gelatina de pele de porco incorporados com variações de concentrações de extrato etanólicos de cúrcuma entre 5, 50, 100, 150 e 200 g/100 g de gelatina.

Contrariamente aos resultados obtidos nesta tese, Norajit, Kim, Ryu (2010) notaram uma redução na umidade de filmes de alginato contendo extrato hidroalcoólicos de ginseng. Kanmani e Rhim (2014), avaliando filmes de carragena acrescidos com extratos de sementes

de grapefruit, notaram que diferentes concentrações de extratos acarretaram em diferenças da umidade dos filmes, o que foi atribuído à diferença de hidrofobicidade do extrato em relação a carragena.

Tabela 19 - Umidade e solubilidade de filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais

Extrato vegetal	Solubilidade			Umidade		
		%			%	
	Controle	50	150	Controle	50	150
Pitangueira	42,1 ± 1,7 ^a	44,6 ± 0,1 ^{A,a}	45,5 ± 4,1 ^{A,a}	15,0 ± 0,7 ^{A,a}	15,1 ± 0,7 ^{A,a}	15,4 ± 1,3 ^{A,a}
Guaraná	42,1 ± 1,7 ^a	41,7 ± 3,9 ^{A,a}	45,0 ± 0,7 ^{A,a}	15,0 ± 0,7 ^{A,a}	14,7 ± 1,4 ^{A,a}	16,5 ± 0,7 ^{A,a}
Hortelã	42,1 ± 1,7 ^a	46,7 ± 3,0 ^{A,a}	46,7 ± 1,7 ^{A,a}	15,0 ± 0,7 ^{A,a}	15,9 ± 1,2 ^{A,a}	15,1 ± 0,8 ^{A,a}

Fonte: Própria autoria. Controle: formulação sem adição de extrato; 50: formulação com 50 g de extrato/100g de gelatina; 150: formulação com 150 g de extrato/100g de gelatina. A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos para a mesma concentração de extrato para o mesmo parâmetro. a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes concentrações do mesmo extrato para o mesmo parâmetro. Dados expressos em (média ± desvio padrão).

A solubilidade dos filmes está associada à perda de integridade estrutural dos filmes imersos em água, relacionada às características hidrofóbicas e hidrofílicas dos componentes dos filmes (SOUZA; SOBRAL; MENEGALLI, 2012). Assim como para a umidade, não se pôde notar diferença significativa entre os valores de solubilidade dos filmes produzidos ($p > 0,05$) (Tabela 19), o que comprova que a adição dos extratos estudados não contribuiu para alteração da hidrofobicidade/hidrofílicidade dos filmes de gelatina.

Este comportamento não foi verificado por Bitencourt et al. (2014) em estudo com adição de extrato de cúrcuma em filmes de gelatina, que notaram redução na solubilidade dos filmes e por Gómez-Estaca et al. (2009c) que constataram um aumento na solubilidade em filmes de gelatinas de peixe e bovina quando eram aditivados com acrescidos de orégano e alecrim .

5.3.5 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Pôde-se notar que a adição dos extratos não influenciou a permeabilidade ao vapor de água dos filmes, em todas as concentrações estudadas (Tabela 20). Esses resultados podem ser explicados pelo fato da presença dos extratos não terem alterado nem a interação da água com a matriz de gelatina, o equivalente à solubilidade, e nem a difusividade da água nesse mesmo sistema, uma vez que não houve efeito plastificante, por exemplo.

Tabela 20 - Valores de permeabilidade do vapor de água de filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais

Extratos vegetais	Permeabilidade do vapor de água (PVA) g.mm/h.m ² .kPa		
	Controle	50	150
Pitangueira	0,21 ± 0,05 ^a	0,22 ± 0,02 ^{A,a}	0,26 ± 0,03 ^{A,a}
Guaraná	0,21 ± 0,05 ^a	0,19 ± 0,04 ^{A,a}	0,22 ± 0,04 ^{A,a}
Hortelã	0,21 ± 0,05 ^a	0,22 ± 0,05 ^{A,a}	0,22 ± 0,05 ^{A,a}

Fonte: Própria autoria. Controle: formulação sem adição de extrato; 50: formulação com 50 g de extrato/100g de gelatina; 150: formulação com 150 g de extrato/100g de gelatina. A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos para a mesma concentração de extrato. a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes concentrações do mesmo extrato. Dados expressos em (média ± desvio padrão).

Resultados similares foram obtidos foram por Bonilla e Sobral (2016), que verificaram que a incorporação de extrato etanólico de guaraná em filmes à base de gelatina de pele de porco não acarretou em diferença significativa em comparação aos filmes controles, resultado que manteve-se similar mesmo com a adição de diversas fontes de extratos, como alecrim, canela e boldo.

Similarmente ao observado nesta tese, Gómez-Estaca et al. (2009c) observaram que, a adição de orégano e alecrim em diferentes concentrações de filmes de gelatina bovina e em filmes de gelatina de peixe não resultou em alteração aos valores de permeabilidade ao vapor de água, em relação aos filmes controles sem adição de extratos de plantas. GÓMEZ-ESTACA

et al. (2009b), estudando filmes de gelatina de peixe adicionados de extrato de borragem (*Borago officinalis*), notaram que não houve interferência do extrato nas propriedades de permeabilidade de vapor de água e solubilidade.

Diferentemente ao observado nesta tese, Bitencourt et al. (2014) constataram que a adição de extrato etéreo de cúrcuma provocou diminuição significativa da permeabilidade de vapor de água em filmes à base de gelatina. Entretanto, não houve diferença entre os as diferentes concentrações de extratos estudados.

Avaliando o efeito da concentração de extratos de chá verde em filmes de quitosana Siripatrawan e Harte (2010) constaram que diferentes concentrações de extratos acarretaram em diferenças na propriedade de permeabilidade de vapor de água, principalmente quando eram incorporados ao filme maiores teores de extratos. Os autores atribuíram este efeito ao fato das interações covalentes entre a rede de quitosano e os compostos polifenólicos limitarem a disponibilidade de grupos hidrogênio para formar uma ligação hidrofílica com água, conduzindo subsequentemente a uma diminuição da afinidade do filme de quitosana em relação à água.

5.3.6 Propriedades mecânicas

5.3.6.1 Propriedades mecânicas dos filmes por testes de tração

Observou-se que a adição do extrato não influenciou ($p > 0,05$) nem a tensão na ruptura, nem a deformação, e nem o módulo elástico dos filmes a base gelatina (Tabela 21), independente da concentração utilizada. Muito possivelmente esse comportamento foi devido a não ocorrência de interações química entre os princípios ativos dos extratos e a gelatina (ex.: reticulação), e nem a eventual efeito plastificante pelos extratos.

Tabela 21 - Tensão na ruptura (TR), alongação na ruptura (ER) e módulo de elasticidade (ME) dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais

Extrato vegetal	TR (MPa)			ER (%)			ME (MPa/%)		
	Controle	50	150	Controle	50	150	Controle	50	150
Pitangueira	19,3 ± 4,5 ^a	22,3 ± 3,4 ^{A,a}	19,6 ± 6,0 ^{A,a}	56,8 ± 8,9 ^a	51,7 ± 9,7 ^{A,a}	60,4 ± 8,6 ^{A,a}	3,5 ± 1,5 ^a	4,4 ± 0,5 ^{A,a}	3,1 ± 1,2 ^{A,a}
Guaraná	19,3 ± 4,5 ^a	18,9 ± 1,7 ^{A,a}	20,5 ± 3,1 ^{A,a}	56,8 ± 8,9 ^a	56,0 ± 5,5 ^{A,a}	62,4 ± 4,6 ^{A,a}	3,5 ± 1,5 ^a	3,1 ± 0,2 ^{B,a}	3,0 ± 0,2 ^{A,a}
Hortelã	19,3 ± 4,5 ^a	18,0 ± 1,4 ^{A,a}	20,6 ± 1,3 ^{A,a}	56,8 ± 8,9 ^a	50,2 ± 2,9 ^{A,a}	60,1 ± 1,9 ^{A,a}	3,5 ± 1,5 ^a	3,3 ± 0,3 ^{B,a}	3,1 ± 0,2 ^{A,a}

Fonte: Própria autoria. Controle: formulação sem adição de extrato; 50: formulação com 50 g de extrato/100g de gelatina; 150: formulação com 150 g de extrato/100g de gelatina. A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos para a mesma concentração de extrato para o mesmo parâmetro. a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes concentrações do mesmo extrato para o mesmo parâmetro. Dados expressos em (média ± desvio padrão).

Bitencourt et al. (2014), avaliando o acréscimo de extrato etanólico de cúrcuma em filmes de gelatina de porco acrescidos com extrato de cúrcuma, observaram um aumento significativo de tensão e alongação quando concentrações acima de 50 g de extrato/100 g de gelatina eram adicionadas. Este comportamento foi atribuído às interações entre os compostos fenólicos presentes no extrato com a gelatina, que pode ter contribuído para formação de matrizes mais coesas e flexíveis. Para a ME os autores observaram um decréscimo do valor, sendo significativo em elevadas concentrações de extrato (BITENCOURT et al, 2014). Siripatrawan e Harte (2010) estudando filmes de quitosana acrescidos de extrato de chá verde variando concentração de extrato de 2 a 20 g de extrato/ 100 g de solução filmogênica, também obtiveram incremento da tensão e uma diminuição da alongação quando adicionaram concentrações acima de 5 g de extrato/ 100 g de solução filmogênica, mesma tendência observada por Gutiérrez et al. (2012) em filmes de carboximetilcelulose/ montmorilonita acrescidos com folha de murta.

5.3.6.2 Propriedades mecânicas dos filmes por testes de perfuração

De maneira similar ao observado nos testes de tração, as propriedades mecânicas determinadas nos testes de perfuração não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre o filme controles e os filmes produzidos com extratos vegetais (Tabela 22), independente da concentração de extratos adicionada, tanto para os valores de força quanto nos valores de deformação. As explicações para esse comportamento seriam idênticas ao apresentado para as propriedades mecânicas por testes de tração.

Gómez-Guillén et al. (2007) constataram que a incorporação de extratos obtidos de folhas de murta de dois tipos (Soloyo chico (SC) e Soloyo grande (SG)) em filmes de gelatina de peixe acarretava em uma diminuição da força de perfuração de 53% e 74% na deformação, quando adicionado a murta tipo SC em relação ao controle. Entretanto, não foi verificado alteração das propriedades mecânicas por perfuração quando adicionada a SG (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2007).

Tabela 22 - Valores da força na perfuração (FP), deformação na perfuração (DP) dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais

Extrato vegetal	FP (N)			DP (%)		
	Controle	50	150	Controle	50	150
Pitangueira	14,5 ± 3,3 ^a	14,0 ± 1,3 ^{A,a}	17,3 ± 2,7 ^{A,a}	5,4 ± 1,5 ^a	6,0 ± 0,7 ^{A,a}	6,5 ± 1,5 ^{A,a}
Guaraná	14,5 ± 3,3 ^a	13,7 ± 3,5 ^{A,a}	14,5 ± 2,1 ^{A,a}	5,4 ± 1,5 ^a	7,9 ± 2,8 ^{A,a}	6,2 ± 3,2 ^{A,a}
Hortelã	14,5 ± 3,3 ^a	15,6 ± 2,5 ^{A,a}	14,2 ± 2,4 ^{A,a}	5,4 ± 1,5 ^a	5,3 ± 1,1 ^{A,a}	7,9 ± 2,3 ^{A,a}

Fonte: Própria autoria. Controle: formulação sem adição de extrato; 50: formulação com 50 g de extrato/100g de gelatina; 150: formulação com 150 g de extrato/100g de gelatina. A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos para a mesma concentração de extrato para o mesmo parâmetro. a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes concentrações do mesmo extrato para o mesmo parâmetro. Dados expressos em (média ± desvio padrão).

Kanatt et al. (2012) em estudos com a incorporação de extratos de menta (*Mentha spicata* L.) e extrato de casca de romã em filmes a base de quitosana e poli (vinil álcool) (PVA), observaram que a adição dos extratos não afetou a força na perfuração dos filmes.

5.3.7 Microestrutura dos filmes

5.3.7.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As superfícies dos filmes, tanto a de contato com a placa, bem como a de secagem, ou seja, aquela em contato com o ar, apresentaram superfícies homogêneas, sem a presença de rugosidade ou poros, independente da adição dos extratos (Figura 21, 22, 23). Isto indica que não houve alteração da estrutura de rede homogênea da filmes de gelatina. Para filmes de gelatina plastificados com glicerol este aspecto é esperado devido a presença de fase ordenada e estrutura de rede homogênea (CARVALHO; GROSSO, 2004; BODINI et al., 2013; CAO; FU; HE, 2007).

Norajit, Kim e Ryu (2010) notaram que em filmes contendo extrato de ginseng, a adição do extrato provocou uma heterogeneidade, com aparecimento de poros nos filmes estudados. A este atributo os autores correlacionaram a diferença de permeabilidade de vapor de água entre os filmes. Este resultado corrobora com os resultados encontrados por este estudo, que demonstraram que a adição de extrato não contribuiu para a alteração da permeabilidade do vapor de água dos filmes (NORAJIT; KIM; RYU, 2010).

Gómez-Guillén et al. (2007), estudando a incorporação de extratos obtidos de folhas de murta de dois tipos (Soloyo chico e Soloyo grande) em filmes de gelatina de peixe, notaram que o acréscimo do extrato vegetal afetou a microestrutura dos filmes de gelatina de peixe. Os filmes acrescidos com o extrato de Soloyo chico apresentou estrutura mais compacta e difusa, contudo o extrato obtido da espécie Soloyo grande apresentou uma estrutura mais granular, semelhante aos filmes controles. A este efeito foi atribuída a diferença na composição de polifenóis entre os extratos (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2007).

A seção transversal dos filmes, similarmente, apresentou uma superfície lisa, homogênea e compacta (Figuras 21c e 24). Este resultado foi igualmente obtido por Norajit, Kim e Ryu (2010) em estudo com a adição de extrato de ginseng em filmes de alginato.

Figura 21 - Microscopias da superfície dos filmes de gelatina sem adição de extrato vegetal

Onde : (a) em contato com a placa (b) em contato com o ar (c) superfície interna obtida por criofatura

Figura 22 - Microscopia da superfície dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais em contato com a placa

Onde (a) filmes com 50 g de extrato de pitangueira /100 g de gelatina (b) filmes com 150 g de extrato de pitangueira /100 g de gelatina (c) filmes com 50 g de extrato de guaraná /100 g de gelatina (d) filmes com 150 g de extrato de guaraná /100 g de gelatina (e) filmes com 50 g de extrato de hortelã /100 g de gelatina (f) filmes com 150 g de extrato de hortelã /100 g de gelatina.

Figura 23 - Microscopia da superfície dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais em contato com o ar

Onde (a) filmes com 50 g de extrato de pitangueira /100 g de gelatina (b) filmes com 150 g de extrato de pitangueira /100 g de gelatina (c) filmes com 50 g de extrato de guaraná /100 g de gelatina (d) filmes com 150 g de extrato de guaraná /100 g de gelatina (e) filmes com 50 g de extrato de hortelã /100 g de gelatina (f) filmes com 150 g de extrato de hortelã /100 g de gelatina.

Figura 24 - Microscopia superfície interna dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais, criofaturadas.

Onde (a) filmes com 50 g de extrato de pitangueira /100 g de gelatina (b) filmes com 150 g de extrato de pitangueira /100 g de gelatina (c) filmes com 50 g de extrato de guaraná /100 g de gelatina (d) filmes com 150 g de extrato de guaraná /100 g de gelatina (e) filmes com 50 g de extrato de hortelã /100 g de gelatina (f) filmes com 150 g de extrato de hortelã /100 g de gelatina.

5.3.7.2 Microscopia de força atômica

A topografia da superfície dos filmes de gelatina sem adição de extrato pode ser visualizada na Tabela 23. A Figura 28a mostra a superfície escaneada em 2D, e demonstra uma boa integridade do filme. A Figura 28b mostra a visão 3D da superfície do filme controle, que demonstra a presença de pequenos picos ao longo do filme.

A rugosidade do filme de gelatina foi 3 nm, valores inferiores aos obtidos por Flaker et al (2015) (4 nm). Um aumento significativo ($p < 0,05$) na rugosidade pode ser observado após a adição de extratos de folhas de pitangueira, aumentando de 3 nm para 5 nm. A adição dos demais extratos não interferiram na rugosidade dos filmes, sendo similar aos dos filmes controles. Para a rugosidade média quadrática não houve diferença entre os filmes acrescidos com o extrato, tendência que permaneceu, independente do extrato e da concentração adicionada.

Kadam et al. (2015), estudando filmes com quitosana, verificaram que a adição de extrato aquosos de bagaço de uva acarretou em um filme mais homogêneo em relação ao filme controle. Os autores atribuíram à diminuição da rugosidade, a formação de uma rede com a matriz quando adicionados os polissacarídeos e polifenóis presentes no extrato.

Tabela 23 – Rugosidade dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais

Extrato vegetal	R _m (nm)			R _q (nm)		
	Controle	50	150	Controle	50	150
Pitangueira	3 ± 1 ^b	4 ± 1 ^{A,a,b}	5 ± 1 ^{A,a}	2 ± 1 ^a	3 ± 0 ^{A,a}	3 ± 0 ^{A,a}
Guaraná	3 ± 1 ^a	3 ± 1 ^{A,a}	4 ± 1 ^{A,B,a}	2 ± 1 ^a	2 ± 1 ^{A,a}	2 ± 1 ^{A,a}
Hortelã	3 ± 1 ^a	5 ± 1 ^{A,a}	3 ± 1 ^{B,a}	2 ± 1 ^a	2 ± 0 ^{A,a}	2 ± 0 ^{A,a}

Fonte: Própria autoria. Controle: formulação sem adição de extrato; 50: formulação com 50 g de extrato/100g de gelatina; 150: formulação com 150 g de extrato/100g de gelatina. R_m: rugosidade média, R_q: rugosidade quadrática média. A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos para a mesma concentração de extrato para o mesmo parâmetro. a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para as diferentes concentrações do mesmo extrato para o mesmo parâmetro. Dados expressos em (média ± desvio padrão).

Figura 25 - Microscopia de força atômica das superfícies 2 D (A) e 3D (B) do filme de gelatina sem adição de extrato vegetal

Figura 26 - Microscopia de força atômica das superfícies dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extrato vegetal

5.3.8 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR demonstraram que a adição extratos vegetais não afetou o espectro dos filmes de gelatina, ou seja, os filmes controles e os filmes com extratos demonstraram semelhança nos principais picos (Figura 27). A banda de amida A situada 3290 cm^{-1} representa o estiramento de N-H e a banda 2938 cm^{-1} (amida-B) é característica da vibração assimétrica de estiramento C-H (HOQUE; BENJAKUL; PRODPRAN, 2011; TONGNUANCHAN; BENJAKUL; PRODPRAN, 2013).

Figura 27 – Espectros de FTIR de filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais

Onde Controle: formulação sem adição de extrato; 50P: formulação com 50 g de extrato de folha de pitanga/100g de gelatina; 150P: formulação com 150 g de extrato de folha de pitanga/100g de gelatina. 50G: formulação com 50 g de extrato de guaraná/100g de gelatina; 150P: formulação com 150 g de extrato de guaraná /100g de gelatina. 50H: formulação com 50 g de extrato de hortelã/100g de gelatina; 150P: formulação com 150 g de extrato de hortelã/100g de gelatina. Fonte: Própria autoria

As bandas de 1633 e 1549 cm^{-1} correspondem a amida I e amida II, respectivamente. A amida I decorre de estiramento de C-O de proteínas de amida e a amida II surge de grupos N-H vibracionais e vibrações de estiramento de C-N grupos (JRIDI et al., 2014). A presença característica do pico 1238 cm^{-1} (Amida-III) representando as vibrações no plano de grupos C-

N e N-H de amida ligada ou vibrações de grupos CH₂ de glicina pode ser verificada em todas as formulações (BONILLA; SOBRAL, 2016; HOQUE; BENJAKUL; PRODPRAN, 2011). O pico situado em torno de 1043 cm⁻¹ pode estar relacionado com as interações que surgem entre plastificante (grupo OH de glicerol) e estrutura de filme (HOQUE; BENJAKUL; PRODPRAN, 2011).

5.3.9 Propriedade de barreira luz/UV

As propriedades de barreira à luz/UV dos filmes foram estudadas submetendo os filmes a uma varredura espectrométrica a comprimentos de onda que variaram entre 800 nm e 200 nm, sendo a transmitância de luz percentual obtida. Observou-se (Figura 28) uma baixa transmissão de luz na gama de UV entre 200 e 250 nm para os filmes de gelatina controles, resultados condizentes com dados encontrados na literatura para gelatina de porco (BITENCOURT et al., 2014) e gelatina de peixe e bovina (JONGJAREONRAK et al., 2008).

Os filmes de gelatina sem extratos apresentaram valores de transmitância cerca de 70% no comprimento de onda de 300 nm, com a adição dos extratos de guaraná e hortelã a transmitância diminuía quanto maior o valor do extrato, entretanto para filmes com extrato de pitangueira, houve pouca diferença entre os filmes controles. Estes resultados sugerem que filmes com extratos aquosos de guaraná e hortelã podem possuir boas propriedades de barreira à luz ultravioleta, o que contribuiria para sua atividade antioxidante, visto que a melhora na propriedade de barreira à luz/UV dos filmes é uma ferramenta para combater a oxidação lipídica. Estes atributos de barreira de luz são em parte atribuíveis à composição de polifenol dos extratos adicionados aos filmes (GÓMEZ-ESTACA et al., 2009a). Em estudo com gelatina de porco incorporadas com extratos de alecrim, boldo, guaraná e canela, Bonilla e Sobral (2016) demonstraram uma melhor propriedade de barreira quando a matriz era incorporada com extrato de guaraná, corroborando com nosso estudo que demonstrou menores valores de transmitância quando o filme era acrescido de guaraná.

Figura 28 – Espectros no UV/Visível dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais

Onde Controle: formulação sem adição de extrato; 50P: formulação com 50 g de extrato de folha de pitanga/100g de gelatina; 150P: formulação com 150 g de extrato de folha de pitanga/100g de gelatina. 50G: formulação com 50 g de extrato de guaraná/100g de gelatina; 150P: formulação com 150 g de extrato de guaraná /100g de gelatina. 50H: formulação com 50 g de extrato de hortelã/100g de gelatina; 150P: formulação com 150 g de extrato de hortelã/100g de gelatina. Fonte: Própria autoria

Estes resultados estão em concordância com estudos anteriores utilizando extratos vegetais. Gómez-Guillén et al. (2007) estudando filmes de gelatina com extratos de murta, Bitencourt et al. (2014) avaliando filmes de gelatina de porco acrescidos com extratos de cúrcuma, Gómez-Estaca et al. (2009a) estudando filmes de gelatina bovina e de peixe incorporados com extratos de orégano e alecrim. Os autores demonstraram melhoria as propriedade de barreira dos filmes quando incorporaram extratos vegetais a matriz polimérica.

Hoque, Benjakul e Prodpran (2011) observaram que em filmes de gelatina de peixe acrescidos de extratos hidroetanólicos de canela, cravo e anis, houve diminuição da transparência dos filmes em relação aos filmes controles, entretanto, entre os filmes acrescidos com extratos não houve diferença significativa. A alteração das propriedades de barreiras e de transparência foram atribuídas a presença de pigmentos nos extratos, que alteram a cor, transparência bem como a aparência final dos filmes de gelatina (HOQUE; BENJAKUL; PRODPRAN, 2011).

5.3.10 Temperatura de transição vítrea

Os termogramas de temperaturas de transição vítrea obtidos por calorimetria diferencial de varredura dos filmes de gelatina controle ou incorporados com extratos aquosos vegetais são ilustrados na Figura 29.

Uma transição vítrea (T_g) seguida de um pico endotérmico devido a transição helix-coil (T_m) aparece nas curvas de DSC de primeira varredura (Figura 29). Para a primeira transição, não existe diferença na T_g entre o filme controle e os filmes incorporados com extrato (SOBRAL et al., 2001; VANIN et al., 2005). Curvas similares foram obtidas em filmes de gelatina utilizando-se o glicerol como plastificante (CARVALHO; GROSSO, 2004; VALENCIA et al., 2016).

Figura 29 - Exemplos de termogramas para os filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais

Onde: linhas contínuas (—) representam a 1ª varredura e linhas pontilhadas (---) representam a 2ª varredura. — filme controle (formulação sem adição de extrato) —: 50 g de extrato de folha de pitanga/100g de gelatina; —: 150 g de extrato de folha de pitanga/100g de gelatina. —: 50 g de extrato de guaraná/100g de gelatina; —: 150 g de extrato de guaraná /100g de gelatina. —: 50 g de extrato de hortelã/100g de gelatina; —: 150 g de extrato de hortelã/100g de gelatina. Fonte: Própria autoria

Para a primeira varredura não existe diferença na Tg entre o filme controle e os filmes incorporados com extrato de hortelã e folha de pitangueira (Tabela 27). Para o filme acrescidos com extratos de guaraná pode-se notar uma diminuição da temperatura com o aumento da concentração de extrato. As Tg dos filmes produzidos com diferentes extratos não apresentou diferenças entre si.

Tabela 24 – Resultados das análises térmicas dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais

		Parâmetros		
		Controle	50	150
Varredura 1	Tg (°C)			
	Pitangueira	63,1 ± 0,7 ^a	59,2 ± 1,3 ^{A,a}	60,8 ± 3,5 ^{A,a}
	Guaraná	63,1 ± 0,7 ^a	61,4 ± 1,0 ^{A,a}	56,6 ± 2,0 ^{A,b}
	Hortelã	63,1 ± 0,7 ^a	62,1 ± 3,3 ^{A,a}	59,4 ± 2,7 ^{A,a}
	Tm (°C)			
	Pitangueira	106,2 ± 2,9 ^a	105,0 ± 2,7 ^{A,a}	104,8 ± 4,6 ^{A,a}
	Guaraná	106,2 ± 2,9 ^a	105,5 ± 0,5 ^{A,a}	102,5 ± 2,5 ^{A,a}
	Hortelã	106,2 ± 2,9 ^a	105,0 ± 3,2 ^{A,a}	101,3 ± 1,1 ^{A,a}
	ΔH (J/g macromoléculas)			
	Pitangueira	23,9 ± 1,0 ^a	24,3 ± 0,6 ^{A,a}	24,6 ± 0,3 ^{A,a}
Varredura 2	Guaraná	23,9 ± 1,0 ^a	24,2 ± 1,0 ^{A,a}	24,3 ± 0,8 ^{A,a}
	Hortelã	23,9 ± 1,0 ^a	25,0 ± 1,1 ^{A,a}	24,4 ± 1,2 ^{A,a}
	Tg (°C)			
	Pitangueira	63,0 ± 4,3 ^a	59,8 ± 2,5 ^{A,a}	57,8 ± 7,0 ^{A,a}
	Guaraná	63,0 ± 4,3 ^a	60,7 ± 2,2 ^{A,a}	55,5 ± 2,6 ^{A,a}
	Hortelã	63,0 ± 4,3 ^b	58,8 ± 4,6 ^{A,a,b}	52,0 ± 2,7 ^{A,a}

Fonte: Própria autoria. Controle: formulação sem adição de extrato; 50: formulação com 50 g de extrato/100g de gelatina; 150: formulação com 150 g de extrato/100g de gelatina. A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos para a mesma concentração de extrato. a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes concentrações do mesmo extrato. Dados expressos em (média ± desvio padrão).

A temperatura de fusão (T_m) e a entalpia (ΔH) não sofreram alteração tanto em relação ao tipos de extrato adicionado, quanto em relação a concentração utilizada, se mantendo em torno de $104,3 \pm 1,8$ °C e $24,4 \pm 0,3$ J/g, respectivamente.

Na segunda varredura, apenas a transição vítrea pode ser observada na curva. O desaparecimento dos picos endotérmicos na segunda varredura é um fato esperado, considerando que a transição hélix-coil é uma transição de primeira de ordem e o caráter cinética. O aquecimento da região do cristalino e a gelatina comporta-se como um plástico fundido disperso molecularmente. Com o arrefecimento criogénico, a amostra torna-se imobilizada numa forma puramente amorfo. Em outras palavras, a formação das junções entre as macromoléculas adjacentes não ocorrem, provocando o desaparecimento da transição hélix-coil. Desta forma os traços de DSC obtidos na primeira varredura corresponde ao que os polímeros parcialmente cristalinos, enquanto os da segunda varredura são característicos de polímeros completamente amorfo (SOBRAL; HABITANTE, 2001).

A adição dos extratos de guaraná e folhas de pitangueira não ocasionou em nenhuma alteração nas propriedades térmicas dos filmes, entretanto uma diminuição da T_g da segunda varredura ocorreu quando foi acrescentado o extrato de hortelã em altas concentrações. Avaliando a diferença entre os extratos em uma mesma concentração não se notou efeito significativo dos extratos adicionados.

Rattaya; Benjakul; Prodpran (2009), estudando filmes de gelatina incorporados com água marinha (pH 10), notaram que os filmes com extratos apresentaram valores T_{max} maiores q os filmes controles, bem como menores valores de entalpia. Esses autores atribuíram este efeito ao fato do extrato contribuir com uma menor mobilidade dos filmes.

5.3.11 Análises de Atividade Antioxidante e Capacidade Redutora dos filmes

5.3.11.1 Método da captura do radical DPPH

A atividade antioxidante dos filmes medida com o método de captura do radical DPPH dos filmes produzidos com extrato de folha de pitangueira apresentaram as maiores atividades antioxidantes (Tabela 25). Para os filmes produzidos com o extrato de folha de pitangueira e

guaraná, houve um aumento da atividade antioxidante em relação ao filme controle, em todas as concentrações estudadas. Para o extrato de hortelã, a adição deste ao filme só contribuiu com a produção de filmes ativos, quando maiores concentrações de extratos foram adicionadas ao filme.

Tabela 25 - Atividade antioxidante dos filmes de gelatinas com diferentes concentrações de extratos vegetais obtidas pelo método de captura do radical DPPH.

Extratos vegetais	Capacidade antioxidante mg de trolox/ 100 g de filme		
	Controle	50	150
Pitangueira	9,1 ± 2,0 ^b	34,6 ± 8,3 ^{A,a,b}	44,6 ± 17,4 ^{A,a}
Guaraná	9,1 ± 2,0 ^c	20,2 ± 3,12 ^{B,b}	26,0 ± 6,0 ^{A,a}
Hortelã	9,1 ± 2,0 ^b	11,3 ± 4,0 ^{B,b}	24,7 ± 7,2 ^{A,a,b}

Fonte: Própria autoria. Controle: formulação sem adição de extrato; 50: formulação com 50 g de extrato/100g de gelatina; 150: formulação com 150 g de extrato/100g de gelatina. A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos para a mesma concentração de extrato. a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes concentrações do mesmo extrato. Dados expressos em (média ± desvio padrão).

Bitencourt et al. (2014) observaram que em filmes à base de gelatina de peixe, houve um incremento quando se adicionou extrato etanólico de cúrcuma, este incremento da mesma forma que este estudo, foi proporcional ao aumento da concentração de extrato adicionada (BITENCOURT et al., 2014). Aumento da atividade antioxidante com a adição de compostos naturais a filmes também foi observado por Moradi et al. (2012) em filmes de quitosano com óleo essencial de *Zataria multiflora* Boiss e extrato de semente de uva e por Tongnuanchan, Benjakul e Prodpran (2013) em estudo com filmes à base de gelatina de peixe acrescidos com extrato de óleo essencial de raiz de gengibre e raiz de cúrcuma.

5.3.11.1 Método da captura do radical ABTS

Os filmes de gelatina sem extratos tiveram alguma atividade antioxidante (Tabela 26) este dado está de acordo com os obtidos com Gómez-Estaca et al. (2009a), que obtiveram resultados semelhantes com a gelatina de peixe. Os filmes com extratos vegetais tiveram um aumento na capacidade antioxidante, mais pronunciado em maiores concentrações de extratos por filme.

Tabela 26 - Atividade antioxidante dos filmes de gelatinas com diferentes concentrações de extratos vegetais obtidas pelo método de captura do radical ABTS.

Extratos vegetais	Capacidade antioxidante mg de trolox/100 g de filme		
	Controle	50	150
Pitangueira	$0,20 \pm 0,09^b$	$0,57 \pm 0,23^{A,a,b}$	$1,00 \pm 0,39^{A,a}$
Guaraná	$0,20 \pm 0,09^c$	$0,47 \pm 0,02^{A,b}$	$0,85 \pm 0,12^{A,a}$
Hortelã	$0,20 \pm 0,09^b$	$0,35 \pm 0,12^{A,a,b}$	$0,55 \pm 0,26^{A,a}$

Fonte: Própria autoria. Controle: formulação sem adição de extrato; 50: formulação com 50 g de extrato/100g de gelatina; 150: formulação com 150 g de extrato/100g de gelatina. A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos para a mesma concentração de extrato. a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes concentrações do mesmo extrato. Dados expressos em (média $\pm$ desvio padrão).

O aumento da atividade antioxidante com o aumento da concentração de extratos foi igualmente relatado por Bitencourt et al. (2014) em filmes de gelatina suína acrescidos com extrato etanólico de cúrcuma, por Gómez-Estaca et al. (2009a) em filmes de gelatina de peixe acrescidos de orégano e alecrim e por Gómez-Estaca et al. (2009b) em filmes de gelatina de peixe acrescidos extrato de boragem.

5.3.11.2 Capacidade redutora dos filmes

Os filmes produzidos com extratos de folha de pitangueira apresentaram as maiores capacidades redutora (Tabela 27), corroborando com os resultados mostrados de capacidade redutora dos extratos (Tabela 10), onde se observou que, para os extratos produzidos a 60 °C, a folha de pitangueira apresentou maior capacidade redutora.

Para os filmes produzidos com o extrato de folha de pitangueira e guaraná, houve um aumento da capacidade redutora em relação ao filme controle, em todas as concentrações estudadas. Entretanto para os filmes produzidos com extrato de hortelã apenas pode se notar aumento quando maiores concentrações de extrato foram adicionadas. Efeito similar ao obtido na análise de captura do radical DPPH

Tabela 27 - Capacidade redutora total dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de extratos vegetais

Extratos vegetais	Capacidade redutora mg de ácido gálico/ g de filme		
	Controle	50	150
Pitangueira	1,8 ± 0,0 ^c	3,4 ± 0,1 ^{A,b}	11,3 ± 0,7 ^{A,a}
Guaraná	1,8 ± 0,0 ^c	2,3 ± 0,1 ^{B,b}	3,5 ± 0,0 ^{B,a}
Hortelã	1,8 ± 0,0 ^b	2,0 ± 0,2 ^{B,b}	2,9 ± 0,3 ^{B,a}

Fonte: Própria autoria. Controle: formulação sem adição de extrato; 50: formulação com 50 g de extrato/100g de gelatina; 150: formulação com 150 g de extrato/100g de gelatina. A,B letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos para a mesma concentração de extrato. a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para a diferentes concentrações do mesmo extrato. Dados expressos em (média ± desvio padrão).

O aumento da capacidade redutora, com aumento da concentração de compostos bioativos, foi igualmente relatada em outros estudos encontrados na literatura. Bodini et al. (2013) notaram uma mudança significativa do poder redutor dos filmes de gelatina, quando estes eram acrescidos de concentrações de extrato etanólico de própolis maiores que 40 g de extrato/100 g de gelatina. Em estudo com chitosana acrescidos de extrato de chá verde, Siripatrawan e Harte (2010), variando concentração de extrato de 2 a 20 g de extrato/ 100 g de

solução filmogénica, também obtiveram incremento do conteúdo fenólico com o aumento da concentração de extrato.

6 Conclusão

Os extratos vegetais ganharam vasto interesse nos últimos tempos devido a atual tendência mercadológica de busca por produtos naturais pelos consumidores.

Este estudo demonstrou que os extratos vegetais de folha de pitangueira, hortelã, folha de amoreira, carqueja e semente de guaraná podem ser utilizados como fonte bioativa, sendo uma alternativa aos antioxidantes sintéticos. Os extratos de folha de pitangueira, guaraná e hortelã apresentaram melhores atividades antioxidantes e redutoras. Os extratos que demonstram melhores atividades antioxidantes foram obtidos a temperatura de extração de 60 °C. As demais características dos extratos de forma geral não foram afetadas com a diferença de temperatura de extração, havendo efeito sobre o teor de sólidos solúveis, matéria seca e cor.

Em relação aos filmes produzidos com gelatinas e incorporados com extratos de folhas de pitanga, guaraná e hortelã, extraídos a 60 °C, os filmes com adição do composto bioativo apresentaram melhoria nas propriedades mecânicas (tração e perfuração), umidade, solubilidade e propriedades térmicas tanto em relação aos filmes controles, independente das concentrações utilizadas. A análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier apontou que não houve aparecimento de novas ligações, independente do extrato adicionado.

Os filmes se mostraram lisos e homogêneos pela análise de microscopia de varredura. A análise de brilho demonstrou que estes se mantiveram brilhantes apesar de uma pequena alteração quando os extratos eram adicionados. A cor do filme foi influenciada pela coloração dos extratos, afetando assim os parâmetros L^* , a^* e b^* dos filmes, a adição de extratos vegetais produziu filmes mais escuros e mais amarelados que os filmes controles.

Apesar de não ter alterado as propriedades físicas dos filmes, os filmes com adição de extrato apresentaram um aumento na capacidade redutora, antioxidantes e propriedades de barreira dos filmes em relação aos filmes controles, podendo ser utilizado como filmes bioativos.

7 Referências Bibliográficas

- ABDEL-WARETH, A.A.A.; LOHAKARE, J.D. Effect of dietary supplementation of peppermint on performance, egg quality, and serum metabolic profile of Hy-Line Brown hens during the late laying period. **Animal Feed Science and Technology**. Amsterdam: v. 197, p. 114–120, 2014.
- AKHTAR, M.J. et al. Antioxidant capacity and light-aging study of HPMC films functionalized with natural plant extract. **Carbohydrate Polymers**. Barking: v. 89, n. 4, p. 1150–1158, 2012.
- AGUIAR, J.P.L. Tabela de composição de alimentos da Amazônia. **Acta Amazonica**. Manaus: v. 26, p. 121–126, 1996.
- AMORIM, A.C.L et al. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **Phytomedicine : International journal of phytotherapy and phytopharmacology**. Muenchen v. 16, n. 10, p. 923–928, 2009.
- ANDRADE, C.A. et al. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. São Paulo v. 17, n. 2, p. 231–235, 2007.
- ANDREUCCETTI, C. et al. Effect of surfactants on the functional properties of gelatin-based edible films. **Journal of Food Engineering**. Essex: v. 103, n. 2, p. 129–136, 2011.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)**. São Paulo: v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.
- AREIAS, F.M et al. Phenolic fingerprint of peppermint leaves. **Food Chemistry**. Londres: v. 73, n. 3, p. 307–311, 2001.
- ARSLAN, D; ÖZCAN, M.M.; MENGEŞ, H. O. Evaluation of drying methods with respect to drying parameters, some nutritional and colour characteristics of peppermint (*Mentha x piperita* L.). **Energy Conversion and Management** Amsterdam: v. 51, n. 12, p. 2769–2775, 2010.
- ASTM. American Society for Testing Materials. Standard test method for water vapor transmission of materials. **Annual book of ASTM standards**. Designation E96/96M. Philadelphia: American Society for Testing Materials, 2010a.
- ASTM. Standard practice for calculation of color tolerances and color differences from instrumentally measured color coordinates. **Annual book of ASTM standards**. Designation D2244 – 11. Philadelphia: American Society for Testing Materials, 2011.

- ASTM. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. **Annual book of ASTM standards**. Designation D882-10. Philadelphia: American Society for Testing Materials, 2010b.
- BASILE, A. et al. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**. Shannon: v. 102, n. 1, p. 32–36, 2005.
- BERGO, P.; SOBRAL, P.J.A.; Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. **Food Hydrocolloids**. Oxford: v. 21 p. 1285–1289, 2007.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**. Campinas : v. 12, n. 2, p. 123–130 , 1999.
- BILBAO-SÁINZ, C. et al. Composite edible films based on hydroxypropyl methylcellulose reinforced with microcrystalline cellulose nanoparticles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton: v. 58, n. 6, p. 3753–3760, 2010.
- BIMAKR, M. et al. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. **Food and Bioproducts Processing**. Rugby: v. 89, n. 1, p. 67–72, 2011.
- BISWAS, A.K.; CHATLI, M.K.; SAHOO, J. Antioxidant potential of curry (*Murraya koenigii* L.) and mint (*Mentha spicata*) leaf extracts and their effect on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigeration storage. **Food Chemistry**. Londres: v. 133, n. 2, p. 467–472, 2012.
- BITENCOURT, C.M. et al. Food Hydrocolloids Gelatin-based films additivated with curcuma ethanol extract: Antioxidant activity and physical properties of films. **Food Hydrocolloids**. Oxford: v. 40, p. 145–152, 2014.
- BODINI, R.B. et al. Properties of gelatin-based films with added ethanol–propolis extract. **LWT - Food Science and Technology**. Londres: v. 51, n. 1, p. 104–110, 2013.
- BONILLA, J; SOBRAL, P.J.A. Investigation of the physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts. **Food Bioscience**, Amsterdam: v. 16, p. 17–25, 2016.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**. Londres: v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- CAO, N; FU, Y; HE, J. Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. **Food Hydrocolloids**. Oxford: v. 21, n. 4, p. 575–584, 2007.

- CAMO, J. et al. Display life of beef packaged with an antioxidant active film as a function of the concentration of oregano extract. **Meat Science**. Amsterdam: v. 88, n. 1, p. 174–178, 2011.
- CARVALHO, R.A; GROSSO, C.R.F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. **Food Hydrocolloids**. Oxford: v. 18, n. 5, p. 717–726, 2004.
- CARVALHO, R.A. et al. Development of edible films based on differently processed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) skin gelatin. **Food Hydrocolloids**. Oxford: v. 22, n. 6, p. 1117–1123, 2008.
- CELLI, G.B.; PEREIRA-NETTO, A.B.; BETA, T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. **Food Research International**. Kidlington: v. 44, n. 8, p. 2442–2451, 2011.
- CHAUHAN, R.S. et al. Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIIM(J)26] from North-West Himalayan region, India. **Industrial Crops and Products**. Amsterdam: v. 29, n. 2-3, p. 654–656, 2009.
- CHOUDHURY, R.P.; KUMAR, A; GARG, A.N. Analysis of Indian mint (*Mentha spicata*) for essential, trace and toxic elements and its antioxidant behaviour. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Oxford: v. 41, n. 3, p. 825–32, 2006.
- COPPOLA, M.; DJABOUROV, M.; FERRAND, M. Unified phase diagram of gelatin films plasticized by hydrogen bonded liquids. **Polymer**. Londres: v. 53, n. 7, p. 1483–1493, 2012.
- DALONSO, N.; PETKOWICZ, C.L.O. Guarana powder polysaccharides: characterisation and evaluation of the antioxidant activity of a pectic fraction. **Food Chemistry**. Londres: v. 134, n. 4, p. 1804–1812, 2012.
- DELGADO-ADÁMEZ, J. et al. In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera* L.). **Food Control**. Guildford: v. 24, n. 1-2, p. 136–141, 2012a.
- DELGADO-ADÁMEZ, J. et al. In vitro assays of the antibacterial and antioxidant activity of aqueous leaf extracts from different *Prunus salicina* Lindl. cultivars. **Food and Chemical Toxicology**. Oxford: v. 50, n. 7, p. 2481–6, 2012b.
- DIAS, L.F.T. et al. Atividades antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. São Paulo: v. 19, n. 1b, p. 309–314, 2009.

- DORMAN, H.J.D. et al. Phenolic profile and antioxidant evaluation of *Mentha x piperita* L. (peppermint) extracts. **Natural Product Communications**. Westerville : v. 4, n. 4, p. 535–542 , 2009.
- DORMAN, H.J.D. et al. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton: v. 51, n. 16, p. 4563–4569, 2003.
- DUAN, Rui et al. Study on the properties of gelatins from skin of carp (*Cyprinus carpio*) caught in winter and summer season. **Food Hydrocolloids**. Oxford: v. 25, n. 3, p. 368–373, 2011.
- EMBUSCADO, M.E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of Functional Foods**. Amsterdam: v. 18, p. 811–819, 2015.
- ERCISLI, S.; ORHAN, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chemistry**. Amsterdam: v. 103, n. 4, p. 1380–1384, 2007.
- ETXABIDE, A et al. Development of active gelatin films by means of valorization of food processing waste: A review. **Food Hydrocolloids**. Oxford: in press, p. 1–7, 2016.
- FANG, J.M. et al. Development of biodegradable laminate films derived from naturally occurring carbohydrate polymers. **Carbohydrate Polymers**. Barking: v. 60, n. 1, p. 39–42, 2005.
- FARNAD, N.; HEIDARI, R.; ASIANPOUR, B. Phenolic composition and comparison of antioxidant activity of alcoholic extracts of Peppermint (*Mentha piperita*). **Journal of Food Measurement and Characteristics** v. 8, n. 2, p. 113-121, 2014.
- FECKA, I.; TUREK, S. Determination of water-soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from Lamiaceae: peppermint, melissa, and sage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton: v. 55, n. 26, p. 10908–10917, 2007.
- FIGUEROA PÉREZ, M. G. et al. Effect of chemical elicitors on peppermint (*Mentha piperita*) plants and their impact on the metabolite profile and antioxidant capacity of resulting infusions. **Food Chemistry**. Londres: v. 156, p. 273–278, 2014.
- FIUZA, T.S. et al. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (MYRTACEAE). **Revista eletrônica de farmácia**. Goiania: v. 2, p. 1–11, 2008.
- FLAKER, C.H.C. et al. Gelatin-based nanocomposite films: a study on montmorillonite dispersion methods and concentration. **Journal of Food Engineering**. Essex: v. 167, p. 65–70, 2015.

- FLOEGEL, A. et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**. San Diego: v. 24, n. 7, p. 1043–1048, 2011.
- FORTES, G.A.C et al. Antioxidant Activities of Hydrolysable Tannins and Flavonoid Glycosides Isolated from *Eugenia uniflora* L. **Records of Natural Products**. Gebze-Kocaeli: v. 2, p. 251–256, 2015.
- FUKAI, T.; KAITOU, K.; TERADA, S. Antimicrobial activity of 2-arylbenzofurans from *Morus* species against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Fitoterapia**. Amsterdam: v. 76, n. 7-8, p. 708–11, dez. 2005.
- FURLONG, E.B. et al. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Vetor**. Rio Grande: v. 13, p. 105–114, 2003.
- GAMBERINI, M.T. et al. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera*, Mart. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro: v. 86, supl. 2, p. 137-139, 1991
- GAO, B. et al. Differentiating organic from conventional peppermints using chromatographic and flow injection mass spectrometric (FIMS) fingerprints. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton: v. 60, p. 11987–11994, 2012.
- GARCIA, F.A.O. et al. A comparative study of two clerodane diterpenes from *Baccharis trimera* (Less.) DC. on the influx and mobilization of intracellular calcium in rat cardiomyocytes. **Phytomedicine**. Jena: v. 21, n. 8-9, p. 1021–1025, 2014.
- GARMUS, T.T. et al. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**. Amsterdam: v. 86, p. 4–14, 2014.
- GIMÉNEZ, B. et al. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. **Food Chemistry**. Londres: v. 114, n. 3, p. 976–983, 2009a.
- GIMÉNEZ, B. et al. Improvement of the antioxidant properties of squid skin gelatin films by the addition of hydrolysates from squid gelatin. **Food Hydrocolloids**. Oxford: v. 23, n. 5, p. 1322–1327, 2009b.
- GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. **Food Chemistry**. Londres: v. 112, n. 1, p. 18–25, 2009a.
- GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. **Journal of Food Engineering**. Essex: v. 92, n. 1, p. 78–85, 2009b.

- GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Physical and chemical properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films with added aqueous oregano and rosemary extracts. **Food Hydrocolloids** v. 23, n. 5, p. 1334–1341, 2009c.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. et al. Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). **Food Hydrocolloids**. Oxford: v. 21, n. 7, p. 1133–1143, 2007.
- GONTARD, N. et al. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and others physical properties. **International Journal of Food Science and Technology**. West Sussex: v. 29, p. 39–50, 1994.
- GUEDON, D.J.; PASQUIER, B.P. Analysis and Distribution of Flavonoid Glycosides and Rosmarinic Acid in 40 *Mentha x piperita* Clones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton: v. 42, n. 3, p. 679–684, 1994.
- HOQUE, M.S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. **Food Hydrocolloids**. Oxford: v. 25, n. 5, p. 1085–1097, 2011.
- HOSSAIN, M.B. et al. Characterization of phenolic composition in lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton: v. 58, n. 19, p. 10576–10581, 2010.
- IQBAL, S. et al. Proximate composition and antioxidant potential of leaves from three varieties of mulberry (*Morus* sp.): A comparative study. **International Journal of Molecular Sciences** v. 13, n. 6, p. 6651–6664, 2012.
- JAMSHIDIAN, M.; TEHRANY, E.A.; DESOBRY, S. Release of synthetic phenolic antioxidants from extruded poly lactic acid (PLA) film. **Food Control**. Guildford: v. 28, n. 2, p. 445–455, 2012.
- JONGJAREONRAK, A. et al. Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and α -tocopherol. **Food Hydrocolloids**. Oxford: v. 22, n. 3, p. 449–458, 2008.
- JRIDI, M. et al. Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin-chitosan composite edible films. **International Journal of Biological Macromolecules**. Guildford: v. 67, p. 373–379, 2014.
- KADAM, S.U. et al. Development of biopolymer-based gelatin and casein films incorporating brown seaweed *Ascophyllum nodosum* extract. **Food Packaging and Shelf Life**. Amsterdam: v. 6, p. 68–74, 2015.
- KANATT, S.R. et al. Active chitosan–polyvinyl alcohol films with natural extracts. **Food Hydrocolloids**. Oxford: v. 29, n. 2, p. 290–297, 2012.

- KANMANI, P.; RHIM, J-W. Development and characterization of carrageenan/grapefruit seed extract composite films for active packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**. Guildford: v. 68, p. 258–266, 2014.
- KAPP, K. et al. Commercial peppermint (*Mentha×piperita* L.) teas: Antichlamydial effect and polyphenolic composition. **Food Research International**. Barking: v. 53, n. 2, p. 758–766, 2013.
- KEENAN, T. Chapter 16: Gelatin. In A. Domb, J. Kost, & D.M. Wiseman (Eds.), **Handbook of biodegradable polymers** Amsterdam: (pp. 313–323). Harwood Academic Publishers, 1997.
- KLEIN, T. et al. Microparticles containing guaraná extract obtained by spray-drying technique: development and characterization. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Curitiba: v. 25, n. 3, p. 292–300, 2015.
- KONG, B.; ZHANG, H.; XIONG, Y.L. Antioxidant activity of spice extracts in a liposome system and in cooked pork patties and the possible mode of action. **Meat Science**. Amsterdam: v. 85, n. 4, p. 772–778, 2010.
- KRZYŻANOWSKA, J. et al. Determination of polyphenols in *mentha longifolia* and *M. piperita* field-grown and in vitro plant samples using UPLC-TQ-MS. **Journal of AOAC International**. Arlington: v. 94, n. 1, p. 43–50, 2011.
- LÁZARO, S.F. et al. Effect of aqueous extracts of *Baccharis trimera* on development and hatching of *Rhipicephalus microplus* (Acaridae) eggs. **Veterinary Parasitology**. Amsterdam: v. 194, n. 1, p. 79–82, 2013.
- LEE, D.S. Active packaging. In: Sun DW (Ed.) **Handbook Frozen Food Processing and Packaging**. p.819 – 836, CRC Press, 2011.
- LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**. Londres: v. 125, n. 2, p. 288–306, 2011.
- LÓPEZ-RUBIO, A. et al. Overview of Active Polymer-Based Packaging Technologies for Food Applications. **Food Reviews International**. Nova York: v. 20, n. 4, p. 357–387, 2004.
- LV, J. et al. Phenolic composition and nutraceutical properties of organic and conventional cinnamon and peppermint. **Food Chemistry**. Londres: v. 132, n. 3, p. 1442–1450, jun. 2012.
- MAJHENIČ, L.; ŠKERGET, M.; KNEZ, Ž. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**. Londres: v. 104, n. 3, p. 1258–1268, 2007.

- MARTINEZ-CORREA, H. a. et al. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**. Amsterdam: v. 55, n. 3, p. 998–1006, 2011.
- MARTINEZ-CORREA, H. A. et al. Extracts from the leaves of *Baccharis dracunculifolia* obtained by a combination of extraction processes with supercritical CO₂, ethanol and water. **The Journal of Supercritical Fluids**. Amsterdam: v. 63, p. 31–39, 2012.
- MARTINS, C. D. A. **Avaliação da Atividade Antioxidante in vitro e in vivo do Guaraná (*Paullinia cupana*) em pó**. 2010. 130 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- MATTEI, R et al. Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**. Shannon: v. 60, n. 2, p. 111–116, 1998.
- MEKINIĆ, I.G. et al. In vitro antioxidant and antibacterial activity of Lamiaceae phenolic extracts: A correlation study. **Food Technology and Biotechnology**. Zagreb: v. 52, n. 1, p. 119–127, 2014.
- MEMON, A.A. et al. Phenolic acid profiling and antioxidant potencial of mulberry (*Morus Laevigata* W., *Morus Nigra* L., *Morus alba* L.) leaves and fruits grown in Pakistan **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**. Varsóvia: v. 60, n. 1, p. 25–32, 2010.
- MOLDOVAN, R.I et al. LC-MS analysis, antioxidant and antimicrobial activities for five species of *Mentha* cultivated in Romania. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**. Varsóvia: v. 9, n. 2, p. 559–566, 2014.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technol.** Tailândia: v. 26, n. 2, p. 212–219, 2004.
- MOON, J-K; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton: v. 57, p. 1655–1666, 2009.
- MORADI, M. et al. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. **LWT - Food Science and Technology**. Londres: v. 46, n. 2, p. 477–484, 2012.
- NAKAMURA, Y. et al. Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton: v. 51, n. 11, p. 3309–3312, 2003.

- NORAJIT, K.; KIM, K.M.; RYU, G.H. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. **Journal of Food Engineering**. Essex: v. 98, n. 3, p. 377–384, 2010.
- NUENGCHAMNONG, N.; KRITTASILP, K.; INGKANINAN, K. Characterisation of phenolic antioxidants in aqueous extract of *Orthosiphon grandiflorus* tea by LC-ESI-MS/MS coupled to DPPH assay. **Food Chemistry**. Londres: v. 127, n. 3, p. 1287–1293, 2011.
- NÚÑEZ-FLORES, R. et al. Physical and functional characterization of active fish gelatin films incorporated with lignin. **Food Hydrocolloids**. Oxford: v. 30, n. 1, p. 163–172, 2013.
- NÚÑEZ-FLORES, R. et al. Role of lignosulphonate in properties of fish gelatin films. **Food Hydrocolloids**. Oxford: v. 27, n. 1, p. 60–71, 2012.
- NUR HANANI, Z.A. et al. Manufacture and characterization of gelatin films derived from beef, pork and fish sources using twin screw extrusion. **Journal of Food Engineering**. Essex: v. 113, n. 4, p. 606–614, 2012.
- OH, J. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. **Food Control**. Guildford: v. 31, n. 2, p. 403–409, 2013.
- OLIVEIRA, A.C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**. São Paulo: v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.
- OLIVEIRA, A.L. et al. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). **Food Chemistry**. Londres: v. 99, n. 1, p. 1–5, 2006.
- OLIVEIRA, T.G. et al. Cellulose fiber reinforced biodegradable films based on proteins extracted from castor bean (*Ricinus communis* L.) cake. **Industrial Crops and Products**. Amsterdam: v. 67, p. 355–363, 2015.
- ÖZCAN, M. M.; ARSLAN, D. Antioxidant effect of essential oils of rosemary, clove and cinnamon on hazelnut and poppy oils. **Food Chemistry**. Londres: v. 129, n. 1, p. 171–174, nov. 2011.
- ÖZGEN, M.; SERÇE, S.; KAYA, C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. **Scientia Horticulturae**. Amsterdam: v. 119, n. 3, p. 275–279, 2009.
- PÁDUA, B.C. et al. Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. **Journal of Ethnopharmacology**. Lausanne: v. 129, n. 3, p. 381–386, 2010.
- PAGLIARUSSI, R.S.; FREITAS, L.A.P.; BASTOS, J.K.A. quantitative method for the analysis of xanthine alkaloids in *Paullinia cupana* (guarana) by capillary column gas

- chromatography. **Journal of Separation Science**. Weinheim: v. 25, n. 5-6, p. 371–374, 2002.
- PAREJO, I. et al. Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton: v. 52, n. 12, p. 3679–3687, 2004.
- PÉREZ-GAGO, M.B. Chapter 2. Protein-based films and coatings. In: BAI, J. (Ed) **Edible Coatings and Films to Improve Food Quality**, p. 13-77, CRC Press 2011.
- PÉREZ-GREGORIO, M.R. et al. Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.). **LWT - Food Science and Technology**. Londres: v. 44, n. 8, p. 1793–1801, 2011.
- PIÑEROS-HERNANDEZ, D. et al. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. **Food Hydrocolloids**. Oxford: v. 63, p. 488–495, 2016.
- QUILAQUEO GUTIÉRREZ, M. et al. Carboxymethylcellulose–montmorillonite nanocomposite films activated with murta (*Ugni molinae* Turcz) leaves extract. **Carbohydrate Polymers**. Barking: v. 87, n. 2, p. 1495–1502, 2012.
- RADOJKOVIC, M. et al. Free radical scavenging activity, total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus* spp. L., Moraceae) extracts. **Hemijaska industrija. Belgrado**: v. 66, n. 4, p. 547–552, 2012.
- RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**. São Paulo: v. 29, n. 4, p. 755–760, 2006.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**. Philadelphia: v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999.
- REGINATO-D'ARCE, M.A.B. Deterioração de lipídios–ranço. In; Oetterer, M; Reginato-D'arce, M.A.B; Spoto, M.H.F. (Eds.). **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueuri, Manole. p.243-299.
- REN, X. Biodegradable plastics: a solution or a challenge? **Journal of Cleaner Production**. Oxford: v. 11, n. 1, p. 27–40, 2003.
- RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. Cap 4 Lipídeos. Química de alimentos. Edgard Blücler, Instituto Mauá de Tecnologia: [s.n.], 2004. p. 135–138.
- ROONEY, M.L. Chapter 32 Active Packaging: Science and Application. In: WELTI-ChHANES, J., BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. AGUILERA, J.M. Engineering and Food for the 21st Century. DOI: 10.1201/9781420010169.pt 6, CRCPress, 2002.

- RUFINO, M.S.M. et al. Metodologia Científica : Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. **Comunicado Técnico da Embrapa**. Fortaleza: n.128, p. 3–6, 2007a.
- RUFINO, M.S.M. et al. Metodologia Científica : Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico da Embrapa**. Fortaleza: p. 0–4, 2007b.
- SANDASI, M. et al. Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial biofilms in vitro. **South African Journal of Botany**. Pretória v. 77, n. 1, p. 80–85 , 2011.
- SCHIMPL, F.C. et al. Guaraná: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**. Laussane: v. 150, n. 1, p. 14–31, 2013.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: Xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**. Laussane: v. 21, n. 2, p. 183–186, 1987.
- SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**. Philadelphia: v. 32, n. 1, p. 67–103, 1992.
- SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**. Londres: v. 18, p. 757–781, 2015.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. Análise dos alimentos (Métodos químicos e biológicos). 3º ed. Viçosa: Editora UFV, p.235, 2002.
- SILVA, D.C.M.N. et al. Supercritical fluid extraction of carqueja (*Baccharis trimera*) oil: Process parameters and composition profiles. **Food and Bioproducts Processing**. Amsterdam: v. 87, n. 4, p. 317–326, 2009.
- SINGLETON, V.L.; ROSSI JR, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**. Davis: v. 16, p. 144-158, 1965.
- SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B.R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**. Oxford: v. 24, n. 8, p. 770–775, 2010.
- SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. Campinas: v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.
- SOBRAL, P.J.A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília: v. 35, n. 6, p. 1251–1259, 2000.

- SOBRAL, P J A; HABITANTE, A M Q B. Phase transitions of pigskin gelatin. **Food Hydrocolloids**. Oxford: v. 15, p. 377–382, 2001.
- SOBRAL, P.J.A. et al. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**. Oxford: v. 15, n. 4-6, p. 423–432, 2001.
- SOUZA, S.M.A.; SOBRAL, P.J.A; MENEGALLI, F.C. Propriedades físicas de filmes comestíveis a base de proteínas miofibrilares de carne bovina. **Semina: Ciencias Agrarias**. Londrina: v. 33, n. 1, p. 283–296, 2012.
- THOMAZINE, M.; CARVALHO, R.A.; SOBRAL, P.J.A. Physical Properties of Gelatin Films Plasticized by Blends of Glycerol and Sorbitol. **Journal of Food Science**. Chicago: v. 70, n. 3, p. E172–E176, 2006.
- TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils. **Journal of Food Engineering**. Essex: v. 117, n. 3, p. 350–360, 2013.
- URIBE, E. et al. Assessment of vacuum-dried peppermint (*Mentha piperita* L.) as a source of natural antioxidants. **Food Chemistry**. Londres: v. 190, p. 559–565, 2016.
- VALENCIA, G.A. et al. Physical and morphological properties of nanocomposite films based on gelatin and Laponite. **Applied Clay Science**. Amsterdam: v. 124-125, p 260-266, 2016.
- VANIN, F.M. et al. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. **Food Hydrocolloids**. Oxford: v. 19, n. 5, p. 899–907, 2005.
- VARGAS, F.C. et al. Rosemary and Pitanga Aqueous Leaf Extracts On Beef Patties Stability under Cold Storage. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Curitiba: v. 59, e16160139, 2016.
- VEIGA, L. L. A. et al. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted guaraná (*Paullinia cupana*) by high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector. **Food Chemistry**. Londres: v. 152, p. 612–618, 2014.
- VICENTINI, N. M. et al. Prediction of Cassava Starch Edible Film Properties by Chemometric Analysis of Infrared Spectra. **Spectroscopy Letters**. Nova York : v. 38, n. 6, p. 749–767, 2005.
- VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**. Oxford, v. 50, n. 8, p. 2668–2674, 2012.

- VILLALOBOS, R. et al. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. **Food Hydrocolloids**. Oxford: v. 19, n. 1, p. 53–61, 2005.
- WOJDYLO, A; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYŚ, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**. Londres: v. 105, n. 3, p. 940–949, 2007.
- WU, J. et al. Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**. Oxford: v. 32, p. 42–51, 2013.
- YAMAGUTI-SASAKI, E. et al. Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**. Basel: v. 12, n. 8, p. 1950–63, 2007.
- ZGÓRKA, G.; GŁOWNIAK, K. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Oxford: v. 26, n. 1, p. 79–87, 2001.