



**RAFAELA CORRÊA PEREIRA**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO  
DE NANOCOMPÓSITOS BIODEGRADÁVEIS À  
BASE DE CONCENTRADO PROTEICO DE  
SORO DE LEITE / MONTMORILONITA /  
LICOPENO**

**LAVRAS – MG  
2015**

**RAFAELA CORRÊA PEREIRA**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
NANOCOMPÓSITOS BIODEGRADÁVEIS À BASE DE  
CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE /  
MONTMORILONITA / LICOPENO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. João de Deus Souza Carneiro

Coorientadores

Dr. Odílio Garrido Benedito Assis

Dra. Soraia Vilela Borges

**LAVRAS – MG  
2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Pereira, Rafaela Corrêa.

Desenvolvimento e caracterização de nanocompósitos biodegradáveis a base de concentrado proteico de soro de leite / montmorilonita / licopeno / Rafaela Corrêa Pereira. – Lavras : UFLA, 2015.

130 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): João de Deus Souza Carneiro.

Bibliografia.

1. embalagem ativa antioxidante. 2. propriedades de barreira. 3. propriedades mecânicas. 4. estabilidade térmica. 5. morfologia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**RAFAELA CORRÊA PEREIRA**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
NANOCOMPÓSITOS BIODEGRADÁVEIS À BASE DE  
CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE /  
MONTMORILONITA / LICOPENO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2015.

Dr. Odilio Garrido Benedito Assis      EMBRAPA Instrumentação

Dra. Soraia Vilela Borges                      UFLA

Orientador  
Dr. João de Deus Souza Carneiro

**LAVRAS – MG  
2015**

A Deus e a minha mãe Fátima,

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Fátima e Nivaldo e ao meu irmão Marcelo, pelo grande apoio e incentivo, sem os quais não seria possível concretizar este trabalho. Ao meu namorado Rossi, pelo companheirismo e paciência.

Ao meu orientador João de Deus, pelos ensinamentos, confiança e apoio durante a pós-graduação.

À Embrapa Instrumentação, em especial ao pesquisador Odilio pela receptividade, atenção e valiosas contribuições em todas as etapas desta pesquisa. Também a toda equipe da unidade, pelo apoio técnico durante a execução dos experimentos.

Às professoras Soraia e Marali, pelas contribuições no planejamento, execução e redação deste trabalho.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e disponibilização de recursos que viabilizaram a execução da pesquisa.

Ao Núcleo de Estudos em Inovações Tecnológicas e Sensoriais (INOVATEC), pelos aprendizados e experiências proporcionados durante a pós-graduação, e a toda equipe do Laboratório de Desenvolvimento de Novos Produtos, pela disponibilidade e ajuda na execução do experimento.

Ao professor Michel, por todos os ensinamentos e oportunidades concedidos durante a graduação e pós-graduação e também pelos conselhos e incentivo.

Ao Núcleo de Estudos em Alimentos Funcionais (NEAF), pela receptividade e pelos aprendizados e experiências proporcionados neste último ano, que muito contribuíram para minha formação.

Às amigas, Daniela, Julia, Taisa e Thayana pelo companheirismo e constante apoio, que foram fundamentais nesta conquista!

**A todos que me apoiaram, mesmo que não citados, meus sinceros agradecimentos.**

## EPÍGRAFE

“Não existe nada mais fatal para o pensamento que o ensino das respostas certas. Para isto existem as escolas: não para ensinar as respostas, mas para ensinar as perguntas. As respostas nos permitem andar sobre a terra firme. Mas somente as perguntas nos permitem entrar pelo mar desconhecido.”

Rubem Alves

## RESUMO GERAL

No presente trabalho foram desenvolvidos e caracterizados nanocompósitos à base de concentrado proteico de soro de leite (WPC) e montmorilonita (MMT) incorporados de licopeno como substância funcional, objetivando desenvolver um biomaterial alternativo com potencial aplicação em produtos alimentícios. Para tanto, utilizou-se um experimento em fatorial completo com os seguintes fatores de estudo: MMT (0 e 2% em p/p) e licopeno (0, 6 e 12% em p/p). As propriedades ópticas (parâmetros CIELab, transmissão de luz e transparência), umidade, densidade, solubilidade, permeabilidade ao vapor de água, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FITR), atividade antioxidante, propriedades mecânicas (testes de tensão e punctura), análise da estabilidade térmica (DSC e TGA) e morfologia (MEV e AFM) dos filmes desenvolvidos foram analisados. Os resultados indicaram que licopeno e MMT foram incorporados com sucesso em filmes de WPC pelo método de *casting*. Os filmes obtidos foram flexíveis, homogêneos e com dispersão uniforme dos componentes. A incorporação de 2 % (em p/p) de MMT na matriz polimérica melhorou significativamente as propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água, além de aumentar a estabilidade térmica dos filmes. O licopeno, além de conferir cor vermelha aos filmes, apresentou atividade antioxidante e atuou como barreira contra radiação UV e luz visível. Esses resultados indicam o potencial de aplicação dos filmes em produtos alimentícios, abrindo novas perspectivas ao mercado de embalagens para alimentos.

**Palavras-chave:** Embalagem ativa antioxidante. Propriedades de barreira. Propriedades mecânicas. Estabilidade térmica. Morfologia.



## ABSTRACT

In the present study, the production and characterization of nanocomposites based on whey protein concentrate (WPC) and montmorillonite (MMT) incorporated of lycopene as functional substance is presented and discussed as an alternative biomaterial for potential uses in foodstuff applications. A full factorial design with varying levels of MMT (0 and 2% in w/w) and lycopene (0, 6 and 12% in w/w) was used. Optical properties (CIELab parameters, light transmission and film transparency), moisture, density, solubility, water vapour permeability, FTIR, antioxidant activity, mechanical properties (tensile and puncture tests) thermal stability analysis (DSC and TGA) and film morphology (MEV and AFM) of the resulting materials were evaluated. Results indicated that lycopene and MMT nanoparticles were successfully included in WPC films using the casting/evaporation method. The films were flexible and homogeneous and a uniform dispersion of the components were achieved. Inclusion of 2% w/w of MMT in the polymeric matrix significantly improved barrier property against water vapor and mechanical and thermal properties of the films. Lycopene, besides its good red coloring ability provided to the films antioxidant activity and protection against UV-vis light. These findings open a new perspective on the use of materials for bioactive packaging applications.

**Keywords:** Antioxidant food packaging. Barrier properties. Mechanical properties. Thermal stability. Morphology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Alterações físico-químicas que ocorrem durante a formação da rede de gel viscoelástico durante o aquecimento das proteínas do soro do leite na elaboração de filmes .....	21
Figura 2 Aparência macroscópica de géis formados por proteínas de soro de leite, influenciada por pH e força iônica durante gelatinização .....	23
Figura 3 Estrutura química da montmorilonita .....	37
Figura 4 Representação dos tipos de nanocompósitos de polímero/silicato em camadas possíveis de serem obtidos termodinamicamente .....	38
Figura 5 Estrutura química da molécula de licopeno trans e seus isômeros geométricos .....	43

### SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

#### ARTIGO 1 - MORPHOLOGY AND MECHANICAL PROPERTIES OF WPC/MMT FILMS ACTIVATED WITH LYCOPENE

Figure 1 DSC thermograms of pure WPC films .....	92
Figure 2 TGA and DTG curves of WPC incorporated of MMT and lycopene ..	93
Figure 3 Micrographs of the surface of WPC films .....	94
Figure 4 Micrographs of the cross sections of WPC films .....	95
Figure 5 AFM height images of WPC films .....	96

#### ARTIGO 2 - DEVELOPMENT OF WPC/MMT NANOCOMPOSITES ENRICHED WITH LYCOPENE FOR PACKAGING PURPOSES

Figure 1 Photographs of WPC films .....	120
Figure 2 Light transmission (%) of WPC films .....	121
Figure 3 Transparency (A600/mm) of WPC films with or without addition of lycopene and MMT .....	122
Figure 4 Moisture content of WPC/MMT films incorporated of lycopene .....	123
Figure 5 FTIR absorbance spectra of WPC films .....	124
Figure 6 DPPH scavenging activity (%) of lycopene extract and WPC films with or without lycopene and MMT .....	125

## LISTA DE TABELAS

### PRIMEIRA PARTE

Tabela 1 Propriedades físicas e químicas das proteínas do soro de leite.....	17
Tabela 2 Aplicações dos nanocompósitos em embalagens para alimentos. ....	34

### SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

#### ARTIGO 1 - MORPHOLOGY AND MECHANICAL PROPERTIES OF WPC/MMT FILMS ACTIVATED WITH LYCOPENE

Table 1 Gel formulation compositions for film processing. ....	97
Table 2 P values for the tensile properties obtained in analysis of variance.....	97
Table 3 Mechanical properties of WPC cast films with and without MMT incorporated .....	97
Table 4 P values for the tensile properties obtained in analysis of variance .....	97
Table 5 Puncture strength (PS) and puncture .....	98
Table 6 Values of thermal properties obtained from thermogravimetric analysis of WPC films incorporated of MMT and lycopene .....	98
Table 7 RMS values obtained from AFM scanned areas of WPC films incorporated of lycopene and MMT .....	98

#### ARTIGO 2 - DEVELOPMENT OF WPC/MMT NANOCOMPOSITES ENRICHED WITH LYCOPENE

Table 1. Gel formulation compositions for film processing .....	118
Table 2 P values for colour parameters obtained in analysis of variance .....	118
Table 3 Color properties of WPC/MMT films incorporated of lycopene.....	118
Table 4 P values for transparency obtained in analysis of variance. ....	119
Table 5 P values for moisture content (MC), solubility (S) and density ( $\rho_s$ ) obtained in analysis of variance.....	119
Table 6 P values for water vapour permeability (WVP) obtained in analysis of variance.....	119
Table 7 P values for antioxidant activity obtained in analysis of variance.....	119

## SUMÁRIO

### PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	9
2. REFERENCIAL TEORICO .....	12
2.1 Embalagens para alimentos: Biopolímeros.....	12
2.2 Proteínas do soro de leite .....	16
2.3 Filmes a base de proteínas do soro de leite.....	20
2.3.1 Fatores que interferem nas propriedades de filmes a base de soro de leite	22
2.3.2 Potencial de aplicação de filmes a base de proteínas do soro de leite .....	30
2.4 Nanocompósitos para aplicação em embalagens para alimentos.....	33
2.4.1 Nanopartículas de montmorilonita.....	36
2.5 Incorporação de agentes ativos em embalagens para alimentos .....	40
2.5.1 Licopeno .....	42
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	48
REFERÊNCIAS.....	49

### SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

#### ARTIGO 1 - MORPHOLOGY AND MECHANICAL PROPERTIES OF WPC/MMT FILMS ACTIVATED WITH LYCOPENE

Abstract.....	62
1 INTRODUCTION .....	63
2 MATERIALS AND METHODS.....	66
3 RESULTS AND DISCUSSION .....	72
4 CONCLUSIONS .....	84
REFERENCES .....	85

#### ARTIGO 2 - DEVELOPMENT OF WPC/MMT NANOCOMPOSITES ENRICHED WITH LYCOPENE FOR PACKAGING PURPOSE

Abstract.....	100
1 INTRODUCTION .....	101
2 MATERIALS AND METHODS.....	102
3 RESULTS AND DISCUSSION .....	107
4 CONCLUSIONS .....	114
REFERENCES .....	114

## **PRIMEIRA PARTE**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O impacto ambiental causado pelos resíduos de embalagens plásticas, elaboradas a partir de materiais não biodegradáveis derivados de fontes petroquímicas, tem aumentado o interesse pelo desenvolvimento de embalagens biodegradáveis que utilizam biopolímeros de fontes renováveis e por processos tecnológicos capazes de reduzir a dependência de combustíveis fósseis (RHIM; PARK; HÁ, 2013; RHIM; NG, 2007). Nesse sentido, vários polímeros de fontes renováveis como polissacarídeos e proteínas, principalmente derivados de vegetais e resíduos agroindustriais, têm sido investigados para o desenvolvimento de materiais biodegradáveis não tóxicos capazes de substituir os materiais sintéticos (RAMOS et al., 2013).

Tendo em vista a capacidade apresentada pelas proteínas do soro de leite, em formar filmes transparentes e flexíveis, com permeabilidade extremamente baixa ao oxigênio e com boas propriedades mecânicas, faz com que elas sejam consideradas um material economicamente e ecologicamente atrativo para ser empregado na elaboração de embalagens biodegradáveis comestíveis (RAMOS et al., 2013; SCHMID et al., 2012). Isso porque o soro, um subproduto da fabricação de queijos, é um material abundante e de baixo custo que quando descartado de forma inadequada no meio ambiente causa vários problemas ambientais e de contaminação.

Porém, os filmes formados por biopolímeros como o soro de leite, apresentam algumas deficiências em relação às propriedades mecânicas e de barreira quando comparados aos materiais plásticos usuais, o que limita sua aplicação em alguns produtos. Uma técnica que tem sido extensivamente estudada para melhorar as propriedades dos filmes é a adição de materiais inorgânicos em escala nanométrica, formando uma matriz polimérica híbrida. Esses materiais são, basicamente, argilas compostas por silicato de alumina

laminado, classificadas como fitossilicatos. A montmorilonita (MMT) é um dos materiais inorgânicos mais utilizados para esse fim devido à sua biodegradabilidade e disponibilidade em grandes quantidades a custos relativamente baixos, sendo capaz de melhorar propriedades de filmes à base de biopolímeros quando está esfoliada e completamente dispersa na matriz polimérica (WAKAI; ALMENAR, 2015). Além disso, é considerada “Generally Recognized As Safe” (GRAS) pela U.S Food and Drug Administration (FDA; 21CFR184.1155), sendo adequada sua utilização em filmes para o acondicionamento de alimentos.

Além da busca pela sustentabilidade e por materiais biodegradáveis oriundos de fontes renováveis para aplicação em embalagens; promover a saúde do consumidor é uma questão atual na indústria de alimentos (MOREIRA et al., 2013). As mudanças nos hábitos de consumo e preparo de alimentos decorrentes do estilo de vida moderno e o conseqüente aumento no consumo de alimentos processados de baixo valor nutricional, teve como resultado dietas desbalanceadas e deficientes, consideradas um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, que afetam diretamente a qualidade de vida dos indivíduos. Tendo em vista a crescente preocupação dos consumidores em ingerir alimentos mais saudáveis, adicionar nutrientes e substâncias funcionais em produtos processados tornam-se estratégias efetivas e seguras para a indústria, permitindo o aumento na oferta de produtos enriquecidos com os mesmos (LOPEZ-RUBIO; GAVARA; LAGARON, 2006).

Entretanto, o desenvolvimento de alguns alimentos funcionais impõe à indústria inúmeras limitações. Dentre elas pode-se ressaltar: a perda da funcionalidade do composto ao longo da fabricação, estocagem e comercialização do produto; incompatibilidade da substância com a matriz do alimento; alterações sensoriais indesejáveis e, a necessidade de adaptação das

linhas de produção, o que geralmente implica em altos investimentos e mudança completa dos parâmetros envolvidos no processo (GIROUX; GRANDPRÉ; FUSTIER, 2013; LOPEZ-RUBIO; GAVARA; LAGARON, 2006).

Uma alternativa para essas limitações que tem recebido grande atenção nos últimos anos é o desenvolvimento de embalagens capazes de proporcionar funcionalidade aos alimentos que, conforme proposto por Lopez-Rubio, Gavara e Lagaron (2006), são denominadas “embalagens bioativas”. Essa tecnologia inovadora trabalha geralmente com ingredientes funcionais como fitoquímicos, vitaminas, ácidos graxos poli-insaturados, probióticos e prebióticos que podem ser incluídos diretamente no material da embalagem ou em recobrimentos de forma a enriquecer os alimentos (MOREIRA et al., 2013).

Dentre as substâncias funcionais, destaca-se o licopeno, um carotenoide encontrado de forma expressiva em alimentos de coloração vermelha como o tomate e seus derivados, melancia e mamão (RODRIGUES-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). É um potente antioxidante devido à grande capacidade de inativar espécies reativas de oxigênio. Além disso, evidências clínicas comprovam a ação do licopeno na prevenção contra vários tipos de câncer (GAJOWIK; DOBRZYNSKA, 2014; LI-JUAN et al., 2014; SAHIN et al., 2015; STICE et al., 2015). Devido à coloração vermelha que proporciona aos alimentos, a adição de licopeno em embalagens para alimentos é uma alternativa inovadora no desenvolvimento de filmes ativos, pois essa substância, além de proporcionar proteção antioxidante e bioativa, confere coloração vermelha intensa aos filmes, contribuindo assim com as propriedades sensoriais do produto acondicionado.

Sendo assim, propõe-se neste trabalho desenvolver e caracterizar nanocompósitos à base de WPC/MMT incorporados de licopeno como substância bioativa, de forma a obter um material biodegradável com potencial aplicação no enriquecimento funcional de alimentos.



## **2 REFERENCIAL TEORICO**

### **2.1 Embalagens para alimentos: Biopolímeros**

A principal função das embalagens para alimentos é a manutenção da qualidade e da segurança dos produtos ao longo do armazenamento e transporte, além de estender sua vida útil prevenindo fatores ou condições desfavoráveis como deterioração por microrganismos, contaminantes químicos, oxigênio, umidade, luz, força externa dentre outros. De forma a melhorar tais funções, os materiais das embalagens fornecem proteção física e criam condições físico-químicas apropriadas para os produtos, o que é essencial para se obter vida útil satisfatória e manutenção da qualidade e segurança do produto (LÓPEZ-RUBIO et al., 2004). Materiais como papel, papelão, plástico, vidro e metal, além de combinações de materiais de diferentes naturezas químicas e estruturas físicas são utilizados para elaboração de embalagens, cumprindo as funções e requisitos citados acima. Dentre esses, destaca-se os materiais plásticos derivados de fontes petroquímicas, que têm sido largamente utilizados desde a metade do século XX (RHIM; PARK; HA, 2013).

De fato, o setor de embalagens é dominado por plásticos derivados de fontes petroquímicas, como o poliestireno, polipropileno, polietileno e tereftalato de polietileno, que são produzidos em grandes unidades de produção e, como tal, são relativamente baratos, devido à economia de escala e baixos custos de processamento (MENSITIERI et al., 2011). Além disso, são convenientes por apresentarem excelentes propriedades físico-químicas, leveza, termoselabilidade (que permite o fechamento da embalagem), facilidade de impressão e qualidade estética. Dessa forma, devido à grande variedade de materiais e composições disponíveis, é possível adotá-los como embalagens de diferentes produtos de acordo com suas necessidades. Entretanto, esses materiais

têm sido considerados umas das principais causas dos problemas ambientais conhecidos atualmente, uma vez que eles não são facilmente degradados pelo meio ambiente após seu uso (LÓPEZ-RUBIO et al., 2004; RHIM; PARK; HA, 2013).

Os plásticos representam, no Brasil, 13,5% do volume de materiais descartados, sendo a maior parte depositada em aterros sanitários, lixões e no meio ambiente natural ou urbano (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO PLÁSTICO - ABIPLAST, 2013). A degradação extremamente lenta, a resistência e o grande volume que ocupam são os principais fatores que justificam os prejuízos ambientais causados pelos plásticos. Isso porque sua presença, além de dificultar a decomposição de materiais orgânicos e causar danos à fauna e flora, causam ainda inúmeros transtornos sociais, visto que são os principais causadores de enchentes em centros urbanos. Levando em consideração ainda que a principal aplicação dos plásticos seja em embalagens de produtos, especialmente de alimentos, o ciclo de vida curto e o grande volume comercializado desses produtos faz com que a geração de resíduos seja cada vez mais rápida e volumosa.

Sendo assim, os polímeros biodegradáveis têm recebido grande atenção, pois se mostram como uma alternativa para a redução dos impactos do setor de embalagem no meio ambiente, desde que produzidos com responsabilidade (SARANTÓPOULOS; REGO, 2012).

Os polímeros biodegradáveis são definidos como aqueles que passam por cisão da cadeia, induzida por microrganismos, sob certas condições específicas em termos de pH, umidade, oxigênio e presença de alguns metais para garantir a biodegradação de tais polímeros (MARA; FRANCHETTI; MARCONATO, 2006). Eles podem ser obtidos por fontes biológicas, como vegetais (normalmente são resíduos agroindustriais), ou também sintetizados por bactérias a partir de moléculas pequenas como o ácido butírico ou ácido valérico

que dão origem ao polihidroxibutirato (PHB) e ao polihidroxivalerato (PHV). Outros polímeros biodegradáveis podem ser derivados de fontes de petroquímicas ou mistas de biomassa e de petróleo. Os polímeros biodegradáveis derivados do petróleo mais conhecidos são poliésteres alifáticos ou copolímeros alifático-aromático. Entretanto, polímeros biodegradáveis obtidos a partir de recursos renováveis, como o ácido polilático (PLA), estão atraindo muito mais atenção devido ao apelo sustentável de suas origens em contraste àqueles polímeros biodegradáveis obtidos totalmente do petróleo (RAY; BOUSMINA, 2005).

Os polímeros de origem vegetal ou animal, obtidos diretamente da biomassa são geralmente derivados do amido (milho, batata, trigo), da celulose, de proteínas (soro de leite, soja) e de materiais lipídicos (triglicérides). A maioria desses materiais é capaz de formar filmes com propriedades comparáveis a muitos plásticos à base de petróleo.

Nesse sentido, diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de desenvolver e otimizar materiais à base desses biopolímeros. Filmes biodegradáveis à base de zeínas, um conjunto de proteínas hidrofóbicas encontrada no milho, foram desenvolvidos por Arcan e Yemenicioglu (2011). Apesar das excelentes propriedades filmogênicas e de barreira, a fragilidade e a pouca flexibilidade apresentada pelos filmes são consideradas grandes limitações para sua aplicação como material de revestimento. Contudo, resultados obtidos por esses pesquisadores indicam que a adição de compostos fenólicos como catequina e ácido gálico podem contribuir significativamente no aumento da flexibilidade dos filmes, ampliando as possibilidades de aplicação.

Bourbon, Pinheiro e Cerqueira (2011) estudaram revestimentos comestíveis à base de quitosana, um biopolímero produto da desacetilação da quitina, o principal componente do exoesqueleto de crustáceos. Segundo estes autores, a quitosana devido à sua propriedade filmogênica, produz filmes

transparentes com boas propriedades mecânicas e baixa permeabilidade ao vapor de água. Além disso, apresenta atividade antimicrobiana intrínseca, podendo inibir o crescimento de ampla variedade de bactérias.

Cortez-Vega et al. (2013) avaliaram as propriedades de filmes de isolado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*). Segundo os autores, as proteínas do pescado apresentam propriedades como habilidade para formar redes, plasticidade e elasticidade, além de boa barreira ao oxigênio. Uma limitação, entretanto, é a baixa barreira ao vapor de água devido à sua natureza hidrofílica.

Já o potencial de aplicação de filmes à base de celulose tem sido amplamente descrito na literatura (AKHTAR et al., 2012; ALMASI; GHANBARZADEH; ENTEZAMI, 2010; SHIN et al., 2014; TUNÇ; DUMAN, 2011). Segundo Gutiérrez et al. (2012), polissacarídeos lineares aniônicos derivados da celulose como metilcelulose e carboximetil celulose (CMC), são polímeros capazes de formar filmes com boas propriedades mecânicas e de barreira, apesar da susceptibilidade dos filmes à umidade. Além disso, esses polímeros se destacam pela grande disponibilidade na natureza, baixo custo e facilidade de processamento.

O desenvolvimento de filmes biodegradáveis à base de proteínas da soja (GUERRERO; LA CABA, 2010; SCHMIDT; GIACOMELLI; SOLDI, 2005) e do soro de leite (GOUNGA; XU; WANG, 2007; HONG; KROCHTA, 2006; KADAM et al., 2013; LI et al., 2011) também tem sido foco de diversas pesquisas nos últimos anos. Este último se destaca por se tratar de um subproduto da fabricação de queijos que quando descartado de maneira inadequada no meio ambiente causa vários problemas ambientais e de contaminação de solos e água.

Diante das diversas pesquisas já desenvolvidas com materiais biopoliméricos, pode-se notar que os filmes obtidos a partir dessas fontes apresentam grande potencial de aplicação, principalmente pelo apelo sustentável

e biodegradabilidade. Porém, problemas de processamento são particularmente relevantes principalmente devido à fragilidade, deformação plástica, alta permeabilidade a gases e umidade, além de características intrínsecas como difícil reprodutibilidade, controle sobre a arquitetura molecular e conformação espacial da macromolécula, restringem o seu uso em uma ampla gama de aplicações (MENSITIERI et al., 2011; RAY; BOUSMINA, 2005).

Sabendo que cada matéria-prima apresenta suas especificidades, características de interesse e deficiências, vários estudos têm sido conduzidos visando à melhoria das propriedades dos materiais. Alguns exemplos são: a adição de componentes que podem adicionar hidrofobicidade ao material da embalagem (SOAZO; RUBIOLO; VERDINI, 2011a, 2011b); desenvolvimento de *blends* de biopolímeros com diferentes propriedades (DI PIERRO et al., 2011; JIANG et al., 2010; PEREZ-GAGO; KROCHTA, 2000; TIEN et al., 2000; WANG; AUTY; KERRY, 2010); modificação química e/ou física do biopolímero (SOARES, 2012; SOUZA; CERQUEIRA; CASARIEGO, 2009; TIEN et al., 2000) e desenvolvimento de micro e nanocompósitos à base de biopolímeros (SOTHORNVIT; RHIM; HONG, 2009; WAKAI; ALMENAR, 2015; ZHOU; WANG; GUNASEKARAN, 2009).

## **2.2 Proteínas do soro de leite**

O soro de leite é um subproduto da fabricação de queijos que contém aproximadamente 7% de matéria seca, composta, em geral por 13% de proteínas, 75% de lactose, 8% de minerais, cerca de 3% de ácidos orgânicos e menos de 1% de gordura (CINELLI et al., 2014). Essa composição, entretanto, depende de vários fatores como tipo do soro de leite (obtido da coagulação enzimática ou ácida), fonte do leite (bovino, caprino ou ovino), estação do ano da produção, tipo de alimentação animal, estágio de lactação dentre outros.

Porém, o efeito de cada um desses fatores sobre a variabilidade final dos produtos comerciais pode ser superada via controle dos parâmetros de processamento pela indústria, de forma a atingir as especificações estabelecidas pelo mercado (RAMOS et al., 2012).

Dentre as principais proteínas do soro de leite, destacam-se  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina, que representam, respectivamente, ~50% e 12% da fração proteica. O restante é composto por imunoglobulinas, albumina do soro bovino, peptona proteose entre outras moléculas minoritárias (Tabela 1). Estruturalmente, elas podem ser definidas como complexos de proteínas globulares susceptíveis à desnaturação e agregação induzida pelo calor e alta pressão, formando uma rede tridimensional (FITZSIMONS; MULVIHILL; MORRIS, 2007). O desdobramento da molécula observado expõe grupos tiol livres e resíduos hidrofóbicos, levando a várias possibilidades de associações intermoleculares covalentes e hidrofóbicas (ARRIAGA, 2011).

Tabela 1 Propriedades físicas e químicas das proteínas do soro de leite

Tipo de proteína	$\alpha$ -lactalbumina, $\beta$ -lactoglobulina, albumina do soro bovino, imunoglobulinas e peptona proteose
Estrutura	Monômeros ou pequenas estruturas quaternárias
Peso molecular	$\alpha$ -lactalbumina - ~ 14 kDa $\beta$ -lactoglobulina - ~ 18 kDa albumina do soro bovino - ~ 66 kDa
pH isoeletrico	~5
Solubilidade em pH ~4,6	Solúvel
Estabilidade ao calor	Completamente desnaturada à 90°C por 10 min
Composição de aminoácidos	Altamente estruturadas, não fosforiladas, ricos em enxofre (1,7%) compostas por cisteína e/ou cistina. Número de pontes dissulfetos intramoleculares e grupos tiol (SH), respectivamente: $\alpha$ -lactalbumina - 4, sem SH $\beta$ -lactoglobulina - 2 e 1 SH albumina do soro bovino - 17 e 1 SH

Fonte: Adaptado de Dissanayake (2011)

As proteínas extraídas do soro de leite apresentam diferentes níveis de pureza, sendo que esses valores variam de 35 a 97% (base seca). O produto é referido como concentrado proteico de soro (WPC) quando apresenta teores de proteína entre 35 a 90%. O método normalmente utilizado para concentrar as proteínas é a ultrafiltração. O WPC contém quantidades substanciais de lactose, minerais e gordura, sendo que sua composição varia amplamente. O material mais puro (e também mais caro), cujo teor de proteína é maior que 90% é conhecido como isolado proteico de soro (WPI). Esse produto pode ser obtido por meio do uso de resinas trocadoras de íons, que ligam as proteínas, fazendo com que lactose e minerais sejam eluídos (FITZSIMONS; MULVIHILL; MORRIS, 2007; HONG; KROCHTA, 2006).

Na produção do WPC, o soro líquido obtido durante a produção de queijo, após a pasteurização é armazenado em tanques e clarificado por centrifugação para retirada de resíduos de queijo. Segue-se a concentração da solução por processo de filtração em membranas de ultrafiltração (UF). O concentrado obtido por UF pode ainda ser evaporado para que se obtenha maior concentração de sólidos, sendo então transformados em pó por secagem em *spray drier*. Todas as operações unitárias envolvidas nesse processo afetam sensivelmente a composição e, conseqüentemente, as propriedades funcionais dos produtos resultantes (ANTUNES, 2003).

A operação unitária de UF é a etapa fundamental na produção de concentrado e isolado de soro de leite. É um processo de filtração em membrana com capacidade de separar fisicamente proteínas e gorduras da lactose e minerais. A membrana é constituída de diversos polímeros e é capaz de reter moléculas com peso molecular acima de 20 a 30 mil Da. O fluxo de soro é passado pela membrana e a água, sais minerais e lactose passam através dela num processo de permeação. Como proteínas e gorduras têm pesos moleculares muito maiores, elas são retidas. Nessa etapa pode-se concentrar os sólidos do

soro em até 25 – 35 %, sendo a composição do produto final controlada pela ultrafiltração, o que permite melhorar a funcionalidade do produto. A secagem por *spray drier* da proteína líquida promove sua concentração até um total de sólidos da ordem de 35 – 95 %, produzindo um pó fino de coloração branca. O controle do *spray drier* e da intensidade de atomização do líquido favorecem a secagem em baixa temperatura e, conseqüentemente, a obtenção de um concentrado em que a solubilidade proteica é mantida em altos níveis. Também é possível promover a aglomeração durante a secagem em *spray*, produzindo produtos com boa dispersibilidade (ANTUNES, 2003).

O processo de obtenção de WPC com 80% de proteína necessita do emprego de mais de uma operação unitária, a diafiltração. Ela é empregada para elevar a concentração das proteínas de 60 % para 80 %. A diafiltração consiste na adição contínua de água ao retentado da UF para promover a remoção mais eficiente de lactose e sais minerais. Além de promover a concentração proteica, ela melhora sua pureza funcionalidade como ingrediente, além de servir como eficiente controle da composição final do produto (ANTUNES, 2003).

Vale ressaltar que, devido à evolução observada nos últimos anos em relação às tecnologias de filtração e purificação de proteínas, principalmente no que diz respeito aos métodos de membrana e troca iônica, tornaram mais fáceis a recuperação de proteínas e a manutenção de suas funcionalidades (RAMOS et al., 2012).

Baseado na composição de aminoácidos e na taxa de liberação de aminoácidos e peptídeos no processo de digestão no intestino delgado, as proteínas do soro de leite apresentam funções nutricionais e fisiológicas singulares, melhores que qualquer outra proteína dietética. Alguns dos peptídeos ativos presentes no soro de leite podem ainda possuir numerosos benefícios biológicos como ações antitrombótica e antioxidante, imunomodulação e melhoria da absorção de minerais (VASILJEVIC; SHAH, 2007).



Na indústria de alimentos o soro de leite é amplamente empregado. As principais aplicações são em bebidas esportivas, produtos de panificação, produtos cárneos processados, molhos para saladas, cremes, sopas e diversos produtos lácteos (FITZSIMONS; MULVIHILL; MORRIS, 2007; ONWALATA; KONSTANCE; TOMASULA, 2004).

Grandes esforços têm sido feitos para encontrar novos usos para o soro de leite, como por exemplo, em filmes biodegradáveis. O interesse no estudo de filmes biodegradáveis tem crescido muito, principalmente devido ao fato de que os filmes biodegradáveis são alternativas ecológicas frente aos materiais para embalagens sintéticas não biodegradáveis. E apesar de ainda não ser viável a completa substituição desses materiais, os filmes biodegradáveis apresentam potencial para reduzi-los ou substituí-los em algumas aplicações.

### **2.3 Filmes à base de proteínas do soro de leite**

Filmes ou revestimentos à base de soro de leite são, basicamente, uma rede polimérica desidratada, extensivamente integrada, que apresenta estrutura tridimensional em forma de gel. Independente do processo específico de formação, os filmes resultantes devem apresentar estrutura de gel rearranjada espacialmente, incluindo quaisquer agentes filmogênicos adicionados. As características mais distintivas das proteínas do soro de leite, quando comparadas a outros biopolímeros, são a desnaturação conformacional, presença de cargas eletrostáticas e natureza anfifílica (RAMOS et al., 2012).

De acordo com Hong e Krochta (2006), filmes à base de WPI e WPC apresentam excelentes propriedades de barreira ao oxigênio em umidade relativa baixa à intermediária. Esse material, também apresenta boa qualidade visual, por serem lisos e transparentes. Sendo assim, sugere-se que revestimentos à base de proteínas do soro de leite apresentam grande potencial de utilização como

substitutos de polímeros sintéticos. Além disso, considerando que o WPC pode ser utilizado com esse propósito a custos muito mais baixos que o WPI, filmes e revestimentos à base de WPC apresentam vantagens práticas dos pontos de vista econômico e industrial.

Na formação de filmes e revestimentos, a gelatinização é um pré-requisito. Esse fenômeno, ilustrado abaixo na Figura 1, é resultado tanto de interações físicas (eletrostáticas e hidrofóbicas) e químicas (ligações dissulfeto), estabelecidas entre as moléculas de proteínas do soro.

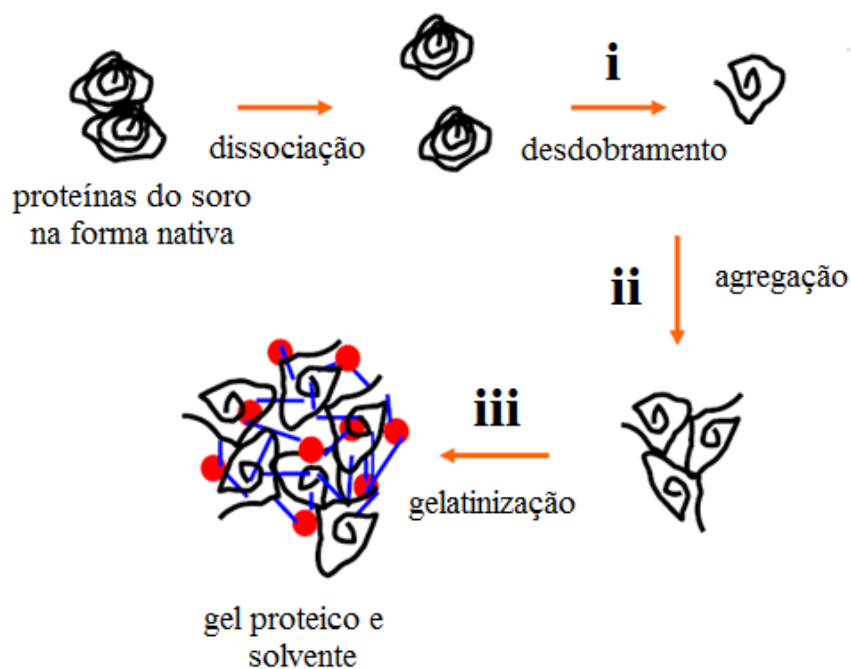


Figura 1 Alterações físico-químicas que ocorrem durante a formação da rede de gel viscoelástico durante o aquecimento das proteínas do soro do leite na elaboração de filmes

Fonte: Dissanayake (2011)

Entretanto, a desnaturação (desdobramento parcial, conforme ilustrado na Figura 1i) das proteínas globulares não é por si só, suficiente para promover a

gelatinização. As moléculas individuais precisam se associar (Figura 1ii) para formar uma rede gélida contínua (Figura 1iii). Em pH neutro e na ausência de sais, o processo de agregação é inibido por repulsão eletrostática entre os glóbulos desnaturados. Uma forma de promover a agregação e gelatinização é reduzir as cargas na molécula de proteína por meio do abaixamento do pH ao redor do ponto isoelétrico da proteína. A agregação, porém, pode ainda ser promovida pela adição de sais para promover repulsões intermoleculares (FITZSIMONS; MULVIHILL; MORRIS, 2007)

Sendo assim, a formação do gel implica na desestabilização de proteínas solúveis do soro (uma vez estáveis) e pode ser induzida via adição de substâncias químicas, alterações nas cargas, aumento da pressão hidrostática, aquecimento, resfriamento ou hidrólise enzimática parcial. Cada um desses processos induzem o desdobramento parcial ou total da estrutura inicial das proteínas, resultando em agregação e eventual formação do gel (RAMOS et al., 2012).

### **2.3.1 Fatores que interferem nas propriedades de filmes à base de soro de leite**

Dentre os parâmetros responsáveis pelas alterações físicas e microestruturais dos filmes à base de proteínas do soro e leite destacam-se: condições de processamento, pH, concentração de proteína e de aditivos, tais como plastificantes, qualidade e adição de outras macromoléculas ou partículas, entre outros (DISSANAYAKE, 2011).

Segundo Ramos et al. (2012), em emulsões estáveis de proteína, a carga líquida da camada de proteína adsorvida é altamente dependente do pH. Quando o pH está próximo ao ponto isoelétrico (pI) das principais proteínas do soro (aproximadamente 7), sua carga líquida se aproxima de zero, logo a repulsão

eletrostática se torna mais fraca e a agregação provavelmente ocorrerá. Em pH acima e abaixo do pI, as partículas da solução apresentam cargas; conseqüentemente, ocorre repulsão eletrostática entre as moléculas.

O ponto isoelétrico das proteínas do soro está em torno do pH 5,2. Entre aproximadamente pH 4 e 6, a repulsão no sistema é pequena e géis brancos e opacos são formados, com dimensões das cadeias na rede na ordem de micrómetros, isto é, géis particulados. A rede dos géis particulados é constituída por agregados quase esféricos ligados entre si formando os segmentos lineares. A valores de pH fora do intervalo entre 4 e 6, a repulsão no sistema é elevada, levando à formação de géis mais transparentes, sendo as dimensões das cadeias na rede na ordem nanômetros, ou seja, os segmentos são muito bem alinhados e finos (ANKER; STADING; HERMANSSON, 1998) (Figura 2).

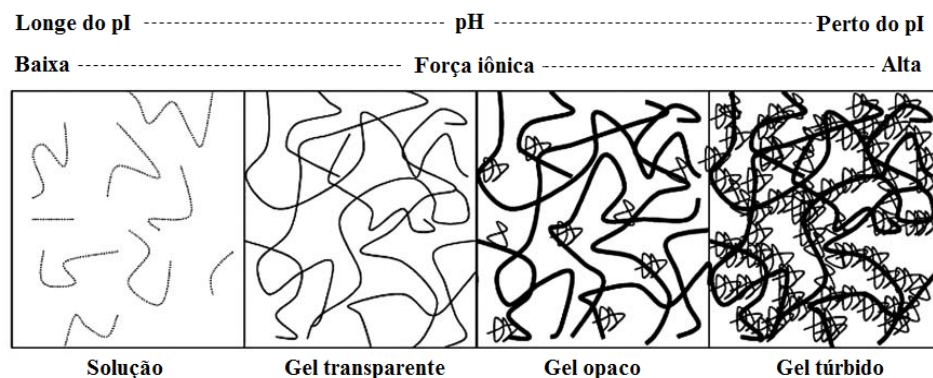


Figura 2 Aparência macroscópica de géis formados por proteínas de soro de leite, influenciada por pH e força iônica durante gelatinização

Fonte: Adaptado de Ramos et al. (2012)

Anker, Stading e Hermansson (1999) observaram mudanças no comportamento de filmes à base de WPI em pH 7, 8 e 9. A explicação desses diferentes comportamentos pode estar relacionada às alterações químicas na matriz polimérica induzidas pelo meio alcalino. Os autores observaram que o

conteúdo de umidade e a tensão na ruptura aumentaram quando o pH aumentou de 7 a 9, enquanto que a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) diminuiu. Eles concluíram, portanto, que é possível manipular propriedades específicas dos filmes WPI variando-se o pH.

Soares (2012) relatou variações na opacidade de filmes de WPC elaborados em pH 5,5, 6,7 e 8,5. Em pH 5,5, devido à baixa dispersão das proteínas no pI, filmes opacos foram obtidos. Em pH acima do pI (6,7 ou 8,5), a formação de agregados mais ordenados permitiu a passagem de luz pelo sistema e, conseqüentemente, géis mais transparentes foram obtidos. Já a solubilidade dos filmes não foi afetada pelas diferentes condições de preparação.

Anker, Stading e Hermansson (1998), ao estudarem as propriedades de filmes à base de  $\alpha$ -lactoglobulina e WPI concluíram que as propriedades mecânicas e de barreira de filmes são muito influenciadas pela concentração de proteínas e do plastificante utilizado (sorbitol), além dos valores de pH da solução filmogênica. Os autores relataram que, em pH 9, o módulo de Young e a tensão de ruptura não foram afetados pelas concentrações de  $\alpha$ -lactoglobulina, WPI e sorbitol. Em pH 7 e 8, módulo de Young e tensão de ruptura aumentaram com o aumento nas concentrações de  $\alpha$ -lactoglobulina e WPI. O alongamento na ruptura aumentou quando o pH passou de 7 para 9, sendo pronunciado esse efeito nos filmes de WPI. A permeabilidade ao vapor de água diminuiu e aumentou para pH 7 e 9, respectivamente, à medida que a concentração de  $\alpha$ -lactoglobulina e WPI aumentou.

Filmes à base de proteínas miofibrilares de peixe apresentaram comportamento similar aos filmes de soro de leite em diferentes valores de pH, conforme relatado por Shiku, Hamaguchi e Tanaka (2003), que avaliaram o comportamento dos filmes de proteínas obtidas da carne de marlin azul (*Makaira mazara*) em pH variando de 1 a 13. Segundo os autores, filmes foram formados apenas entre pH 2-3 e 7-12. Entre 4-6, em pH próximo ao pI das

proteínas, filmes não foram formados devido à baixa dispersão delas. Em relação às propriedades mecânicas, os valores de resistência à tração foram maiores em condições ácidas (pH 2,3) e alcalinas (pH 11, 12). Já a transparência foi maior nos filmes preparados em condições mais ácidas. Esses resultados podem ser explicados devido à maior estabilidade da rede proteica nos valores de pH extremos.

Segundo Anker, Stading e Hermansson (1999) o conteúdo de umidade, controlado pela concentração de plastificante adicionada, umidade relativa circundante e temperatura durante a secagem, também é um parâmetro importante a ser controlado na elaboração de filmes. Destaca-se nesse caso, o processo de secagem, que é um dos parâmetros mais críticos na preparação de filmes.

No caso dos filmes proteicos, as condições de secagem podem influenciar as propriedades finais dos materiais uma vez que as proteínas podem mudar sua estrutura em função dos parâmetros do processo. Particularmente no caso de filmes emulsificados, as condições de secagem podem influenciar a estabilidade das emulsões filmogênicas e, portanto, a estrutura final do filme (SOAZO; RUBIOLO; VERDINI, 2011a). Em geral, condições ambientes (por exemplo, 23°C e 50% de umidade relativa) parecem ser as ideais para se reduzir a formação de rachaduras nos filmes (ANKER; STADING; HERMANSSON, 1998). Isso acontece porque, segundo Ramos et al. (2012), a secagem rápida resulta em filmes mais rígidos, menos flexíveis, com menor efeito extensor aparente sobre a resistência à tração e alongamento. Essas alterações são atribuídas às alterações na morfologia dos filmes uma vez que filmes menos espessos são obtidos às altas taxas de secagem.

Soazo, Rubiolo e Verdini (2011a), ao avaliarem o efeito da temperatura de secagem (5 e 25°C) sobre as propriedades de filmes de WPC e cera de abelha observaram que filmes mais homogêneos foram obtidos quando a temperatura

de secagem foi de 5°C. Isso acontece porque o decréscimo na temperatura reduziu o fenômeno de migração lipídica nos filmes. Devido a maior homogeneidade dos filmes secos a baixas temperaturas, decréscimo significativo na permeabilidade ao vapor de água (WVP) foi observado. Além disso, nessas condições, as propriedades mecânicas de punctura e tração dos filmes foram mantidas.

Perez-Gago e Krochta (2000) por sua vez, observaram que as condições de secagem influenciaram significativamente a aparência de filmes de WPI/cera de abelha. Segundo esses autores, filmes secos a 25°C e 40° UR tiveram distribuição lipídica homogênea. Entretanto, quando secos a 40 e 80°C, a migração de lipídeos para as bordas do filme foi observada, sendo maior na temperatura de 80°C. As condições de secagem também tiveram efeito sobre a WVP. Os resultados indicaram que o aumento na temperatura de secagem formou filmes com menor WVP. Esse fato pode ser explicado pelo melhor arranjo e coesão da matriz que resultou em uma estrutura mais compacta do filme. Em relação às propriedades mecânicas, apesar das diferentes temperaturas de secagem não terem afetado as propriedades de tensão dos filmes, o alongamento na ruptura aumentou nas temperaturas maiores de secagem.

Em relação à adição de aditivos, sabe-se que as proteínas por si só, incluindo as proteínas do soro de leite, formam filmes frágeis e quebradiços, o que prejudica sua aplicação. Isso porque a combinação de pontes dissulfeto intermoleculares, ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas entre as cadeias proteicas levam à formação de fraturas nos filmes. Para contornar essa limitação, é usual a adição de plastificantes aos filmes. A água é o plastificante mais efetivo para materiais biopoliméricos. Outros compostos incluem glicerol, sorbitol e polietileno glicol (HERNÁNDEZ-IZQUIERDO; KROCHTA, 2008) que consistem de substâncias não voláteis de baixo peso molecular, capazes de reduzir as interações entre as cadeias proteicas (SOTHORNVIT; KROCHTA,

2000). Dessa maneira, os plastificantes funcionam como um enfraquecedor de forças intermoleculares entre cadeias poliméricas adjacentes. Isso resulta em um aumento na extensibilidade e flexibilidade do filme e decréscimo da elasticidade, resistência mecânica e propriedades de barreira (GOUNGA; XU; WANG, 2007). Porém, eles também aumentam a permeabilidade do filme, especialmente daqueles hidrofílicos, o que é indesejável do ponto de vista da qualidade de alimentos (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2000).

Ramos et al. (2013) avaliaram o efeito do tipo de proteína de soro de leite (WPC ou WPI) e teor de glicerol (40, 50 e 60% w/w em relação à massa do polímero) sobre propriedades estruturais, térmicas, mecânicas, ópticas e de barreira de filmes elaborados a partir desses ingredientes. Os autores observaram que os filmes de WPI exibiram menores conteúdos de umidade, solubilidade, atividade de água, permeabilidade ao vapor de água, oxigênio e gás carbônico, alterações nos parâmetros de cor, bem como maior densidade, hidrofobicidade superficial, resistência mecânica, elasticidade, extensibilidade e transparência quando comparados aos filmes de WPC. Além disso, com o aumento no teor de glicerol, observou-se aumento no conteúdo de umidade, solubilidade, permeabilidade e extensibilidade, acompanhado de decréscimo das propriedades térmicas, resistência mecânica e elasticidade, levando à obtenção de filmes mais frágeis.

Além da natureza dos aditivos adicionados, algumas alterações físicas e químicas podem ocorrer na estrutura de filmes devido à exposição deles durante o tempo de armazenamento a certas condições ambientais. Visando entender essas possíveis alterações, Osés et al. (2009) propuseram estudar o efeito do tempo de armazenamento sobre as propriedades mecânicas de filmes de WPI plastificados com glicerol e sorbitol. Os resultados indicaram que o glicerol proporcionou filmes com melhor flexibilidade e menor conteúdo de umidade, sendo considerado, portanto, o plastificante mais eficiente. Já o tempo de



armazenamento não afetou a aparência e as propriedades mecânicas dos filmes com glicerol. Contudo, os filmes com sorbitol se tornaram mais rígidos e menos flexíveis com o tempo devido à cristalização do plastificante.

Outro fator essencial para promover a formação de filmes com boas propriedades é a geleificação controlada pelo balanço entre as interações proteína-proteína e proteína-água. O parâmetro denominado *least concentration end point* (LCE) é a concentração mínima de proteína requerida para formar rede polimérica em uma dada condição. Gounga, Xu e Wang (2007) estudaram o efeito da concentração de WPI e glicerol na formação de filmes. Segundo estes autores, filmes intactos foram obtidos nas concentrações de 5, 7 e 9% de WPI. A concentração de WPI afetou propriedades como a permeabilidade ao oxigênio, que diminuiu com o aumento do WPI, e ao vapor de água, que aumentou com o aumento do WPI. O aumento nas proporções de glicerol, por sua vez, aumentou a permeabilidade ao oxigênio. Já o aumento na concentração do plastificante diminuiu a WVP. Esse resultado corrobora com estudos que afirmam que a concentração de plastificante normalmente aumenta a permeabilidade de filmes higroscópicos devido à reorganização da rede proteica e, conseqüentemente, aumento do volume intermolecular (CUQ et al., 1997). Entretanto, Gounga, Xu e Wang (2007) afirmam que a diminuição da WVP observada, pode ser explicada pelo fato de que o glicerol reduz as ligações de hidrogênio e aumenta o espaço intermolecular, reduzindo conseqüentemente a permeabilidade dos filmes.

Quanto às condições de processamento, estudos com proteínas de soro de leite afirmam que para formação de filmes, faz-se necessário a aplicação de tratamento térmico (em geral a 90°C por 30 min) para formação de rede intacta. Além da desnaturação, o calor expõe grupos sulfídricos, promovendo a formação de pontes dissulfeto (SHIMADA; CHEFTEL, 1998).

Pérez-Gago, Nadaud e Krochta (1999) avaliaram a influência das condições de processamento sobre filmes de WPI. Os autores avaliaram o efeito de filmes formados por proteínas nativas e desnaturadas pelo calor sobre a WVP, solubilidade e propriedades mecânicas. Os resultados obtidos mostram que os filmes formados por proteínas nativas foram totalmente solúveis em água enquanto que os de proteínas desnaturadas foram insolúveis. Os filmes que sofreram tratamento térmico também apresentaram maiores propriedades de tensão. Entretanto, nenhuma diferença entre os filmes foi observada em relação à WVP.

Schmid et al. (2014) por sua vez, examinaram como e em que extensão o grau de desnaturação de revestimentos à base de WPI afetam suas propriedades tecnológicas e funcionais. Os autores observaram que a desnaturação afetou significativamente a energia superficial, que decresceu aproximadamente 20% quando comparada a dos revestimentos com proteínas nativas. Já as propriedades de barreira ao vapor de água e oxigênio aumentaram por volta de 35% e 33%, respectivamente. Entretanto, diferenças significantes foram observadas entre revestimentos obtidos a partir de proteínas nativas e com 25% de desnaturação. O maior grau de desnaturação não promoveu melhorias nas propriedades do material. Segundo os autores, esse resultado é importante do ponto de vista econômico-ambiental uma vez que o processo de desnaturação pode ser conduzido em condições mais brandas ou rápidas, com menor gasto de energia.

A adição de macromoléculas ou partículas também é responsável pela alteração nas propriedades de filmes à base de proteínas. Estudos indicam que sais como cloreto de sódio ou cloreto de cálcio podem ser adicionados para melhorar a agregação de proteínas por seleção das cargas repulsivas dispersas e, no caso de íons divalentes, formação adicional de pontes salinas entre grupos carregados negativamente na proteína. O efeito da adição de íons de cálcio livres

e pré-encapsulados sobre as propriedades de filmes à base de WPI foram estudadas por Chai et al. (2010). Segundo os autores, o processo de formação do filme foi seriamente afetado pela agregação e gelatinização das proteínas ocasionadas quando 0,5% (w/w) de íons de cálcio livres foram adicionados em solução de WPI 8%. Quando os íons de cálcio foram encapsulados em micropartículas de WPI por *spray drying* e, em seguida adicionadas na mesma solução filmogênia preparada anteriormente, a concentração de cálcio no filme pode ser duplicada (1 % w/w) sem efeitos significantes sobre as propriedades físicas dos filmes.

### **2.3.2 Potencial de aplicação de filmes à base de proteínas do soro de leite**

Apesar de inúmeras pesquisas terem sido conduzidas nos últimos anos com o propósito de desenvolver filmes proteicos aptos para serem utilizados como materiais para embalagens, as propriedades físicas da maioria dos polímeros desenvolvidas até o momento são inferiores àquelas de filmes sintéticos como polietileno de baixa densidade (PBD), polietileno de alta densidade (PAD) ou celofane. Em termos de propriedades de barreira, filmes à base de proteínas apresentam permeabilidade ao vapor (PVA) de água maior comparada aos polímeros sintéticos devido à natureza hidrofílica dessas moléculas. As propriedades mecânicas desses filmes também são geralmente inferiores, isto é, os filmes proteicos são mais frágeis e apresentam menor alongamento do que filmes sintéticos (HERNÁNDEZ-IZQUIERDO; KROCHTA, 2008).

Porém, muitos estudos têm relatado êxito no desenvolvimento e aplicação de filmes à base de soro de leite para diversas aplicações. Li et al. (2011) desenvolveram e caracterizaram nanocompósitos de WPI adicionados de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, um óxido de metal inerte amplamente utilizado como

corante alimentício e que, devido à sua atividade fotocatalítica, confere proteção contra microrganismos deteriorantes e alergênicos na presença de radiação ultravioleta (UV). No estudo, os pesquisadores obtiveram filmes com boas propriedades como sensibilidade à luz, resistência mecânica e baixa WVP. Além disso, com a adição de 1% de  $\text{TiO}_2$ , o filme obtido foi capaz de bloquear mais de 70% da luz visível e mais de 90% da luz UV, sendo sua aplicação desejável em alimentos, principalmente aqueles susceptíveis à foto oxidação.

Mei e Zhao (2003) avaliaram o potencial de aplicação de filmes de WPI contendo altas concentrações de cálcio e vitamina E, de forma a obter filmes com propriedades nutracêuticas. No estudo foram avaliadas as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes. Os resultados permitiram concluir que os filmes desenvolvidos apresentam potencial de aplicação seja como envoltório ou revestimento, podendo melhorar o valor nutricional de alimentos. E apesar do comprometimento na WVP e nas propriedades de tensão dos filmes quando altas concentrações dos nutrientes foram incorporadas, é possível utilizar concentrações intermediárias que não comprometam as propriedades requeridas para o filme nem sua função nutracêutica.

Já Javanmard et al. (2008) investigaram o potencial de aplicação de revestimentos de WPC na manutenção da qualidade de amendoim. Para tanto, foram monitorados os parâmetros de absorção de umidade e atributos sensoriais do produto ao longo de 28 dias. Os resultados mostraram que a aplicação do revestimento melhorou parâmetros sensoriais como crocância e impressão global, reduziu o índice de peróxido, retardou o desenvolvimento do ranço e diminuiu a perda de peso dos amendoins. Sendo assim, o revestimento desenvolvido pode ser considerado uma alternativa viável no acondicionamento de amendoins e alimentos similares, podendo contribuir ainda para o aumento da vida de prateleira e melhoria nas propriedades sensoriais dos produtos.

Visando controlar a produção de toxinas produzidas por *Escherichia coli* em alimentos prontos para consumo, Pérez et al. (2014) desenvolveram filmes comestíveis de WPC contendo sorbato de potássio, um conservante reconhecido como seguro (GRAS), amplamente utilizado como agente fungistático e bacteriostático em alimentos. Segundo os pesquisadores, os resultados indicaram que o filme desenvolvido é uma alternativa efetiva, segura, ecológica e relativamente barata, que pode ser empregada pela indústria de alimentos no controle de microrganismos.

O potencial de aplicação de filmes de soro de leite e quitosana no aumento da vida de prateleira de ricota foi avaliado por Di Pierro et al. (2011). No estudo, os pesquisadores concluíram que o revestimento do queijo com o filme comestível foi capaz de reduzir o crescimento de microrganismos contaminantes e aumentar a vida de prateleira do produto em até 7 dias. Além disso, o revestimento retardou o desenvolvimento da acidez a níveis indesejáveis e manteve a textura do produto sem modificar suas características sensoriais. Os autores ressaltaram ainda o potencial de aplicação do revestimento desenvolvido em outros produtos lácteos.

Contudo, apesar dos potenciais de aplicação demonstrados na literatura, algumas limitações desses materiais ainda devem ser levadas em consideração visando ampliar os usos e garantir a segurança dos produtos acondicionados. Nesse sentido, vários métodos têm sido propostos para melhorar, principalmente as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes, sendo a utilização de formulações adequadas e condições de preparação apropriadas essenciais para o desenvolvimento de filmes de qualidade.

Recentemente, a incorporação de nanopartículas em filmes – formando o chamado nanocompósito - tem sido considerada uma abordagem promissora na melhoria de várias propriedades dos filmes, uma vez que, no nanocompósito

propriedades mecânicas, térmicas e de barreira são melhoradas (WIHODO; MORARU, 2013).

#### **2.4 Nanocompósitos para aplicação em embalagens para alimentos**

Rápidos avanços na nanotecnologia nos últimos anos abriram novas perspectivas para muitos setores industriais e de consumo, o que tem sido considerado como ponto de partida para uma nova revolução industrial. O termo refere-se à tecnologia empregada no desenvolvimento de produtos em escala nanométrica ( $10^{-9}\text{m}$ ), que têm propriedades distintas daquelas de produtos similares em escala macro. São destaques para a área de embalagem: nanocompósitos (nanoargilas e resinas), nanopartículas de carbono/nanotubos, óxidos e metais em escala nanométrica comercializados por fabricantes de resinas e de aditivos/cargas para embalagem (BRADLEY; CASTLE; CHAUDHRY, 2011; SARANTÓPOULOS; REGO, 2012).

Apesar dos benefícios projetados, o nível atual de aplicações da nanotecnologia nos setores de alimentos e afins ainda é novo e emergente na maioria dos países e, apesar de um aumento constante do número de produtos disponíveis, a grande maioria dos novos produtos ainda está em fase de pesquisa e desenvolvimento ou perto de sua inserção no mercado. De acordo com estimativas de mercado, aplicações ligadas a embalagens para alimentos compõem a maior fatia do mercado atual e prevista a curto prazo para os produtos no setor de alimentos que utilizam nanotecnologia. As áreas mais promissoras identificadas para crescimento são embalagens ativas e inteligentes, alimentos saudáveis e produtos funcionais (CHAUDHRY; CASTLE, 2011).

Além disso, como para a maioria dos polímeros biodegradáveis é requerida um aprimoramento em suas propriedades, principalmente as mecânicas e de barreira, as nanopartículas podem atuar melhorando os

biopolímeros nesse aspecto e, dessa forma eles podem competir com grande vantagem com os materiais derivados de fontes petroquímicas. Nesse sentido, um dos avanços mais promissores é o uso de materiais híbridos baseados em interações em escalas nanométricas entre polímeros e nanopartículas, denominado nanocompósitos (OSMAN; MITTAL; LUSTI, 2004).

Esses novos materiais apresentam propriedades mecânicas, térmicas e de barreira melhoradas, bem como propriedades antimicrobianas ou antioxidantes por exemplo, com grande potencial de aplicação na indústria de alimentos (Tabela 2) (LLORENS et al., 2012).

A maioria das aplicações de nanocompósitos em plásticos biodegradáveis utiliza de argilas laminares além de nanotubos de carbono e nanopartículas de metais e óxidos (LAGARON; LOPEZ-RUBIO, 2011).

Tabela 2 Aplicações dos nanocompósitos em embalagens para alimentos.

<b>Aplicação</b>	<b>Descrição</b>
Nanocompósitos	Incorporação de nanomateriais na matriz polimérica para melhorar propriedades físicas e de barreira, durabilidade e biodegradabilidade.
Nanorecobrimentos	Incorporação de nanomateriais sobre a superfície da embalagem (quer no interior ou na superfície exterior, ou como uma camada em um laminado), especialmente para melhorar as propriedades de barreira
Superfícies antimicrobianas	Incorporação de nanomateriais com propriedades antimicrobianas agindo na superfície da embalagem
Embalagens ativas	Incorporação de nanomateriais com propriedades antimicrobianas, antioxidantes ou funcionais, por exemplo, com liberação intencional e conseqüente efeito no alimento embalado.
Embalagens inteligentes	Incorporação de nanosensores para monitorar e reportar as condições do alimento.

Fonte: Adaptado de Bradley, Castle e Chaudhry (2011)

Moreira et al. (2013) desenvolveram nanocompósitos à base de pectina de alto e baixo grau de metoxilação incorporados de nanopartículas de hidróxido

de magnésio como reforçador. Os resultados obtidos evidenciaram que as nanopartículas melhoraram significativamente propriedades térmicas e mecânicas dos nanocompósitos, especialmente daqueles à base de pectina de baixo teor de metoxilação. Além disso, os autores ressaltaram o potencial de aplicação do nanocompósito em embalagens ativas já que o contato do filme com um alimento-teste promoveu a migração do hidróxido de magnésio para a matriz do alimento. O estudo propõe, portanto, uma alternativa para enriquecer nutricionalmente os alimentos por meio da migração.

Dias et al. (2013) desenvolveram filmes à base de acetato de celulose incorporados de alil isotiocianato e nanotubos de carbono. Segundo os autores, a incorporação de nanotubos de carbono foi importante para melhorar as propriedades mecânicas do filme, principalmente o parâmetro de alongamento na ruptura. Além disso, a nanopartícula foi capaz de reter o alil isotiocianato no filme, já que esse é um composto volátil. Sendo assim, o uso de nanopartículas como nanotubos de carbono é uma alternativa eficaz para proteger e controlar a liberação de compostos voláteis, aumentando a eficácia e estabilidade dos filmes quando aplicados em alimentos, além de melhorar a performance do material.

De fato, nanoreforçadores para polímeros biodegradáveis têm provado ser uma forma eficaz de melhorar propriedades simultaneamente. Porém, mesmo sabendo que a utilização das nanopartículas resulta em materiais com propriedades melhoradas, mais pesquisas são necessárias para entender melhor como plastificantes, biomacromoléculas e nanopartículas interagem para dar origem a materiais com potencial melhorado, barreira e propriedades estruturais e com ampla gama de aplicabilidade. Além do mais, a possibilidade de utilização de nanocompósitos para obtenção de materiais de fontes renováveis com longa estabilidade ao longo do armazenamento e úteis para aplicação em embalagens para alimentos ainda precisa ser investigada (MENSITIERI et al., 2011).



Levando em consideração o potencial de aplicação da montmorilonita (MMT), que é um dos materiais inorgânicos mais utilizados para esse fim devido à sua biodegradabilidade e disponibilidade em grandes quantidades a custos relativamente baixos, sendo capaz melhorar propriedades de filmes à base de biopolímeros, além de ser considerada “Generally Recognized As Safe” (GRAS) pela U.S Food and Drug Administration (FDA; 21CFR184.1155), sendo viável sua utilização em filmes para o acondicionamento de alimentos, o detalhamento das propriedades dessas nanopartículas bem como sua utilização em nanocompósitos serão apresentados a seguir.

#### **2.4.1 Nanopartículas de montmorilonita**

Os silicatos em camadas mais usuais para a preparação de nanocompósitos pertencem à família denominada silicatos em camadas 2:1, ou filosilicatos. A estrutura cristalina dessas partículas consiste de camadas formadas por dois átomos de sílica coordenados em forma de tetraedro fundidos a uma camada periférica de alumínio ou hidróxido de magnésio. Montmorilonita (MMT), hectorita e saponita são os principais exemplos dessa classe de silicatos. Dois tipos de grupos substituintes são observados nessas estruturas: tetraédrica e octaédrica. Na estrutura tetraédrica a carga negativa está localizada na superfície das camadas de silicato e assim, a matriz polimérica pode interagir mais rapidamente com esse tipo de estrutura do que com a estrutura octaédrica, onde as cargas estão localizadas no interior da estrutura (RAY; BOUSMINA, 2005).

A MMT consiste de uma rede cristalina de 1 nm de espessura composta por camadas estruturais constituídas por duas folhas tetraédricas de sílica e uma folha central octaédrica de alumina (Figura 3). O empilhamento dessas camadas forma um *gap*, ou uma “lacuna de Van der Waals”. As lâminas são carregadas

negativamente e o equilíbrio de cargas é obtido por cátions alcalinos como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  ou  $\text{Ca}^{2+}$  (RAY; OKAMOTO, 2003).

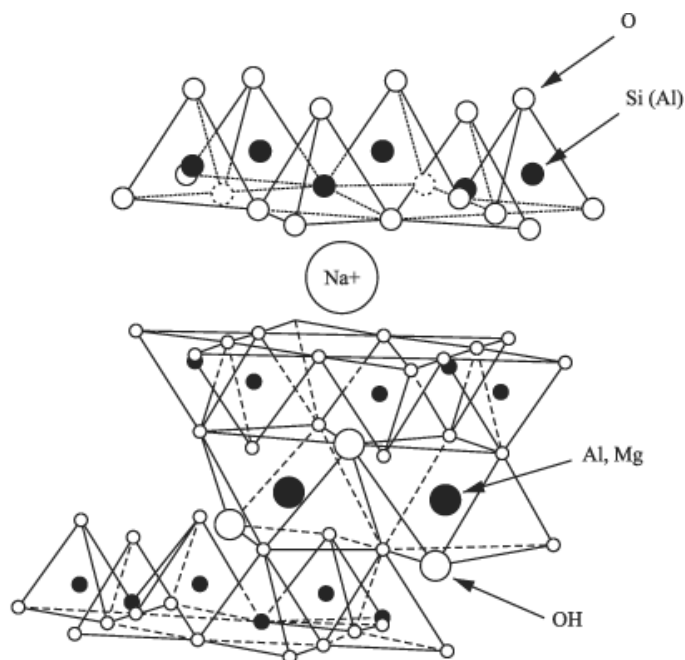


Figura 3 Estrutura química da montmorilonita  
Fonte: Ray e Okamoto (2003)

A principal explicação para a melhoria no desempenho observado em nanocompósitos incorporados de MMT é a forte interação interfacial entre a matriz polimérica e o argilo mineral, devido à grande área superficial entre as camadas da nanopartícula. Em relação à magnitude da interação entre nanopartícula e polímero, estruturalmente dois tipos de nanocompósitos são obtidos de acordo com as condições termodinâmicas dos mesmos (Figura 4): (i) nanocompósitos intercalados, onde a inserção das cadeias poliméricas na estrutura mineral ocorre de forma regular, cristalograficamente, independente da concentração da MMT e a uma distância constante de poucos nanômetros; (ii) nanocompósitos exfoliados na qual as camadas de silicato são separadas pela

matriz polimérica por uma distância média que depende proporcionalmente da carga de MMT adicionada (RAY; BOUSMINA, 2005).

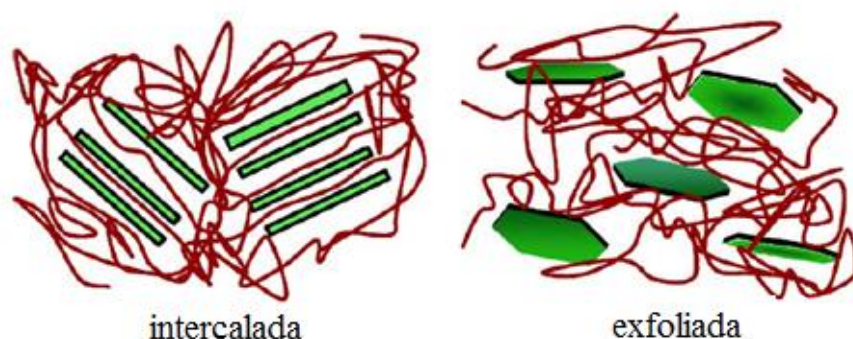


Figura 4 Representação esquemática dos dois tipos de nanocompósitos de polímero/silicato em camadas possíveis de serem obtidos termodinamicamente

Fonte: Ray e Okamoto (2003)

Muitos estudos com nanocompósitos à base de biopolímeros e MMT têm sido investigados nos últimos anos e, em geral, melhorias simultâneas em propriedades, principalmente mecânicas, térmicas e de barreira são observadas.

Sothornvit et al. (2010) concluíram que a resistência à tração e o alongamento na ruptura de nanocompósitos à base de isolado proteico de soro de leite adicionados de MMT (Cloisite® Na<sup>+</sup>) ou MMT organicamente modificada (Cloisite® 30B e 20A), não foram modificadas com o aumento da concentração das nanopartículas, apesar desses parâmetros terem sido reduzidos nos nanocompósitos com Cloisite® 20A. Além disso, a permeabilidade ao vapor de água de todos os nanocompósitos foi significativamente menor à permeabilidade dos filmes sem MMT.

Abdollahi, Rezaei e Farzi (2012), por sua vez, avaliaram o efeito da adição de MMT e óleo essencial de alecrim sobre a matriz polimérica de quitosana. A incorporação de MMT nos níveis testados (1 a 5% w/w), além de

melhorar a capacidade de retenção de água, diminuiu a permeabilidade e a solubilidade dos filmes em mais de 50%. Além disso, os autores observaram melhorias nas propriedades mecânicas de resistência à tração e alongamento na ruptura.

Dias et al. (2014) também estudaram o efeito da incorporação de MMT em filmes de quitosana e os resultados indicaram que a incorporação da nanopartícula resultou em filmes com menor permeabilidade ( $3,48 \times 10^{-11}$  g/m.s.Pa), maior hidrofobicidade ( $\Delta G_{\text{hidrof.}} [7,93 - 59,54]$  m.J.m<sup>-2</sup>) e menor umidade no equilíbrio.

Filmes à base de metilcelulose, carvacrol e MMT foram avaliados por Tunç e Duman (2011). Segundo esses autores, o aumento na concentração de MMT promoveu decréscimo na liberação de carvacrol dos filmes a 25°C e 60% de umidade relativa. Esse resultado indica a capacidade da MMT em controlar a liberação do composto ativo, o que é desejável do ponto de vista da estabilidade do filme ao longo da vida útil do alimento embalado. Alterações na espessura e opacidade, bem como melhoria na estabilidade térmica dos filmes também foram observadas devido à incorporação de MMT.

Sendo assim, como materiais à base de biopolímeros apresentam inúmeras aplicações e a adição de MMT melhora essas propriedades e, conseqüentemente o potencial de aplicação industrial desses materiais, estudos visando entender melhor as interações entre polímeros e MMT devem ser conduzidos, permitindo assim melhor compreensão do potencial de aplicação desses filmes na indústria de alimentos (WAKAI; ALMENAR, 2015).

## 2.5 Incorporação de agentes ativos em embalagens para alimentos

Embora as embalagens tradicionais tenham contribuído grandemente com os primeiros desenvolvimentos do sistema de distribuição de alimentos, elas não são suficientes para atender às novas exigências dos consumidores por produtos mais próximos ao natural, contendo menos conservantes e que sejam seguros (YAM; TAKHISTOV; MILTZ, 2005). Assim, novas tecnologias de embalagens vêm sendo desenvolvidas em resposta a essa demanda (DAINELLI et al., 2009).

Nesse sentido, surge o conceito de embalagens ativas, que são sistemas que mudam a condição de acondicionamento do alimento para estender sua vida útil ou aumentar sua segurança ou propriedades sensoriais, mantendo a qualidade do produto. Essa definição foi preconizada pelos participantes da European FAIR project CT-98-4170 “*Evaluating safety, effectiveness, economic-environmental impact and consumer acceptance of active and intelligent packagings*” (SOARES et al., 2004).

O princípio ativo pode estar associado às características intrínsecas dos polímeros de que é feita ou provir de aditivos incorporados. São exemplos de embalagens ativas: absorvedores de oxigênio, de CO<sub>2</sub>, de etileno, absorvedores/controladores de umidade, absorvedores de odores, removedores de colesterol, emissores de etanol, de CO<sub>2</sub>, de SO<sub>2</sub>, de aromas, filmes antimicrobianos, antioxidantes, embalagens autoaquecíveis (self-heating) e embalagens bioativas (SARANTÓPOULOS; REGO, 2012).

Os nutracêuticos são uma categoria de compostos que têm recebido grande atenção recentemente, tanto pela comunidade científica como pela indústria e mercado de alimentos. Além dos antioxidantes, incluem na categoria de nutracêuticos vitaminas, culturas probióticas, prebióticos peptídeos bioativos entre outros, cujos benefícios à saúde já foram evidenciados por pesquisas

científicas. Apesar da atenção que a incorporação dessas substâncias em embalagens vem recebendo, muitos dos polímeros sintéticos empregados como carreadores não são adequados para aplicação em alimentos, seja devido ao custo de produção ou incompatibilidade com a matriz alimentar (incluindo efeitos organolépticos indesejáveis). Nesse sentido, um número considerável de pesquisas tem desenvolvido com sucesso filmes biodegradáveis comestíveis ou não incorporados de compostos nutracêuticos de forma a aumentar o valor nutricional dos alimentos ou proporcionar determinada atividade bioativa (RAMOS et al., 2012).

Akthar et al. (2012) desenvolveram filmes funcionais comestíveis de hidroxipropil metilcelulose (HPMC) incorporados de betacianina, uma molécula natural antioxidante de coloração vermelha. Segundo os autores, além da coloração atrativa, os filmes desenvolvidos apresentaram estabilidade à luz e atividade antioxidante, sendo capazes, portanto, de proporcionar efeitos benéficos à saúde e/ou prevenir a oxidação do alimento embalado.

Filmes à base de quitosana foram utilizados como matriz para incorporação de compostos bioativos de diferentes pesos moleculares (peptídeos de proteína de soro de leite hidrolisado, glicomacropéptídeos e lactoferrina) (BOURBON; PINHEIR; CERQUEIRA, 2011). Os resultados indicaram que a incorporação das moléculas diminuiu a permeabilidade ao vapor de água e aumentou a resistência à tração e alongamento na ruptura dos filmes, indicando o potencial de aplicação desses filmes como embalagens ativas.

Domenek et al. (2013) desenvolveram filmes antioxidantes de ácido polilático (PLA)/lignina por extrusão seguida de termocompressão. Os resultados indicaram que a lignina foi bem dispersa na matriz polimérica, as propriedades mecânicas foram ligeiramente diminuídas e a permeabilidade aumentada com a incorporação da lignina. Além disso, os filmes apresentaram atividade antioxidante e a lignina foi capaz de migrar para alimentos gordurosos,

o que representa potencial de utilização dessas embalagens na prevenção da oxidação lipídica de alimentos.

### 2.5.1 Licopeno

O licopeno é uma molécula antioxidante pertencente à classe dos carotenoides, encontrada em altas concentrações em alimentos de coloração vermelha como tomate, melancia, mamão e goiaba (RODRIGUES-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). No tomate, o teor de licopeno pode variar de 0,9 a 4,2 mg/100g do fruto, dependendo da variedade, enquanto que em outros vegetais essas concentrações são menores (KESSEY; ZHANG; ZHANG, 2011).

Carotenoides são um dos principais grupos de pigmentos naturais, representado por aproximadamente 600 estruturas e que apresentam coloração que varia do amarelo ao vermelho, podendo ser encontrados em vegetais, animais e microrganismos (FRASER; BRAMLEY, 2004). Quimicamente eles são definidos como tetraterpenoides de 40 carbonos, formados pela união de oito unidades isoprenoides de cinco carbonos, caracterizando uma molécula linear e simétrica, com a ordem invertida na posição central. A extensa cadeia de ligações duplas conjugadas proporcionam a essas moléculas alta reatividade e capacidade de absorção de luz na região do visível – cromóforo –, conferindo a muitos alimentos as colorações amarela, laranja e vermelha. Na natureza eles são encontrados, principalmente na forma mais estável: *all-trans*, porém isômeros *cis* podem ocorrer (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; VALDUGA et al., 2009). Segundo Kessy, Zhang e Zhang (2011), o licopeno é naturalmente encontrado na forma de seu isômero geométrico, sendo mais de 90% na configuração *trans*, a forma termodinamicamente mais estável.

A alta reatividade química dessas moléculas também é a responsável pela propriedade antioxidante desempenhada por elas, fator-chave na redução de diversas doenças, pois os tornam altamente eficazes no combate aos radicais livres. Ressalta-se que o poder antioxidante aumenta com o aumento do número de ligações duplas conjugadas da molécula, sendo o licopeno, considerado o carotenoide de maior poder antioxidante por possuir 11 ligações duplas conjugadas em sua molécula (Figura 5) (FRASER; BRAMLEY, 2004).

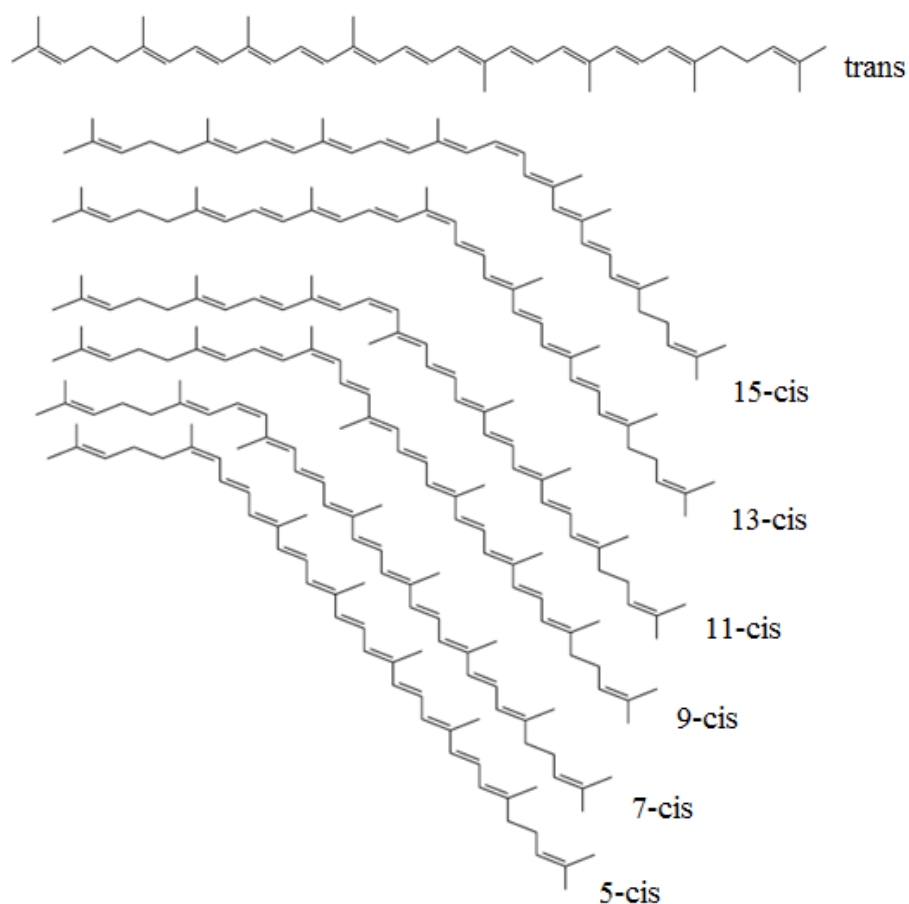


Figura 5 Estrutura química da molécula de licopeno trans e seus isômeros geométricos



A atividade antioxidante do licopeno tem sido extensivamente avaliada com base na sua capacidade de inativar radicais livres em culturas de células e modelos animais. Evidências experimentais também indicam que o licopeno é capaz de inativar o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), radicais livres de dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2\bullet$ ), tiol ( $\text{RS}\bullet$ ) e sulfonil ( $\text{RSO}_2\bullet$ ). O possível mecanismo no qual carotenoides como o licopeno inativam o oxigênio singlete é o seguinte: durante a reação, a energia da molécula do radical é transferida para a molécula de licopeno, convertendo-o para seu estado energético triplet. A inativação com outros radicais como espécies reativas de oxigênio (ROS), (hidroxilas) OH,  $\text{NO}_2\bullet$  ou peroxidonitrito leva ao rompimento oxidativo da molécula de licopeno. Nesse caso, o licopeno pode ser efetivo na proteção contra lipídeos, proteínas e DNA oxidados (GAJOWIK; DOBRZYNSKA, 2014).

A alta reatividade das moléculas de licopeno, entretanto, implica na fácil isomerização e oxidação das moléculas, principalmente quando submetidos a condições não controladas de processamento e/ou estocagem, mais especificadamente em produtos naturais (frutas). Além disso, o calor, a luz, o oxigênio e enzimas como a lipoxigenase e/ou ácidos presentes em frutas levam a alterações ou parcial destruição dos pigmentos. A exposição destes a esses agentes resulta na formação de isômeros *cis* e epóxidos, além da diminuição da cor, perda da atividade antioxidante e quebra da cadeia (GOODWIN, 1981).

Entretanto, alguns estudos sugerem que a isomerização da forma *trans*, naturalmente presente nos alimentos, para a forma *cis*, pode aumentar a biodisponibilidade desses compostos no organismo, devido, principalmente, à maior solubilidade dos isômeros *cis* nos lipídeos e micelas do ácido biliar (LAMBELET et al., 2009; SINGH; GOYAL, 2008).

Ferreira e Rodriguez-Amaya (2008) propuseram estudar a degradação de licopeno em dois sistemas-modelo (de baixa umidade e aquoso) e em goiaba liofilizada em condições ambientes ( $25^\circ\text{C}$ ) na presença ou ausência de luz.

Segundo os autores, a degradação do carotenoide seguiu cinética de primeira ordem para todas as condições testadas e a luz foi o fator que mais promoveu a oxidação. Além disso, a susceptibilidade à degradação foi muito menor na goiaba liofilizada do que nos sistemas-modelo, o que comprova o efeito protetor da matriz do alimento.

A estabilidade do licopeno durante aquecimento e exposição à luz foi estudada por Lee e Chen (2002). Os autores executaram vários passos de pré-tratamento em amostras padrão de *trans*-licopeno que incluíam aquecimento às temperaturas de 50, 100 e 150°C por até 100 horas e iluminação em intensidade que variou de 2000-3000 lux (25°C) por até 5 dias. As análises indicaram que a degradação total do licopeno (isômeros *cis* e *trans*) seguiu cinética de primeira ordem para todos os fatores em estudo. A 50°C, a isomerização foi o evento principal durante as 9 primeiras horas, porém, a degradação foi predominante no período subsequente. A 100°C e 150°C, a degradação ocorreu mais rapidamente que a isomerização, enquanto que, durante a incidência de luz, a isomerização foi a principal reação.

Portanto, levando em consideração que na incorporação de compostos bioativos, como o licopeno, em matrizes poliméricas é imprescindível a manutenção da estabilidade do composto ao longo do processamento dos filmes, embalagem e armazenamento dos produtos, trabalhar dentro de parâmetros adequados é essencial em todas as etapas de processamento. Isso porque, para que a integridade e atividade funcional dos filmes sejam mantidas, seja para benefício do alimento, na prevenção da oxidação dos componentes da matriz alimentar ou para benefício do consumidor, na promoção da atividade antioxidante e prevenção de doenças, é fundamental que as substâncias incorporadas estejam em sua forma ativa.

Outro ponto fundamental que deve ser levado em consideração no desenvolvimento de embalagens bioativas é a efetividade do composto ativo em

proporcionar os benefícios esperados. Isso está diretamente relacionado à concentração incorporada no filme. Esta deve ser suficiente para proporcionar ação antioxidante durante a vida útil do produto e/ou proporcionar efeito funcional ao consumidor ao ingerir o alimento.

Para o licopeno não existe valor que estabeleça as quantidades de ingestão diária recomendada como acontece com vitaminas e minerais. Isso acontece porque os estudos são muito controversos em relação às concentrações capazes de proporcionar efeitos benéficos. Segundo Bojórquez, Gallego e Collado (2013), a ingestão média do composto pela população também é um número controverso, mas estima-se que esteja em torno de 5 a 7 mg/dia.

Estudo conduzido por Aust et al. (2005) demonstrou que a ingestão de extrato de tomate (40 g/dia, equivalente a 16 mg de licopeno/dia) durante 10 semanas levou ao aumento dos níveis séricos de licopeno e de carotenoides totais na pele. Após 10 semanas, também se observou efeitos fotoprotetores em decorrência da suplementação do carotenoide.

Lorenz et al. (2012) também demonstraram efeitos funcionais que a suplementação com 5 mg de licopeno por Kg de peso corporal por 4 semanas proporcionou ao grupo de coelhos em estudo. Os autores constaram que o licopeno diminuiu significativamente o colesterol total e LDL-c sanguíneo dos grupos que receberam a suplementação, em comparação ao grupo controle.

A efetividade do nutracêutico em promover efeitos fisiológicos depende ainda da biodisponibilidade do composto. De acordo com a Food and Drug Administration - FDA (2014) define-se biodisponibilidade como a velocidade ou a extensão que um composto ativo ou uma porção de uma molécula ativa oriunda do alimento ingerido é absorvido pelo organismo e se torna ativo no local de ação. Como a definição implica a taxa de absorção e a disponibilidade no local de ação é de extrema importância para que um composto bioativo seja efetivo no sistema biológico e conseqüentemente, biodisponível. Logo, é

essencial entender a absorção e biodisponibilidade de nutrientes e substâncias bioativas, como os compostos fenólicos, antes de se prever sua potencial atividade biológica.

Sendo assim, mesmo que um composto apresente grande potencial antioxidante ou outra atividade biológica *in vitro*, este vai exercer pouca atividade biológica *in vivo* caso ele não atinja o tecido-alvo (ARCHIVIO et al., 2010).

Em humanos, os níveis séricos de licopeno aumentam significativamente após o consumo de alimentos derivados do tomate ou de suplementação. Entretanto, nem todas as fontes de licopeno são igualmente biodisponíveis. Quando ingeridos na sua forma natural *trans*, como a maior parte encontrada no tomate, o licopeno é muito pouco absorvido enquanto que o processamento térmico controlado de tomates e derivados induz a isomerização para a configuração *cis*, aumentando assim a biodisponibilidade. No plasma humano, o licopeno total compreende uma mistura de isômeros sendo 40% a 50% deles na forma *cis* (GAJOWIK; DOBRZYNSKA, 2014).

Portanto, para a manutenção das moléculas de licopeno em sua forma estável e ativa o processamento e síntese de filmes ativos devem incluir alguns mecanismos de proteção que preservem a forma ativa da molécula até o momento de consumo do produto (RAMOS et al., 2012).

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A última década foi marcada pelo esforço conjunto de governo, indústria e sociedade para reduzir a quantidade de resíduos gerados por embalagens sintéticas. Dessa forma, a busca por novos produtos e processamento capazes de substituir materiais plásticos sintéticos e a dependência pelas fontes petroquímicas tem ganhado cada vez mais destaque no contexto científico.

Polímeros biodegradáveis como as proteínas do soro de leite são considerados uma boa alternativa aos plásticos derivados de petróleo devido à boa capacidade desses materiais em formar filmes, muitos deles de natureza comestível. Esses filmes apresentam boa capacidade de carrear em sua matriz filmogênica agentes funcionais como antimicrobianos, antioxidantes e nutracêuticos, sem que haja comprometimento significativo sobre propriedades mecânicas e de barreira dos filmes.

Entretanto, quando comparados aos filmes plásticos sintéticos, algumas deficiências em relação às propriedades físicas são observadas, o que limita a aplicação industrial desses biomateriais. Uma alternativa a essas limitações, contudo, é a adição de nanopartículas aos filmes, formando os nanocompósitos. Nanocompósitos adicionados de silicatos em camadas, como a montmorilonita, tem apresentado algumas vantagens em relação a compósitos convencionais, isto é, propriedades mecânicas e de barreira melhoradas e aumento da estabilidade térmica.

Portanto, tanto a tecnologia de incorporação de agentes ativos como nutracêuticos, quanto à síntese de nanocompósitos são alternativas que vêm sendo investigadas com sucesso em diversas pesquisas. Além de serem tecnologias limpas e seguras, elas podem contribuir para agregar valor em eventuais aplicações comerciais.

## REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M.; REZAEI, M.; FARZI, G. A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 111, n. 2, p. 343–350, 2012

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.

ALMASI, H.; GHANBARZADEH, B.; ENTEZAMI, A. A. Physicochemical properties of starch-CMC-nanoclay biodegradable films. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 46, n. 1, p. 1–5, 2010.

ANKER, M.; STADING, M.; HERMANSSON, A. Effects of pH and the gel state on the mechanical properties, moisture contents, and glass transition temperatures of whey protein films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, p. 1878–1886, 1999.

ANKER, M.; STADING, M.; HERMANSSON, A. Mechanical properties, water vapor permeability and moisture contents of -lactoglobulin and whey protein films using multivariate analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 1820–1829, 1998.

ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. Barueri: Manole, 2003.

ARCAN, I.; YEMENICIOĞLU, A. Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials. **Food Research International**, Essex, v. 44, n. 2, p. 550–556, 2011.

ARCHIVIO, M. et al. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 11, n. 4, p. 1321-1342, 2010.

ARRIAGA, T. V. **Controlled and tailored denaturation and aggregation of whey proteins**. 2011. 174 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) – Instituto Superior Técnico, Lisboa, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO PLÁSTICO. Indústria brasileira de transformação de material plástico: perfil 2013. São Paulo, 2013.

AUST, O. et al. Supplementation with tomato-based products increases lycopene, phytofluene and phytoene levels in human serum and protects against UV-light-induced erythema. **International Journal of Vitamins and Nutrition Research**, Bern, v. 75, n. 1, p.54-60, 2005.

BOJÓRQUEZ, R. M. C.; GALLEGU, J. G.; COLLADO, P. S. Propiedades funcionales y beneficios para la salud del licopeno. **Nutrición Hospitalaria**, Madrid, v. 28, n. 1, p. 6–15, 2013.

BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; CERQUEIRA, M. A.; et al. Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 106, n. 2, p. 111–118, 2011.

BRADLEY, E. L.; CASTLE, L.; CHAUDHRY, Q. Applications of nanomaterials in food packaging with a consideration of opportunities for developing countries. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 22, n. 11, p. 604–610, 2011.

CHAI, Z. et al. Effects of the free and pre-encapsulated calcium ions on the physical properties of whey protein edible film. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 45, n. 7, p. 1532–1538, 2010.

CHAUDHRY, Q.; CASTLE, L. Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 22, n. 11, p. 595–603, 2011.

CINELLI, P. et al. Whey protein layer applied on biodegradable packaging film to improve barrier properties while maintaining biodegradability. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v. 108, p. 151–157, 2014.

CORTEZ-VEGA, W. R. et al. Biofilmes nanocompósitos obtidos de isolado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*) e Montmorilonita: avaliação das propriedades físicas, mecânicas e de barreira. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 90-98, abr./jun. 2013.

CUQ, B. et al. Relative humidity and temperature effects on mechanical and water vapor barrier properties of myofibrillar protein-based films. **Polymer Gels and Networks**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 1–15, 1997.

DAINELLI, N. et al. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 19, n. 2008, p. 103–112, 2009.

DIAS, M. V. et al. Development of chitosan/montmorillonite nanocomposites with encapsulated  $\alpha$ -tocopherol. **Food Chemistry**, London, v. 165, p. 323–329, 2014.

DIAS, M. V. et al. Use of allyl isothiocyanate and carbon nanotubes in an antimicrobial film to package shredded, cooked chicken meat. **Food Chemistry**, London, v. 141, n. 3, p. 3160–3166, 2013.

DI PIERRO, P. et al. Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 44, n. 10, p. 2324–2327, 2011.

DISSANAYAKE, M. **Modulation of functional properties of whey proteins by microparticulation**. 2011. 285 p. Thesis (Doctorat of Philosophy) - Victoria University, Melbourne, 2011.

DOMENEK, S. et al. Potential of lignins as antioxidant additive in active biodegradable packaging materials. **Journal of Polymers and the Environment**, Heidelberg, v. 21, n. 3, p. 692–701, 2013.

FERREIRA, J. E. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Degradation of Lycopene and  $\beta$ -carotene in Model Systems and in Lyophilized Guava during Ambient Storage: Kinetics, Structure, and Matrix Effects. **Food Chemistry**, London, v. 78, n. 8, p. 589–594, 2008.

FITZSIMONS, S. M.; MULVIHILL, D. M.; MORRIS, E. R. Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 638–644, 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bioavailability and bioequivalence requirements**. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov>>. Acesso em: 19 maio 2014.



FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 228–65, 2004.

GAJOWIK, A.; DOBRZYŃSKA, M. M. Lycopene - Antioxidant activity with radioprotective and anticancer properties. a review. **Roczniki Panstwowego Zarladu Higieny**, Warszawa, v. 65, n. 4, p. 263–271, 2014.

GIROUX, H. J.; GRANDPRÉ, G.; FUSTIER, P.; et al. Production and characterization of Cheddar-type cheese enriched with green tea extract. **Dairy Science & Technology**, Les Ullis, v. 93, n. 3, p. 241–254, 2013.

GOODWIN, T. W. **Biochemistry of the carotenoids**: biosynthesis. London: Chapman and Hall, 1981.

GOUNGA, M. E.; XU, S. Y.; WANG, Z. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 83, n. 4, p. 521–530, 2007.

GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Thermal and mechanical properties of soy protein films processed at different pH by compression. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 100, n. 2, p. 261–269, 2010.

GUTIÉRREZ, M. Q. 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.

HERNANDEZ-IZQUIERDO, V. M.; KROCHTA, J. M. Thermoplastic processing of proteins for film formation--a review. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, n. 2, p. 30–39, 2008.

HONG, S. I.; KROCHTA, J. M. Oxygen barrier performance of whey-protein-coated plastic films as affected by temperature, relative humidity, base film and protein type. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 77, n. 3, p. 739–745, 2006.

JAVANMARD, M. Effect of Whey Protein Edible Film Packaging on the Quality and Moisture Uptake of Dried Peanuts. **Journal of Food Process Engineering**, Westport, v. 31, n. 4, p. 503–516, 2008.

JIANG, Y. et al. Study of the physical properties of whey protein isolate and gelatin composite films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, n. 8, p. 5100–5108, 2010.

KADAM, D. M. et al. Preparation and characterization of whey protein isolate films reinforced with porous silica coated titania nanoparticles. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 117, n. 1, p. 133–140, 2013.

KESSY, H. H.; ZHANG, H.; ZHANG, L. A study on thermal stability of lycopene in tomato in water and oil food systems using response surface methodology. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 46, p. 209–215, 2011.

LAGARON, J. M.; LOPEZ-RUBIO, A. Nanotechnology for bioplastics: opportunities, challenges and strategies. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 22, n. 11, p. 611–617, 2011.

LAMBELET, P. et al. Improving the stability of lycopene Z-isomers in isomerized tomato extracts. **Food Chemistry**, London, v. 112, p. 156–161, 2009.

LEE, M. T.; CHEN, B. H. Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. **Food Chemistry**, London, v. 78, p. 425–432, 2002.

LI-JUAN, F. et al. The effects of Lycopene on the Methylation of the GSTP1 promoter and global methylation in prostatic cancer cell lines PC3 and LNCaP. **International Journal of Endocrinology**, New York, p. 1–9, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ije/2014/620165/>>. Acesso em: 21 jan. 2015.

LI, Y. et al. Fabrication and characterization of TiO<sub>2</sub>/whey protein isolate nanocomposite film. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 1098–1104, 2011.

LLORENS, A. et al. Study of the antifungal potential of novel cellulose/copper composites as absorbent materials for fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 158, n. 2, p. 113–119, 2012.

LOPEZ-RUBIO, A. et al. Overview of Active Polymer-Based Packaging Technologies for Food Applications. **Food Reviews International**, New York, v. 20, n. 4, p. 357–387, 2004.

LOPEZ-RUBIO, A.; GAVARA, R.; LAGARON, J. M. Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 17, n. 10, p. 567–575, 2006.

LORENZ, M. et al. Effects of Lycopene on the Initial State of Atherosclerosis in New Zealand White ( NZW ) Rabbits. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2012.

MARA, S.; FRANCHETTI, M.; MARCONATO, C. Polímeros biodegradáveis - uma solução parcial para diminuir a quantidade de resíduos plásticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 811–816, 2006.

MEI, Y.; ZHAO, Y. Barrier and mechanical properties of milk protein-based edible films containing nutraceuticals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 1914–1918, 2003.

MENSITIERI, G. et al. Processing and shelf life issues of selected food packaging materials and structures from renewable resources. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 22, n. 2-3, p. 72–80, 2011.

MOREIRA, F. K. V. et al. Nutraceutically Inspired Pectin – Mg(OH) 2 Nanocomposites for Bioactive Packaging Applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, p. 7119–7119, 2013.

ONWULATA, C. I.; KONSTANCE, R. P.; TOMASULA, P. M. Minimizing variations in functionality of whey protein concentrates from different sources. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 3, p. 749–756, 2004.

OSÉS, J. et al. Stability of the mechanical properties of edible films based on whey protein isolate during storage at different relative humidity. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 125–131, 2009.

OSMAN, M. A.; MITTAL, V.; LUSTI, H. R. The aspect ratio and gas permeation in polymer-layered silicate nanocomposites. **Macromolecules**, Washington, v. 25, p. 1145–1149, 2004.

PEREZ-GAGO, M. B.; KROCHTA, J. M. Drying temperature effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein - lipid emulsion films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 7, p. 2687–2692, 2000.

PÉREZ-GAGO, M. B.; NADAUD, P.; KROCHTA, J. M. Water vapor permeability, solubility, and tensile properties of heat-denatured. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 64, n. 7326, p. 1034–1037, 1999.

PÉREZ, L. M. et al. Effect of pH on the effectiveness of whey protein/glycerol edible films containing potassium sorbate to control non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ready-to-eat foods. *Food Control*, Vurrey, v. 37, p. 298–304, 2014.

RAMOS, O. L. et al. Edible films and coatings from whey proteins: a review on formulation, and on mechanical and bioactive properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 52, n. 6, p. 533–552, 2012.

RAMOS, O. L. et al. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 110–122, 2013.

RAY, S.; BOUSMINA, M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. **Progress in Materials Science**, London, v. 50, n. 8, p. 962–1079, 2005.

RAY, S.; OKAMOTO, M. Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. **Progress in Polymer Science**, Elmsford, v. 28, n. 11, p. 1539–1641, 2003.

RHIM, J. W.; NG, P. K. Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. **Critical Reviews in Food Nutrition**, Boca Raton, v. 47, n. 4, p. 411–433, 2007.

RHIM, J. W.; PARK, H. M.; HA, C. S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, Elmsford, v. 38, n. 10-11, p. 1629–1652, 2013.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B., 2001. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods** 1st ed. O. Research, ed., Washington, DC.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides**. Brasília: Brasília: MMA/SBF, 2008.

SAHIN, K. et al. **Lycopene in the prevention of renal cell cancer in the TSC2 mutant Eker rat model**. 2015. Disponível em: <[http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003-9861\(15\)00022-3](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003-9861(15)00022-3)>. Acesso em: 22 jan. 2015,

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; REGO, R. A. **Brasil Pack Trends 2020**. Campinas: ITAL, 2012.

SCHMID, M. et al. Effects of thermally induced denaturation on technological-functional properties of whey protein isolate-based films. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 9, p. 5315–5327, 2014.

SCHMID, M. et al. Properties of whey-protein-coated films and laminates as novel recyclable food packaging materials with excellent barrier properties. **International Journal of Polymer Science**, London, p. 1–7, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijps/2012/562381/>>. Acesso em: 22 ago. 2014.

SCHMIDT, V.; GIACOMELLI, C.; SOLDI, V. Thermal stability of films formed by soy protein isolate–sodium dodecyl sulfate. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v. 87, n. 1, p. 25–31, 2005.

SHIKU, Y.; HAMAGUCHI, P. Y.; TANAKA, M. Effect of pH on the preparation of edible films based on fish myofibrillar proteins. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 69, p. 1026–1032, 2003.

SHIMADA, K.; CHEFTEL, J. C. Sulfhydryl group disulfide bond interchange during heat induced gelation of whey protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 37, p. 161–168, 1998.

SHIN, S. H. et al. Apple peel and carboxymethylcellulose-based nanocomposite films containing different nanoclays. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 79, n. 3, p. 342–353, 2014.

SINGH, P.; GOYAL, G. K. Dietary lycopene: its properties and anticarcinogenic effects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Malden, v. 7, n. 3, p. 255–270, 2008.

SOARES, D. S. B. **Influência do pH e da irradiação em filmes biodegradáveis de proteínas do soro de leite**. 2012. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

SOARES, N. F. F. et al. Embalagem ativa na conservação de alimentos. In: AZEREDO, H. M. C. (Org.). **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. Fortaleza: Embrapa Agroindustrial Tropical, 2004. p. 167-189.

SOAZO, M.; RUBIOLO, A. C.; VERDINI, R. A. Effect of drying temperature and beeswax content on moisture isotherms of whey protein emulsion film. **Procedia Food Science**, Amsterdam, v. 1, p. 210–215, 2011a.

SOAZO, M.; RUBIOLO, A. C.; VERDINI, R. A. Effect of drying temperature and beeswax content on physical properties of whey protein emulsion films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 1251–1255, 2011b.

SOTHORNVIT, R. et al. Effect of clay content on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/organo-clay composite films. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 43, n. 2, p. 279–284, 2010.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. plasticizer effect on oxygen permeability of -Lactoglobulin Films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 6298–6302, 2000.

SOTHORNVIT, R.; RHIM, J. W.; HONG, S. I. Effect of nano-clay type on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/clay composite films. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 91, n. 3, p. 468–473, 2009.

SOUZA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; CASARIEGO, A.; et al. Effect of moderate electric fields in the permeation properties of chitosan coatings. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, n. 8, p. 2110–2115, 2009.

STICE, C. P. et al. **Dietary tomato powder inhibits alcohol-induced hepatic injury by suppressing cytochrome p450 2E1 induction in rodent models**. 2015. Disponível em: <[http://www.unboundmedicine.com/medline/citation/25592162/Dietary\\_tomato\\_powder\\_inhibits\\_alcohol\\_induced\\_hepatic\\_injury\\_by\\_suppressing\\_cytochrome\\_p450\\_2E1\\_induction\\_in\\_rodent\\_models\\_](http://www.unboundmedicine.com/medline/citation/25592162/Dietary_tomato_powder_inhibits_alcohol_induced_hepatic_injury_by_suppressing_cytochrome_p450_2E1_induction_in_rodent_models_)>. Acesso em: 22 jan. 2015.

TIEN, C. L. E. et al. Development of biodegradable films from whey proteins by cross-linking and entrapment in cellulose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 5566–5575, 2000.

TUNÇ, S.; DUMAN, O. Preparation of active antimicrobial methyl cellulose/carvacrol/montmorillonite nanocomposite films and investigation of

carvacrol release. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 44, n. 2, p. 465–472, 2011.

VALDUGA, E. et al. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, São Paulo v. 32, n. 9, p. 2429–2436, 2009.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Fermented milk: health benefits beyond probiotic effect. In: HUI, Y. H. (Ed.). **Handbook of food products manufacturing**. Hoboken: J. Wiley & Sons, 2007. p. 99-115.

WAKAI, M.; ALMENAR, E. Effect of the presence of montmorillonite on the solubility of whey protein isolate films in food model systems with different compositions and pH. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 43, p. 612–621, 2015.

WANG, L.; AUTY, M. A. E.; KERRY, J. P. Physical assessment of composite biodegradable films manufactured using whey protein isolate, gelatin and sodium alginate. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 96, n. 2, p. 199–207, 2010.

WIHODO, M.; MORARU, C. I. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: a review. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 114, n. 3, p. 292–302, 2013.

YAM, K. L.; TAKHISTOV, P. T.; MILTZ, J. Intelligent Packaging: Concepts and Applications. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, n. 1, p. 1–10, 2005.

ZHOU, J. J.; WANG, S. Y.; GUNASEKARAN, S. Preparation and characterization of whey protein film incorporated with TiO<sub>2</sub> nanoparticles. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 74, n. 7, p. 50–56, 2009.

## **SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**



## **ARTIGO 1**

# **MORPHOLOGY AND MECHANICAL PROPERTIES OF WPC/MMT FILMS ACTIVATED WITH LYCOPENE**

Artigo redigido conforme as normas de submissão da Revista "Journal of  
Agricultural and Food Chemistry"

**MORPHOLOGY AND MECHANICAL PROPERTIES  
OF WPC/MMT FILMS ACTIVATED WITH LYCOPENE**

Rafaela Corrêa Pereira<sup>1\*</sup>, João de Deus Souza Carneiro<sup>1</sup>, Odílio Benedito Assis<sup>2</sup>  
Garrido, Soraia Vilela Borges<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal University of Lavras, Department of Food Science, Lavras (MG),  
Brazil

<sup>2</sup> Embrapa Instrumentation (CNPDIA), São Carlos (SP), Brazil

\*Corresponding author

Postgraduate Program in Food Science, Federal University of Lavra (UFLA),  
Lavras (MG), University Campus, Postal Code 3037, CEP 37200-000, Brazil  
rafacpereira@gmail.com

## 2 **Abstract**

3 In the present study, the production and characterization of nanocomposites  
4 based on whey protein concentrate (WPC) and montmorillonite (MMT)  
5 incorporated of lycopene as functional substance is presented and discussed as  
6 an alternative biomaterial for potential uses in foodstuff applications. A full  
7 factorial design with varying levels of MMT (0 and 2% in w/w) and lycopene (0,  
8 6 and 12% in w/w) was used. Mechanical properties (tensile and puncture tests)  
9 thermal stability analysis (DSC and TGA) and film morphology (MEV and  
10 AFM) of the resulting materials were evaluated. Results indicated that lycopene  
11 and MMT nanoparticles were successfully included in WPC films using the  
12 casting/evaporation method. The films were flexible and homogeneous and a  
13 uniform dispersion of the components were achieved. Inclusion of 2% w/w of  
14 MMT in the polymeric matrix significantly improved mechanical and thermal  
15 properties of the films. Lycopene, besides its good red coloring ability were  
16 successfully incorporated in the film matrix. In the levels tested it did not  
17 damage significantly the film properties. These findings open a new  
18 perspective on the use of materials for bioactive packaging applications.

19

20 **Keywords:** nanocomposite, mechanical properties, thermal stability, film  
21 morphology.

22

## 23 INTRODUCTION

24

25 Data from the Brazilian Association of Plastic Industry<sup>1</sup> estimated that  
26 13.5% of the discarded materials in Brazil in 2013 were synthetic plastic. Most  
27 of which are not recycled and deposited in landfills, dumps or left in nature or  
28 urban environment. The extremely slow degradation, the resistance and the large  
29 volume they occupy are the main reasons of the environmental damage caused  
30 by these materials. Due their presence, besides impairing the decomposition of  
31 organic materials and damage fauna and flora, numerous social inconveniences  
32 are caused such as clogging of drainage systems what is the main cause of  
33 flooding in urban centers.

34 Considering that the main application of plastics is in packaging field,  
35 especially food, associated to the short lifecycle and large sales volume, they  
36 are responsible for an increasingly rapid volume of waste. Thus, several  
37 polymers from renewable sources such as polysaccharides, proteins and lipids,  
38 mainly derived from plants and agricultural residues, have been investigated in  
39 order to develop non-toxic, biodegradable and resistant polymeric materials able  
40 to replace the synthetics ones.<sup>2-8</sup>

41 Whey proteins isolates (WPI) and concentrates (WPC) are attractive  
42 biopolymers for creating bioactive plastic for packaging applications. As a by-  
43 product of cheese manufacture, they have been received much attention

44 nowadays, primarily for their capacity to form films coatings with excellent  
45 barrier properties to oxygen, flavor and oils, particularly after the denaturation  
46 or blending with other compatible polymers.<sup>9</sup> These materials also have good  
47 visual quality, resulting in a smooth and transparent films. Therefore, it is  
48 evidente that plastics based on whey proteins have great potential to replace the  
49 synthetic polymers. Moreover, WPC can be used for this purpose, at much lower  
50 costs than WPI presenting practical advantages of industrial and economic point  
51 of view.<sup>10, 11</sup>

52 Films formed by biopolymers such as whey, however, present some  
53 shortcomings in relation to mechanical and barrier properties compared to the  
54 usual plastic materials, which limits their use in some products. One possibility  
55 that has been extensively evaluated to improve the properties of these films is  
56 the addition of nanoscale inorganic materials, forming a composite polymeric  
57 matrix. Clays, such as alumina silicate laminates classified as fillossilicates  
58 minerals. Montmorillonite (MMT) is the most commonly used inorganic  
59 materials for this purpose due to their biodegradability and availability in large  
60 quantities at relatively low cost. MMT exfoliated and dispersed in the polymer  
61 matrix is able to improve mechanical and barrier properties of protein-based  
62 films<sup>12</sup>, and also it is considered “Generally Recognized As Safe” (GRAS) by  
63 U.S Food and Drug Administration (FDA; 21CFR184.1155), therefore suitable  
64 for uses as edible coatings or applications in food packaging.

65 Besides the search for sustainability and for biodegradable materials  
66 from renewable sources, the promotion of consumer health is a current issue in  
67 the food industry<sup>13</sup>. There is a growing consumers concern with healthy foods  
68 with nutrients and functional substances what has been characterized as a  
69 strategy for raising the industry supply of nutritionally enriched products<sup>14</sup>.  
70 However, some limitations are imposed in the processing these product, such as  
71 the incompatibility of the added substances with the food matrix, undesirable  
72 sensory changes and the need to adapt production lines, which usually implies  
73 high investments and complete changes of parameters involved in the  
74 production.<sup>14, 15</sup>

75 Thus, the development of new packaging systems capable of upgrading  
76 the nutritional value of foods has begun to receive special attention. This  
77 innovative technology deals generally with functional ingredients such as  
78 phytochemicals, vitamins, polyunsaturated fatty acids, probiotics and prebiotics  
79 directly included in the packaging or coating matrix in order to enrich foods.<sup>13</sup>

80 Lycopene, a carotenoid found expressively in red color foods such as  
81 tomato and its derivatives, watermelon and papaya, stands out as a powerful  
82 bioactive substance due to its antioxidant properties and the great ability to  
83 inactivate reactive oxygen species.<sup>16</sup> Moreover, clinical evidence supports the  
84 action of lycopene in the prevention of various types of cancer.<sup>17-20</sup> The addition  
85 of lycopene in food packaging is an innovative alternative in developing active

86 materials providing antioxidant protection and bioactive activity, as well as  
87 promoting an intense red color to the film. This could be interesting in  
88 substituting traditional coatings or artificial colorants, and to provide typical red  
89 color for products such as processed meat, candies and snacks, that associated to  
90 its antioxidant activity, allows the reduction in the levels of artificial additives  
91 usually added into the food matrix.

92 In the present study, the production and structural characterization of  
93 nanocomposites based on WPC/MMT incorporated of lycopene as functional  
94 substance is presented and discussed as an alternative biomaterial for potential  
95 uses in foodstuff applications.

96

## 97 **MATERIALS AND METHODS**

### 98 **Materials**

99 Whey proteins concentrate (WPC) (containing 76% of proteins, 9%  
100 lactose, 6.9% lipids, 3.5% ash, 5.5% moisture, 567 mg.100g<sup>-1</sup> calcium, 204  
101 mg.100g<sup>-1</sup> sodium, 204 mg.100g<sup>-1</sup> iron) was obtained from Alibra (Campinas, S  
102 P, Brazil). Glycerol (99.5%) was purchased from Sigma Chemical Co. (St.  
103 Louis, MO, USA). Lycopene powder (10%) from tomato was obtained from  
104 Galena Química e Farmacêutica Ltda (Campinas, SP, Brazil), and  
105 montmorillonite – Cloisite Na<sup>+</sup> (MMT) were supplied by Southern Clay  
106 International (Gonzales, TX, USA).

**107 Experimental design and statistical analysis**

108 A full factorial design with the following factors was used: 0% and 2%  
109 of MMT, and 0%, 6% and 12% for lycopene (% in w/w on a protein basis)  
110 (Table 1). These levels were chosen based on data from literature and previous  
111 tests conducted, considering the maximum amount of the ingredients possible to  
112 be added without affecting film forming properties.

113 The analysis of variance (ANOVA) test was used to evaluate the  
114 significance of the differences between factors and levels for the results of  
115 tensile and puncture tests. The difference of means was resolved via Tukey's  
116 test. Analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences, v.  
117 20.0 (SPSS, Chicago IL, USA). The significance level was set at  $p < 0.05$ .  
118 Graphics were plotted using Origin software, version 9.0 (Origin Lab,  
119 Northampton, MA, USA). Results of DSC, TGA, SEM and AFM were analyzed  
120 descriptively.

121

**122 Film preparation**

123 Film-forming solutions without addition of MMT (formulation I) were  
124 prepared, according to method proposed by Azevedo et al.<sup>21</sup>, slightly  
125 modified, by dissolving 10% (w/w) WPC powder and 30% (w/w) of glycerol,  
126 on a protein basis, in deionized water. The mixture were magnetically stirred for  
127 60 min for complete homogenization.



128 Film-forming solutions containing MMT (formulation II) were prepared  
129 by dissolving 10% (w/w) WPC powder and 30% (w/w) of glycerol, on a protein  
130 basis, in deionized water containing 2% of MMT (w/w), on a protein basis,  
131 previously dispersed by magnetically stirring for 12 hours. The final mixture  
132 was magnetically stirred for 60 min for complete solubilization.

133 After stirring formulation I and II, were adjusted to pH 7.0 by adding  
134 2M of NaOH. Subsequently, the solutions were homogenized ultrasonically for  
135 10 min at 80W and heated in a water bath at 90°C for 30 min. This step is  
136 essential to the formation of intermolecular bondsestablishing a crosslinked  
137 polymeric network structure.<sup>22</sup>

138 After colling to room temperature, formulations I and II were equally  
139 divided into three fractions, totaling 6 solutions samples (A, B and C without  
140 MMT and D, E and F with MMT). Lycopene powder was then added into the  
141 solutions at two proportions to obtain a final concentration of 6% of lycopene  
142 (w/w), on a protein basis (formulations B and E), and 12% of lycopene  
143 (w/w)(Formulations C and F). The tested formulations are summarized in table  
144 2. All solutions, including the control ones (A and D), were homogenized for 5  
145 min and casted on glass plates (30 x 18 cm). To control film thickness, the  
146 amount of each film-forming solution poured was always the same (130 mL).  
147 The spread solutions were allowed to dry at room temperature for 36 h. All films

148 were stored at a controlled temperature of  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  and relative humidity of  
149  $50 \pm 5\%$  for, at least, 48 h before analysis.<sup>23</sup>

150

### 151 **Film characterization**

152

### 153 **Mechanical properties**

#### 154 *Tensile tests*

155 The tensile strength (TS), Young's modulus (YM) and elongation at  
156 break (EB) of the films were determined, according to standard method D882-  
157 02<sup>24</sup>, in a Texture Analyzer (Stable Microsystems, model TATX2i, Surrey,  
158 England), using a 1 kN load cell. Samples were cut into 10 mm wide and 100  
159 mm long strips, which were mounted between the grips of the texture analyzer.  
160 The initial grip separation was set at 50 mm and the crosshead speed of 50  
161 mm/min. The tensile strength (TS = force/initial cross-sectional area) and  
162 elongation at break (EB) were determined directly from the stress-strain curves  
163 using Origin V. 9.0 software (Origin Lab, Northampton, MA, USA), and the  
164 Young's modulus (YM) was calculated as the slope of the initial linear portion  
165 of this curve. Results were expressed as the mean of ten measurements for each  
166 film formulation.

167

168

169 *Puncture tests*

170 For puncture test, five specimens (squares of 9 cm<sup>2</sup>) of each film were  
171 mounted on the top of a support with a central orifice (2.1 cm of diameter) and a  
172 spherical probe (5 mm in diameter) was moved perpendicularly onto the film  
173 surface at a cross-head speed of 0.8 mm/s until the film rupture. Force-  
174 deformation data collected were used to determine puncture strength (PS,  
175 N/mm) and puncture deformation (PD, mm) of the film at break.

176

177 **Differential scanning calorimeter (DSC)**

178 Samples of the films were analyzed by differential scanning calorimeter  
179 (DSC Q100, TA Instruments, New Castle, DE, USA) to determine the glass  
180 transition temperatures and thermal transition temperatures. The instrument was  
181 calibrated using single indium (melting point 156.4 °C). 5-6mg of sample was  
182 weighed and sealed in an aluminum sample pan using an encapsulating press.  
183 Samples were heated from 25 °C to 300 °C at a rate of 10 °C/min. An empty  
184 sample pan was used as a reference. The melting temperature (T<sub>m</sub>) was  
185 determined as the maximum temperature of the endothermic peak and the glass  
186 transition temperature (T<sub>g</sub>) was determined by the change in the baseline of the  
187 curve.

188

189

## 190 **Thermogravimetric Analyses (TGA)**

191 Thermogravimetric (TG) and differential thermogravimetric (DTG)  
192 curves were obtained using a thermal analyzer Q500 (TA Instruments, New  
193 Castle, DE, USA). Samples (7–10 mg) were placed into Pt crucibles and heated  
194 from 25 to 600°C at a rate of 10°C min<sup>-1</sup>. The measurements were performed  
195 under a dynamic flow of 80% N<sub>2</sub> and 20% synthetic air at 60 mL min<sup>-1</sup>. The  
196 following parameters were extracted from TG/DTG curves: initial  
197 decomposition temperature (T<sub>di</sub>), final decomposition temperature (T<sub>df</sub>), weight  
198 loss in the decomposition region T<sub>di</sub> - T<sub>df</sub> (WL), temperature at 50% weight  
199 loss (T<sub>50%</sub>), derivate maximum decomposing rate temperature (DTG<sub>max</sub>) and  
200 residual mass at 600°C (Res).

201

## 202 **Morphological investigation**

### 203 *Scanning Electron Microscopy (SEM)*

204 Cast films general aspects of structure homogeneity and surface features  
205 were observed under Scanning Electron Microscopy (SEM), model LEO 440  
206 from Leica-Zeiss. The films were fixed in specimen stub and coated with a thin  
207 layer of gold using a Balzers Union Sputtering. All samples were examined  
208 under an accelerating voltage of 55 keV.

209

210

211 *Atomic Force Microscopy (AFM)*

212           Surface morphology of films was examined by AFM (TM-AFM) on a  
213 Dimension V microscope (Veeco, Plainview, NY, USA). Silicon tip RTESP  
214 (Veeco Instruments), pyramidally shaped with a height of 15  $\mu\text{m}$  high were used  
215 in tapping mode. Topography images were recorded for random areas of 10  $\mu\text{m}$   
216 x 10  $\mu\text{m}$ . Height and phase images were simultaneously recorded side-by-side at  
217 a scan speed of 0.5 Hz. Three dimensional images and surfaceanalyses were  
218 performed using Gwyddion software, version 2.25.

219

220 **RESULTS AND DISCUSSION**

221 **Mechanical properties**

222 *Tensile Tests*

223           The structural integrity of a polymeric product is governed by its  
224 mechanical properties<sup>25</sup>, being the main parameter the tensile strength (TS)  
225 (defined as the maximum tensile that a film can hold); the strain at break (SB)  
226 (related to the capacity of the film to stretch before rupture); and the Young  
227 modulus (YM) (a measure of the force necessary to deform a test specimen,  
228 related to the film stiffness).<sup>26</sup>

229 According to our results just MMT affected significantly the films mechanical  
230 properties as data summarized at Table 2, for the TS, SB and YM parameters (p  
231 < 0.05).

232           The values, as reported in Table 3, show an improvement of the TS and  
233 YM with the addition of MMT. TS and YM of films with MMT were  
234 respectively, more than 40% and 50% higher than TS of films without MMT.  
235 However, as expected, the SB decreased almost 80% when MMT was  
236 incorporated. Other authors observed a similar behavior in TS and YM  
237 increment and SB decrease in nanocomposites incorporated of MMT.<sup>2, 12, 27, 28</sup>

238           This behavior is typical of organic composites with inorganics additions  
239 and is attributed to the resistance exerted by the mineral phase (in our case the  
240 clay) and to the orientation and aspect ratio of the intercalated silicate layers. In  
241 addition, the stretching resistance of the oriented backbone of the polymer chain  
242 in the gallery bonded by hydrogen interaction also contributed to enhancing the  
243 tensile strength. Conversely, the layered silicate acting as a mechanical  
244 reinforcement reduces the plasticity of the matrix, reflecting in a lowering of the  
245 SB. Generally the improvement in the mechanical properties is the strongly  
246 ruled by the interfacial interaction that takes place between the matrix and  
247 layered silicate. As higher the clay layers distribution and homogeneity in the  
248 polymeric matrix, the higher will be the bonds between protein and mineral  
249 surfaces, with a direct reflection on the overall mechanical properties.<sup>2</sup>

250           In contrast, can be mentioned the work of Sothornvit et al.<sup>29</sup>, which  
251 reported that the measurement of TS and SB in WPI films with and without  
252 MMT do not result in significant difference. The authors attributed these results

253 to the non-formation of a nanocomposite. In other words, are not consolidated  
254 chemical bonds between the nanoclay and the polymer matrix, which is unlikely.  
255 In the present study such interactions are confirmed and expressed by the  
256 increase in TS and decrease of in SB showing indirectly a good dispersion of  
257 MMT into the polymer matrix and nanocomposite formation.

258 In addition, taking into consideration that TS of films for packaging  
259 purpose, according to conventional standards, should be more than 3.5 Mpa<sup>30</sup>,  
260 the processing of WPC films with MMT additions can be considered suitable  
261 for use as a packaging material.

262

### 263 *Puncture Test*

264 The results for puncture test indicated that the interaction between  
265 lycopene and MMT affected the puncture properties of the films. According to  
266 Table 4, significant differences ( $p < 0.05$ ) were found for puncture strength (PS)  
267 due the addition of MMT and lycopene.

268 According to Table 5, it is possible to note that MMT was the only  
269 factor affecting significantly ( $p < 0.05$ ) puncture deformation (PD). Generally  
270 the inclusion of MMT in the polymeric matrix decreased PD from  $5.56 \pm 0.55$   
271 mm to  $3.90 \pm 0.64$  mm. While PS is the measurement of hardness of a film  
272 under the stress applied at right angles to its surface that generates

273 multidirectional forces, PD is the measurement of film elasticity under vertically  
274 loaded stress.<sup>31</sup>

275         We observe, according to Table 5, that in the samples with MMT, lower  
276 values for PS were obtained. In addition, in samples containig lycopene,  
277 increasing the concentration of this compound resulted in reduction over PS  
278 values. This trend were evidenced mainly in the formulation without MMT  
279 addition, where PS were significantly ( $p<0.05$ ) reduced in film C when  
280 compared to film B. Reduction in PS indicated that the inclusion of lycopene  
281 and MMT in the matrix composition weaken the intermolecular interactions and,  
282 consequently, the resultant films are less resistant.

283         These results corroborate those found for tensile test, where an increase  
284 in TS was observed for the treatments with MMT. Therefore, it is possible to  
285 infer that the films behave differently depending on the stress applied (tensile or  
286 puncture). According to Dias et al.<sup>32</sup>, this happens because the mechanical  
287 response depends on the type of force applied beyond the orientation of the  
288 polymeric chains. Thus, the material can perform better in certain type of  
289 mechanical test.

290         On the other hand, results for PD were in agreement with those for EB,  
291 i.e., both measures indicate that MMT acts as a mechanical reinforcement of the  
292 protein reducing the flexibility of the polymer.

293



**294 Differential scanning calorimeter (DSC)**

295 Figure 1 shows the DSC thermograms of WPC films incorporated of  
296 MMT and lycopene. It is possible to define four distinct regions identified as  
297 glass transition; water evaporation; melting and polymer degradation region  
298 respectively. A broad endothermic peak around 100°C, is recorded in all  
299 samples, which is attributed to the loss of water weakly bound in film matrix. In  
300 this region it is noted that the addition of MMT shifted the water evaporation  
301 endothermic peak to above 100°C. Two reasons could be attributed to this  
302 behavior: Firstly, the layered MMT distributed in the matrix increases de barrier  
303 effect hindering the mobility of water molecules to the surface and subsequent  
304 evaporation. Secondly, the MMT surface is composed essentially of SiO<sub>2</sub>  
305 (around 65% wt) and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (around 10 % wt) and other oxides.<sup>33</sup> They all  
306 highly polar with strong hydrophilic characteristics chracteristics that requires  
307 more energy (temperature) to detached quimically the absorved water on these  
308 surfaces.

309 In addition, as shown in Figure 1, glass transition temperature (T<sub>g</sub>),  
310 determined by the change in the baseline of the curve, was clearly identified  
311 only in A and C films, both around 37°C. The formulations of samples (A and  
312 C) have no lycopene, which can be inferred that the presence of MMT (sample  
313 C, in the amount used in this study (2% w/w), does not interfere on the  
314 displacement that occurs between polymeric chain. It is well know that T<sub>g</sub>

315 depends primarily on the flexibility of the polymer chain, molecular weight,  
316 branching/crosslinking, intermolecular attraction and stereochemical effects<sup>34</sup>,  
317 parameters that seems to be affected by the presence of lycopene in the matrix  
318 composition. The pure WPC formulation (Film A) showed a well-defined  
319 endothermic peak at around 165 °C, corresponding to the melting point of the  
320 proteins, which is in fully concordance to analyse presented by Kim and  
321 Ustunol.<sup>35</sup>

322         According to Almasi et al.<sup>2</sup>, in starch-CMC-MMT nanocomposites, with  
323 the addition of 1% MMT, Tg increased. By increasing of MMT contents (3%,  
324 5% and 7%), the glass transition disappeared gradually and no glass transition  
325 was observed in the thermograms of the films containing 5 and 7% MMT. These  
326 results indicate reduction of amorphous regions and formation of compact  
327 crystalline sections caused by MMT incorporation, decreasing the glass  
328 transition phenomenon. Another explanation for the disappearance of glass  
329 transition could be due to the alteration on the flexibility of the polymeric chain,  
330 by this compound, as indicated by puncture test.

331         Regarding lycopene, the possible establishment of hydrogen bonds  
332 between OH groups of WPC and lycopene would result in a denser polymer  
333 matrix that affects the solubility of the molecules in the matrices, and thus the  
334 permeability. In particular, the water vapor molecules would be less available to  
335 the hydrophilic sites. Thus, polymers with high hydrogen-bonding produce films

336 hat are susceptible to moisture while polymers with hydrophobic groups make  
337 excellent barrier to moisture.<sup>36</sup>

338 Ramos et al.<sup>22</sup>, evaluating the effect of whey protein purity (WPI and  
339 WPC) and glycerol content upon physical properties of edible films  
340 manufactured therefrom, found Tg values for WPC films of 43.6°C, 41.3°C and  
341 36.5°C for glycerol content of 40, 50 and 60%, respectively. According to these  
342 authors, the decrease in Tg as glycerol content increased is a consequence of the  
343 plasticizing effect of glycerol molecules, which typically increase the free  
344 volume of the polymer network. Comparing to the present study, the Tg value  
345 found for films A and C, is near to that presented by these authors when the  
346 glycerol content was higher than the 30% w/w used in this study. Thus, it is  
347 possible that, in the present study, more plasticized films were obtained and this  
348 difference may be due to several factors such as the film processing conditions  
349 and the nature of the ingredients used.

350 The endothermic peaks around 150 – 200°C was related to melting  
351 region of the nanocomposites and no significant differences due to the addition  
352 of MMT or lycopene could be observed, except in the film WPC 6L where the  
353 melting point practically disappeared. Peaks around 250 – 300°C is associated  
354 with decomposition of whey protein. Strong and sharp peaks observed in this  
355 region for the treatments containing MMT indicate less decomposition and some  
356 interactions between the components.

### 357 **Thermogravimetric Analysis (TGA)**

358           The thermal stability of the WPC films with or without lycopene and  
359 MMT was investigated using thermogravimetric analysis (TGA). According to  
360 Hsieh and Ho<sup>37</sup>, this information is necessary in the development of films for  
361 packaging applications since food could be hot and the package film might be  
362 heated together in a microwave, for example. Moreover, thermal analysis  
363 provides information about the structural changes of film samples.<sup>4</sup>

364           It can be seen in Figure 2 that all films are characterized by a three steps  
365 thermal degradation in the temperature range of 100 – 600°C. The first step,  
366 between 50 and 150°C correspond to the loss of water where WPC films suffer  
367 an initial weight loss of approximately 10% of its initial mass. The temperature  
368 range for the second step takes place between 150 and 300°C, temperature  
369 range in which weight loss of the films became significant. This can be  
370 explained by the decomposition of WPC proteins and lycopene, and loss of  
371 glycerol, in concordance to DSC thermogram which indicates the melting  
372 occurrence of the matrix in these temperatures. The third step of thermal  
373 degradation correspond to depolymerization, decarbonylation and pyrolytic  
374 decomposition and is observed in the range of 450 to 600°C.

375           In addition, it is possible to note in TGA and DTG curves that, when  
376 MMT was added the films exhibited a significant delay in weight loss at  
377 temperatures greater than 450°C. This can be attributed to the fact that MMT

378 platelets reduce the rate of diffusion of volatile decomposition products out of  
379 the nanocomposite bulk. MMT platelets create a tortuous pathway for volatile  
380 decomposition products to diffuse out of the nanocomposite matrix. This  
381 increases the effective path length for diffusion, thus reducing the rate of  
382 diffusion.<sup>38, 39</sup> The mechanism for improved thermal stability has also been  
383 attributed to the thermal superior insulation behavior of MMT and changes in  
384 the dynamics of molecular motion in nanocomposites.<sup>40</sup> According to Kadam et  
385 al.<sup>7</sup>, this decrease may also be due to the onset of oxidation of the surface  
386 functional groups on the nanoparticles within the temperature limits.  
387 Additionally, as previous commented there is a tendency to form strong interaction  
388 between the water molecules and the MMT surfaces.

389 TGA thermograms also showed that all films exhibited a single initial  
390 decomposition temperature (T<sub>di</sub>), which, according to Ramos et al.<sup>22</sup> is an  
391 indication of a good compatibility between protein and other constituents  
392 (glycerol, lycopene and MMT).

393 Table 6 presents the values of thermal properties obtained from TGA  
394 and DTG curves. From these parameters, it was noted an increase in T<sub>di</sub> for the  
395 films incorporated of lycopene and MMT. In addition, an increase in T<sub>di</sub> was  
396 observed when the films with or without MMT were compared. This result  
397 reinforces the MMT effect in improving the thermal stability of the films.

398           The weight loss in the decomposition region varied between 43 to 51%  
399 and no differences due to incorporation of MMT or lycopene could be observed.  
400 The same was observed for DTGmax, which was located between 254 to  
401 272°C. On the other hand, a slight increase in the temperature at 50% of weight  
402 loss was observed in the films with the addition of MMT, reinforcing the MMT  
403 improvement of the thermal stability in agreement with the previously results.  
404 The high residual mass at 600°C (except for film E) observed in films with  
405 MMT was expected since MMT is thermally stable at this temperature.  
406 According to Kim and White<sup>41</sup> MMT (Cloisite Na+) can yields more than 85%  
407 solid residue at 800°C.

408           In general, similar results for thermogravimetric analysis can be found in  
409 literature for of whey protein films and nanocomposites incorporated of MMT.  
410 As some examples we have Kumar et al.<sup>39</sup> which studied soy protein films with  
411 addition of MMT, concluding that the nanocomposites exhibited a significant  
412 reduction in weight loss at temperatures greater than 400°C. Furthermore, the  
413 temperature at 50% weight loss was also increased by the addition of MMT.

414           Ramos et al.<sup>22</sup>, evaluating the effect of whey protein purity (WPI and  
415 WPC) upon the physical properties of edible films processed with glycerol  
416 found TGA thermograms with similar degradation steps to those found in this  
417 study. According to the authors, this thermal degradation follows a pattern

418 similar to that undergone by other protein films, e.g. sodium caseinate and  
419 gelatin.

420

#### 421 **Film microstructure**

##### 422 *Scanning electronic microscopy (SEM)*

423           Figures 3 and 4 show the micrographs of the surfaces and cross sections  
424 of the tested films respectively. Film A (pure WPC) exhibits a smooth and  
425 homogeneous surface with some small pores, probably originated from the  
426 drying process. With the addition of lycopene or MMT, the surfaces became  
427 rougher, with larger pores, and some agglomerates could be visualized. Such  
428 features reflect an uneven homogenization of phases present in the WPC matrix.

429           Such results are confirmed in the analysis of fracture cross section,  
430 according to photomicrographies displayed in Figure 4. The cross sections also  
431 evidences that the addition of MMT associated with lycopene (samples E and F)  
432 led to a compact and lamellar structure, increasing the tortuosity. The matrix in  
433 such conditions prevents molecular diffusion and improves mechanical  
434 properties, in total agreement with previous results obtained for tensile and  
435 puncture properties of the tested filmes.

436

437

438

439 *Atomic Force Microscopy (AFM)*

440 AFM is a powerful tool to aid in conventional analysis of polymeric  
441 surfaces, providing additional information to SEM observation. Figure 5  
442 displays the 3D AFM images of WPC films surfaces with MMT and lycopene.  
443 The images showed that all films have similar surfaces morphologies in this  
444 microscopic amplification.

445 The matrices present corrugated aspect but at low intensity. The z  
446 indicates the highest peak found in each area, all in the nanometric scale.  
447 Despite the matrix irregularities observed in the composites under SEM  
448 observation, the AFM analysis was not able to evidence the formation of  
449 nanoparticle or lycopene agglomerates.

450 The homogenities of the nanocomposites structure at this scale can be  
451 assessed by calculating the root mean square roughness parameter ( $R_{rms}$ ) of the  
452 scanned areas (Table 7).

453 An increase in surface roughness normally is related to a poor dispersion  
454 of the nanofiller in the polymer matrix.<sup>13</sup> According to our data presented in  
455 Table 6,  $R_{rms}$  values of WPC with MMT was slightly higher than those without  
456 MMT. The values, however, do not differ significantly within the statistical  
457 range used in this study ( $P > 0,05$ ), with the exception of D film, whose average  
458 roughness was slightly higher than the others. That could be a result of the  
459 contribution of a more irregular area randomly scanned by the AFM probe. This



460 indicates that despite same irregularities formation as observed in the SEM  
461 analysis, the MMT dispersion in the WPC matrix was not very high. However,  
462 previous results obtained in this study indicated that the dispersion was enough  
463 to improve mechanical, thermal and barrier properties of the nanocomposite.

464

#### 465 **Conclusions**

466 Lycopene and MMT nanoparticles were successfully included in WPC  
467 films using the casting/evaporation method. The films exhibited a uniform  
468 dispersion of the components and, inclusion of 2% w/w of MMT in the  
469 polymeric matrix significantly improved mechanical and thermal properties of  
470 the films. Lycopene, on the other hand, had little influence on these properties.  
471 These findings open a new perspective on the use of materials for bioactive  
472 packaging applications.

473

#### 474 **Acknowledgments**

475 The authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
476 Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
477 Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas  
478 Gerais (FAPEMIG) and all of the employees of Embrapa Instrumentation for  
479 helpful assistance in this work.

480

481 **References**

482

- 483 1. ABIPLAST. Indústria brasileira de transformação de material plástico:  
484 Perfil 2013. São Paulo, 2013.
- 485 2. Almasi, H.; Ghanbarzadeh, B.; Entezami, A. A. Physicochemical properties  
486 of starch-CMC-nanoclay biodegradable films. *International Journal of*  
487 *Biological Macromolecules* **2010**, *46*, 1–5.
- 488 3. Li, Y.; Jiang, Y.; Liu, F.; et al. Fabrication and characterization of  
489 TiO<sub>2</sub>/whey protein isolate nanocomposite film. *Food Hydrocolloids*, **2010**,  
490 *25*, 1098–1104.
- 491 4. Tunç, S.; Duman, O. Preparation of active antimicrobial methyl  
492 cellulose/carvacrol/montmorillonite nanocomposite films and investigation  
493 of carvacrol release. *LWT - Food Science and Technology*, **2011**, *44*, 465–  
494 472.
- 495 5. Akhtar, M. J.; Jacquot, M.; Jasniewski, J.; et al. Antioxidant capacity and  
496 light-aging study of HPMC films functionalized with natural plant extract.  
497 *Carbohydrate Polymers*, **2012**, *89*, 1150–1158,.
- 498 6. Cortez-Vega, W. R. Biofilmes nanocompósitos obtidos de isolado proteico  
499 de corvina (*Micropogonias furnieri*) e montmorilonita : avaliação das  
500 propriedades físicas , mecânicas e de barreira. *Brazilian Journal of Food*  
501 *Technology*, **2013**, 1–9.

- 502 7. Kadam, D. M.; Thunga, M.; Wang, S.; et al. Preparation and  
503 characterization of whey protein isolate films reinforced with porous silica  
504 coated titania nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, **2013**, *117*, 133–  
505 140.
- 506 8. Shin, S.-H.; Kim, S.-J.; Lee, S.-H.; Park, K.-M.; Han, J. Apple peel and  
507 carboxymethylcellulose-based nanocomposite films containing different  
508 nanoclays. *Journal of Food Science*, **2014**, *79*, E342–53.
- 509 9. Cinelli, P.; Schmid, M.; Bugnicourt, E.; et al. Whey protein layer applied  
510 on biodegradable packaging film to improve barrier properties while  
511 maintaining biodegradability. *Polymer Degradation and Stability*, **2014**,  
512 *108*, 151–157.
- 513 10. Azevedo, V. M.; Dias, M. V.; Borges, S. V.; Costa, A. L. R.; Silva, E. K.;  
514 Medeiros, E. A. A.; Soares, N. de F. Development of whey protein isolate  
515 bio-nanocomposites: Effect of montmorillonite and citric acid on structural,  
516 thermal, morphological and mechanical properties. *Food Hydrocolloids*,  
517 **2015**, *48*, 179-188.
- 518 11. Hong, S.-I.; Krochta, J. M. Oxygen barrier performance of whey-protein-  
519 coated plastic films as affected by temperature, relative humidity, base film  
520 and protein type. *Journal of Food Engineering*, **2006**, *77*, 739–745.

- 521 12. Wakai, M.; Almenar, E. Effect of the presence of montmorillonite on the  
522 solubility of whey protein isolate films in food model systems with  
523 different compositions and pH. *Food Hydrocolloids*, **2015**, *43*, 612–621.
- 524 13. Moreira, F. K. V.; Camargo, L. A. de; Marconcini, J. M.; Mattoso, L. H.  
525 Nutraceutically Inspired Pectin – Mg(OH)<sub>2</sub> Nanocomposites for Bioactive  
526 Packaging Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,  
527 **2013**, *61*, 7119–7119.
- 528 14. Lopez-Rubio, A.; Gavara, R.; Lagaron, J. M. Bioactive packaging: turning  
529 foods into healthier foods through biomaterials. *Trends in Food Science &*  
530 *Technology*, **2006**, *17*, 567–575.
- 531 15. Giroux, H. J.; Grandpré, G.; Fustier, P.; et al. Production and  
532 characterization of Cheddar-type cheese enriched with green tea extract.  
533 *Dairy Science & Technology*, **2013**, *93*, 241–254.
- 534 16. Rodrigues-Amaya, D. B.; Kimura, M.; Amaya-Farfan, J. Fontes Brasileiras  
535 de Carotenoides: Tabela Brasileira de Composição de Carotenoides. 1<sup>a</sup> ed.  
536 Brasília, DF: Brasília: MMA/SBF, 2008.
- 537 17. Gajowik, A.; Dobrzyńska, M. M. Lycopene - Antioxidant activity with  
538 radioprotective and anticancer properties. A review. *Rocz Panstw Zakl Hig*,  
539 **2014**, *65*, 263–271.
- 540 18. Li-Juan, F.; Yu-Bin, D.; Lan-Xiang, W.; et al. The Effects of Lycopene on  
541 the Methylation of the GSTP1 Promoter and Global Methylation in

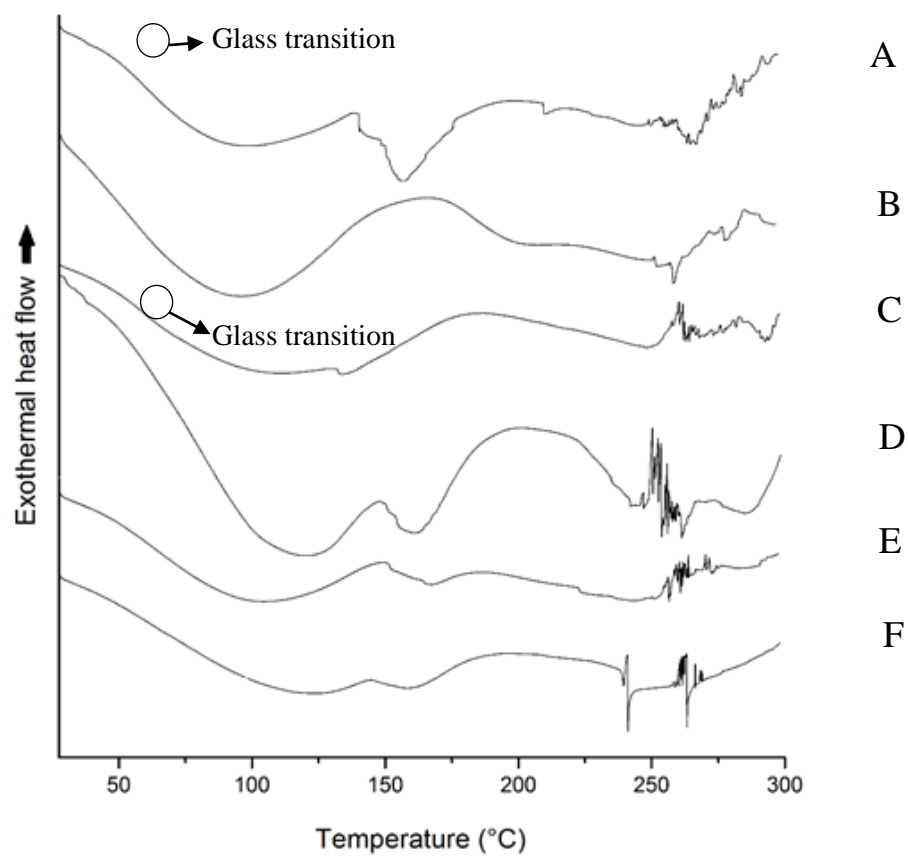
- 542 Prostatic Cancer Cell Lines PC3 and LNCaP. *International Journal of*  
543 *Endocrinology*, **2014**, *2014*, 1–10.
- 544 19. Sahin, K.; Cross, B.; Sahin, N.; et al. Lycopene in the prevention of renal  
545 cell cancer in the TSC2 mutant Eker rat model. *Archives of Biochemistry*  
546 *and Biophysics*, **2015**, *xxx*, xxx–xxx.
- 547 20. Stice, C. P.; Liu, C.; Aizawa, K.; et al. Dietary tomato powder inhibits  
548 alcohol-induced hepatic injury by suppressing cytochrome p450 2E1  
549 induction in rodent models. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2015**,  
550 *xxx*, xxx–xxx.
- 551 21. Azevedo, V. M.; Costa, A. L. R.; Fukushima, K. L.; Borges, S. V.  
552 Propriedades de barreira, mecânicas e ópticas de filmes de concentrado  
553 proteico de soro de leite. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, **2014**, *69*,  
554 237-247.
- 555 22. Ramos, Ó. L.; Reinas, I.; Silva, S. I.; et al. Effect of whey protein purity and  
556 glycerol content upon physical properties of edible films manufactured  
557 therefrom. *Food Hydrocolloids*, **2013**, *30*, 110–122.
- 558 23. ASTM. Standard practice for conditioning plastics for testing, D618-00. In  
559 Standard practice for conditioning plastics for testing, (p. 4). Philadelphia,  
560 PA, 2000.

- 561 24. ASTM. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting.  
562 In Annual book of ASTM standards (pp. 1e9). Philadelphia, PA: ASTM D  
563 882-02, 2002.
- 564 25. Ghanbarzadeh, B.; Oromiehi, A. R. Thermal and mechanical behavior of  
565 laminated protein films. *Journal of Food Engineering*, **2009**, *90*, 517–524.
- 566 26. ASTM. Standard test method for tensile properties of plastics: D638-08. In  
567 Standard practice for conditioning plastics for testing. Philadelphia, PA,  
568 2008.
- 569 27. Majdzadeh-Ardakani, K.; Navarchian, A. H.; Sadeghi, F. Optimization of  
570 mechanical properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites.  
571 *Carbohydrate Polymers*, **2010**, *79*, 547–554.
- 572 28. Gutiérrez, M.; Echeverría, I.; Ihl, M.; Bifani, V.; Mauri, A. N.  
573 Carboxymethylcellulose–montmorillonite nanocomposite films activated  
574 with murta (*Ugni molinae* Turcz) leaves extract. *Carbohydrate Polymers*,  
575 **2012**, *87*, 1495–1502.
- 576 29. Sothornvit, R.; Rhim, J.-W.; Hong, S.-I. Effect of nano-clay type on the  
577 physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/clay  
578 composite films. *Journal of Food Engineering*, **2009**, *91*, 468–473.
- 579 30. Kim, Y. J., Lee, H. M., Park, O. O. Processabilities and mechanical  
580 properties of Surlyn-treated starch/LDPE blends. *Polymer Engineering and*  
581 *Science*, **1995**, *35*, 1652–1657.

- 582 31. Mei, Y.; Zhao, Y. Barrier and Mechanical Properties of Milk Protein-Based  
583 Edible Films Containing Nutraceuticals. *Journal of Agricultural and Food*  
584 *Chemistry*, **2003**, *51*, 1914–1918.
- 585 32. Dias, M. V.; Soares, N. D. F. F.; Borges, S. V; et al. Use of allyl  
586 isothiocyanate and carbon nanotubes in an antimicrobial film to package  
587 shredded, cooked chicken meat. *Food Chemistry*, **2013**, *141*, 3160–3166.
- 588 33. Xiao-Wen, L ; Min, H ; Yue-Hua, H. Chemical composition and surface  
589 charge properties of montmorillonite. *J. Cent. South Univ. Technol.* **2008**,  
590 *15*, 193-197.
- 591 34. Canevaloro Jr, S.V. Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos  
592 e engenheiros. São Paulo: Artliber Editora, 2002.
- 593 35. Kim, S.J. ; Ustunol, Z. Thermal properties, heat sealability and seal  
594 attributes of whey protein isolate/lipid emulsion edible films. *J Food Sci.*  
595 **2001**, *66*, 985–90.
- 596 36. Souza, B. W. S.; Cerqueira, M. A.; Casariego, A.; et al. Effect of moderate  
597 electric fields in the permeation properties of chitosan coatings. *Food*  
598 *Hydrocolloids*, **2009**, *23*, 2110–2115.
- 599 37. Hsieh, T. H., Ho, K. S. Effects of thermal stability on the crystallization  
600 behavior of poly(vinylidene chloride). *Journal of Polymer Science*, **1999**,  
601 *37*, 3269e3276.

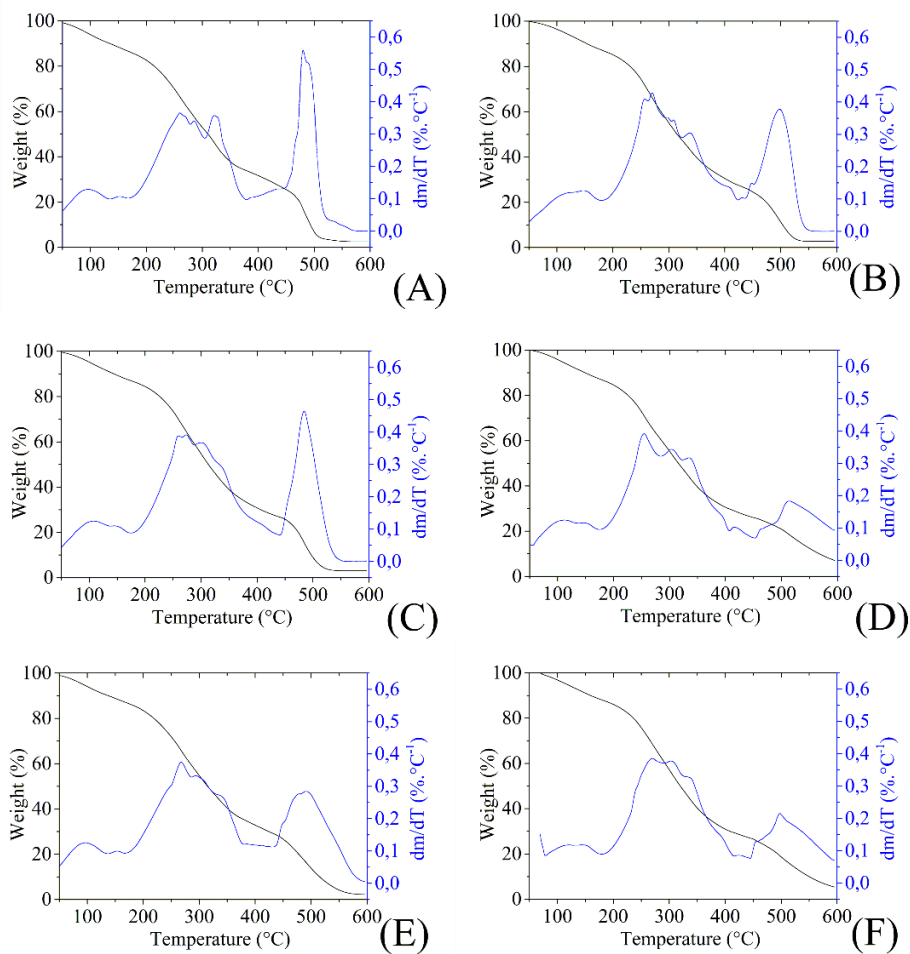
- 602 38. Chen, G.; Liu, S.; Chen, S.; Qi, Z. FTIR Spectra, Thermal Properties, and  
603 Dispersibility of a Polystyrene / Montmorillonite Nanocomposite.  
604 *Macromolecules Chemistry and Physics*, **2001**, 1189–1193.
- 605 39. Kumar, P.; Sandeep, K. P.; Alavi, S.; Truong, V. D.; Gorga, R. E.  
606 Preparation and characterization of bio-nanocomposite films based on soy  
607 protein isolate and montmorillonite using melt extrusion. *Journal of Food*  
608 *Engineering*, **2010**, *100*, 480–489.
- 609 40. Ray, S.; Bousmina, M. Biodegradable polymers and their layered silicate  
610 nanocomposites: In greening the 21st century materials world. *Progress in*  
611 *Materials Science*, **2005**, *50*, 962–1079.
- 612 41. Kim, Y. ; White, J.L. Formation of polymer nanocomposites with various  
613 organoclays. *Journal of Applied Polymer Science* **2005**, *96*, 1888–1896.
- 614





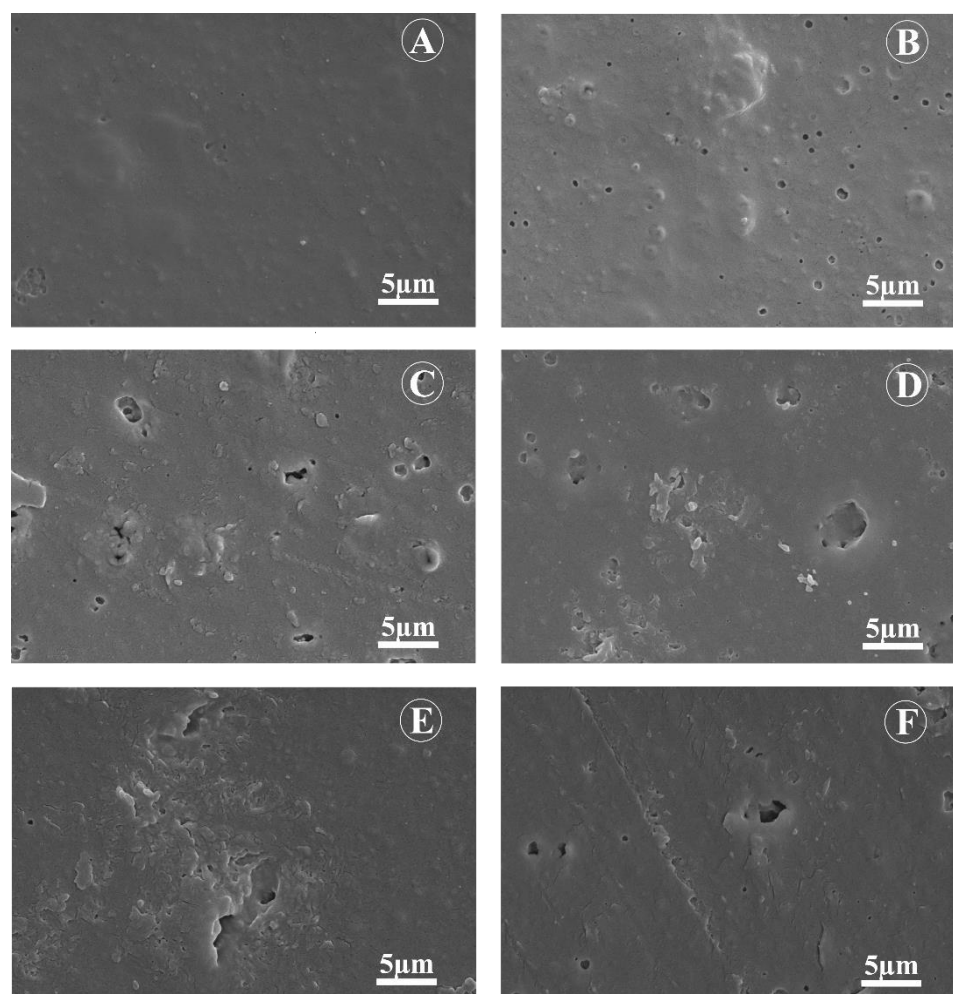
615

616 Figure 1 DSC thermograms of pure WPC films: pure WPC film (A), WPC and  
617 6% of lycopene (B), WPC and 12% of lycopene (C), WPC/MMT (D),  
618 WPC/MMT and 6% of lycopene (E) and WPC/MMT and 12% of lycopene (F)  
619



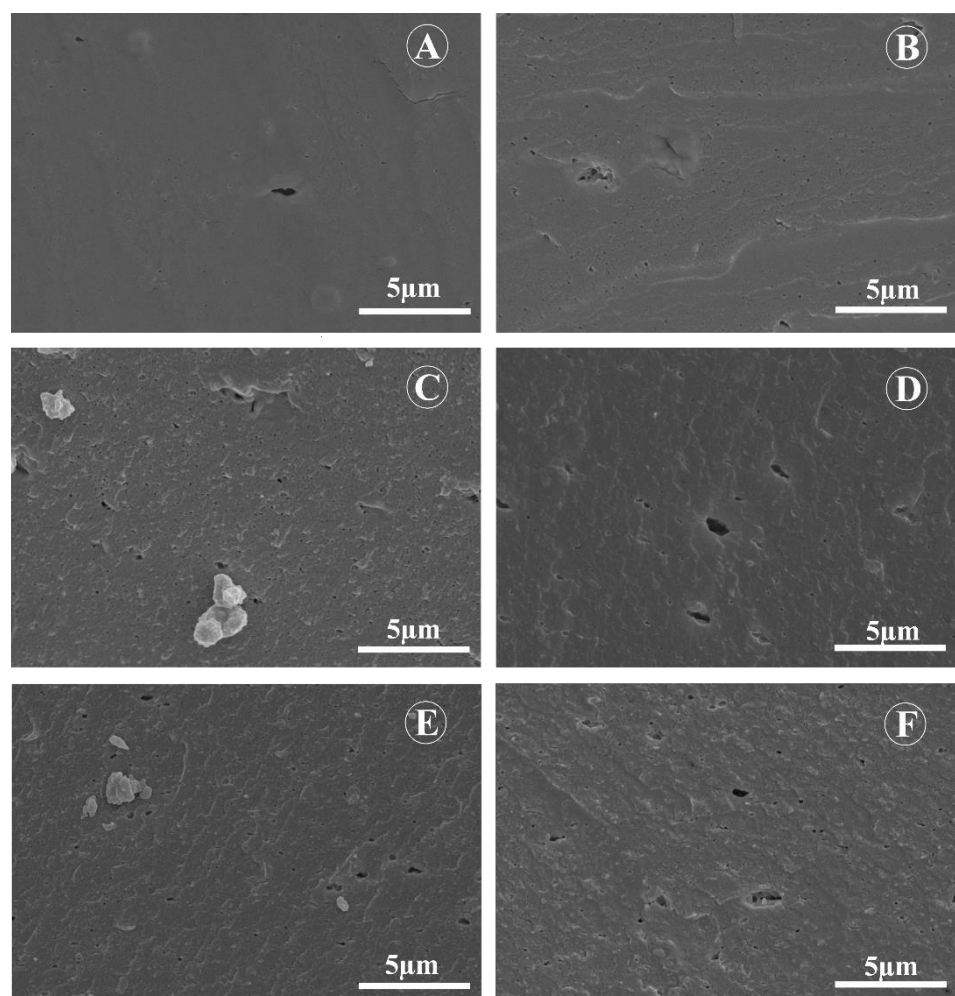
620

621 Figure 2 TGA and DTG curves of WPC incorporated of MMT and lycopene:  
 622 pure WPC film (A), WPC and 6% of lycopene (B), WPC and 12% of lycopene  
 623 (C), WPC/MMT (D), WPC/MMT and 6% of lycopene (E) and WPC/MMT and  
 624 12% of lycopene (F)  
 625



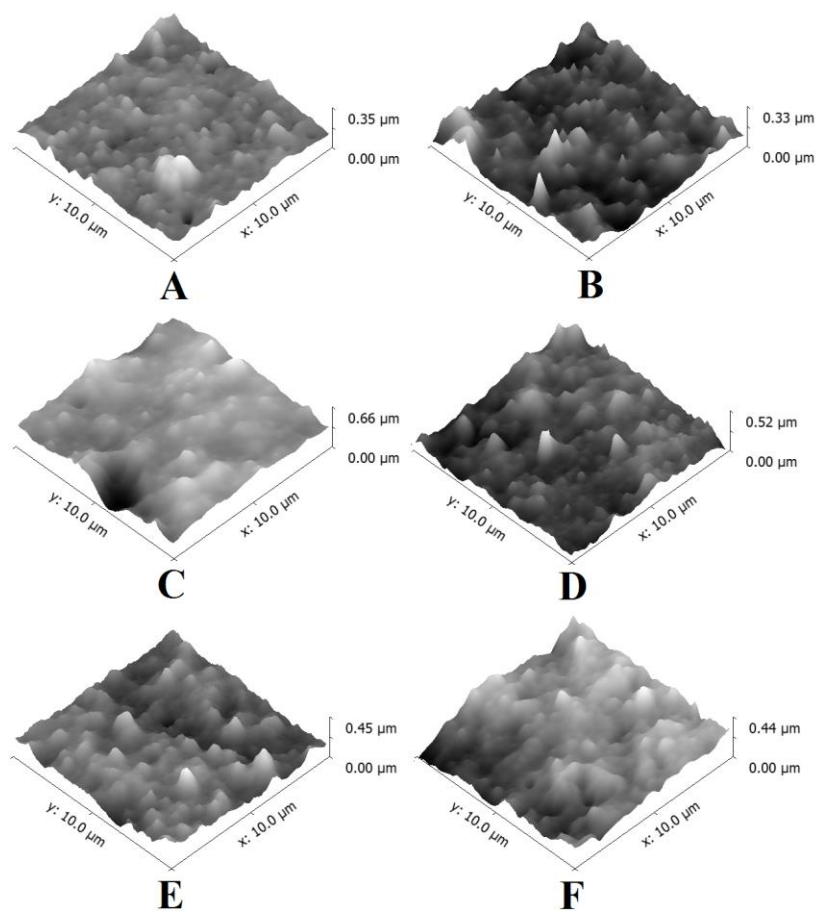
626  
627  
628  
629  
630

Figure 3 Micrographs of the surface of WPC films: pure WPC film (A), WPC and 6% of lycopene (B), WPC and 12% of lycopene (C), WPC/MMT (D), WPC/MMT and 6% of lycopene (E) and WPC/MMT and 12% of lycopene (F)



631  
632  
633  
634  
635

Figure 4 Micrographs of the cross sections of WPC films: pure WPC film (A), WPC and 6% of lycopene (B), WPC and 12% of lycopene (C), WPC/MMT (D), WPC/MMT and 6% of lycopene (E) and WPC/MMT and 12% of lycopene (F)



636

637 Figure 5 AFM height images of WPC films: pure WPC film (A), WPC and 6%  
638 of lycopene (B), WPC and 12% of lycopene (C), WPC/MMT (D), WPC/MMT  
639 and 6% of lycopene (E) and WPC/MMT and 12% of lycopene (F)

640

641

642 Table 1. Gel formulation compositions for film processing<sup>a</sup>

Film	WPC <sup>b</sup>	MMT <sup>c</sup>	Lycopene
	(% w/w)	(% w/w)	(% w/w)
A	10	0	0
B	10	0	6
C	10	0	12
D	10	2	0
E	10	2	6
F	10	2	12

643 <sup>a</sup>All formulations contain 30% (w/w) of glycerol as plasticizer644 <sup>b</sup>Whey proteins concentrate645 <sup>c</sup>Montmorillonite

646

647 Table 2 P values for the tensile properties obtained in analysis of variance.

FV	P value		
	TS (MPa)	YM (MPa)	SB (%)
MMT	0.0000	0.0000	0.0000
Lycopene	0.0814	0.1680	0.5898
MMT * lycopene	0.4143	0.2742	0.0284

648

649 Table 3 Mechanical properties of WPC cast films with and without MMT  
650 incorporated<sup>a</sup>.

Sample	TS (MPa)	YM (MPa)	SB (%)
Without MMT	2.99 ± 0.27	1.04 ± 0.06	18.96 ± 0.59
With MMT	4.31 ± 0.11	2.79 ± 1.36	4.11 ± 0.95

651 <sup>a</sup>Mean ± standard deviation for ten replicates

652

653 Table 4 P values for the tensile properties obtained in analysis of variance.

FV	P value	
	PS	PD
MMT	0.0000	0.0325
Lycopene	0.0008	0.4294
MMT * lycopene	0.0336	0.9910

654

655

656 Table 5 Puncture strength (PS) and puncture deformation (PD) of WPC films  
657 incorporated of MMT and lycopene.

Sample	PS (N/mm) <sup>a</sup>
<i>0% MMT</i>	
0% lycopene	77.81 ± 9.69 <sup>a</sup>
6% lycopene	68.99 ± 1.35 <sup>b</sup>
12% lycopene	56.95 ± 5.92 <sup>b</sup>
<i>2% MMT</i>	
0% lycopene	58.88 ± 6.78 <sup>c</sup>
6% lycopene	55.44 ± 7.89 <sup>c</sup>
12% lycopene	54.06 ± 5.05 <sup>c</sup>

658 <sup>a</sup> Mean ± standard deviation for five replicates. Means within the same column, labeled with the  
659 same letter, do not statistically differ from each other by Tukey's test ( $p > 0.05$ )

660

661 Table 6 Values of thermal properties obtained from thermogravimetric analysis  
662 of WPC films incorporated of MMT and lycopene, in terms of initial  
663 decomposition temperature (Tdi), final decomposition temperature (Tdf), weight  
664 loss in the decomposition region Tdi - Tdf (WL), temperature at 50% weight  
665 loss (T50%), derivate maximum decomposing rate temperature (DTGmax) and  
666 residual mass at 600°C (Res).

Film	Tdi (°C)	Tdf (°C)	WL (%)	DTGmax (°C)	T50%	Res (%)
A	214	350	45	261	309	2.74
B	223	376	51	270	313	2.47
C	228	372	49	272	311	3.06
D	222	371	49	254	314	7.07
E	227	361	43	269	314	2.50
F	231	374	51	269	318	5.70

667

668 Table 7 RMS values obtained from AFM scanned areas of WPC films  
669 incorporated of lycopene and MMT.

Film	R <sub>rms</sub> (nm) <sup>a</sup>
WPC	30.7 ± 6.3 <sup>a</sup>
WPC 6L	39.0 ± 7.0 <sup>a</sup>
WPC 12 L	37.5 ± 2.2 <sup>a</sup>
WPC MMT	55.4 ± 8.5 <sup>b</sup>
WPC MMT 6L	46.8 ± 9.9 <sup>a</sup>
WPC MMT 12L	44.8 ± 6.5 <sup>a</sup>

670 <sup>a</sup> Values with different letters are statistically different at  $p < 0.05$ .

## **ARTIGO 2**

# **DEVELOPMENT OF WPC/MMT NANOCOMPOSITES ENRICHED WITH LYCOPENE FOR PACKAGING PURPOSE**

Artigo redigido conforme as normas de submissão da Revista “Packaging  
Technology and Science”



## DEVELOPMENT OF WPC/MMT NANOCOMPOSITES ENRICHED WITH LYCOPENE FOR PACKAGING PURPOSE

Rafaela Corrêa Pereira<sup>1\*</sup>, João de Deus Souza Carneiro<sup>1</sup>, Soraia Vilela Borges<sup>1</sup>, Odílio Benedito Assis Garrido<sup>2</sup>, Gabriela Lara Alvarenga<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal University of Lavras, Department of Food Science, Lavras (MG), Brazil

<sup>2</sup> Embrapa Instrumentation (CNPDIA), São Carlos (SP), Brazil

\*Corresponding author

Postgraduate Program in Food Science, Federal University of Lavra (UFLA), Lavras (MG), University Campus, Postal Code 3037, CEP 37200-000, Brazil [rafacpereira@gmail.com](mailto:rafacpereira@gmail.com)

### Abstract

In the present study, the production and characterization of nanocomposites based on whey protein concentrate (WPC) and montmorillonite (MMT) incorporated of lycopene as functional substance is presented and discussed as an alternative biomaterial for potential uses in foodstuff applications. A full factorial design with varying levels of MMT (0 and 2% in w/w) and lycopene (0, 6 and 12% in w/w) was used. Optical properties (CIELab parameters, light transmission and film transparency), moisture, density, solubility, water vapour permeability, FTIR and antioxidant activity of the resulting materials were evaluated. Results indicated that lycopene and MMT nanoparticles were successfully included in WPC films using the casting/evaporation method. The films were flexible and homogeneous and a uniform dispersion of the components were achieved. Inclusion of 2% w/w of MMT in the polymeric matrix significantly improved barrier property against water vapor. Lycopene, besides its good red coloring ability, provided to the films antioxidant activity and UV-vis light protection. These findings open a new perspective on the use of materials for bioactive packaging applications.

**Keywords:** bioactive food packaging, barrier properties, antioxidant activity.

## INTRODUCTION

The increasing consumer health consciousness and the growing demand for healthy foods are stimulating innovation and new product development in the food industry internationally, and it is responsible for the expanding worldwide interest in functional foods. However, some limitations are imposed on the industry in processing these products. Some of them are incompatibility of the substance with the food matrix, undesirable sensory changes and the need to adapt production lines, which usually implies high investments and complete changes of parameters involved in the process [1, 2]. Thus, developing new packaging systems capable of upgrading the nutritional value of foods has begun to receive special attention. This innovative technology deals generally with functional ingredients such as phytochemicals, vitamins, polyunsaturated fatty acids, probiotics and prebiotics which can be directly included in the packaging material or coatings in order to enrich foods [3].

Lycopene, a carotenoid found expressively in red color foods such as tomato and its derivatives, watermelon and papaya, stands out as a powerful bioactive substance due to its antioxidant properties and the great ability to inactivate reactive oxygen species [4]. Moreover, clinical evidence supports the action of lycopene in the prevention of various types of cancer [5-8]. Due to the red color that provides to foods, the addition of lycopene in food packaging is an innovative alternative in developing active films because this substance, besides providing antioxidant protection and bioactive activity, gives an intense red color to the film. This could be interesting since the package can substitute traditional coatings or films loaded with artificial colorants. Thus, it stands out as a healthier alternative to provide typical red color for products such as processed meat, candies and snacks plus the antioxidant activity, allowing the reduction in the levels of artificial additives added into the food matrix.

Whey proteins isolates (WPI) and concentrates (WPC) are attractive biopolymers for creating bioactive packaging. Because they are a by-product of cheese manufacture, they have received much attention nowadays because of their capacity to form films and biodegradable coatings with excellent barrier properties to oxygen, flavor and oils, particularly after passing through process such as denaturation or blended

with other polymers [9]. These materials also have good visual quality, because they are smooth and transparent. Therefore, it is suggested that coatings based on whey proteins have great potential for use as substitutes to synthetic polymers. Moreover, considering that WPC can be used for this purpose at much lower costs than WPI, films and coatings based on WPC have practical advantages of the economics and industrial points of view [10, 11].

However, films formed by biopolymers such as whey, present some shortcomings in relation to mechanical and barrier properties compared to the usual plastic materials, which limits their use in some products. One technique that has been extensively studied to improve the properties of the films is the addition of nanoscale inorganic materials, forming a hybrid polymeric matrix. These materials are basically clays, composed of alumina silicate laminates classified as fillosilicates. Montmorillonite (MMT) is one of the most commonly used inorganic materials for this purpose due to their biodegradability and availability in large quantities at relatively low cost, being able to improve properties of films based on biopolymers when it is completely dispersed and exfoliated in the polymer matrix [12]. Besides, it is considered “Generally Recognized As Safe” (GRAS) by U.S Food and Drug Administration (FDA; 21CFR184.1155), so it can be used in films for food packaging.

Thus, due to the potential application of active films and the antioxidant potential of lycopene, it is proposed in this work to develop and characterize nanocomposites based on WPC/MMT incorporated of lycopene as functional substance.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Materials**

Whey proteins concentrate (WPC) (containing 76% of proteins, 9% lactose, 6.9% lipids, 3.5% ash, 5.5% moisture, 567 mg.100g<sup>-1</sup> calcium, 204 mg.100g<sup>-1</sup> sodium, 204 mg.100g<sup>-1</sup> iron) was obtained from Alibra (Campinas, S P, Brazil). Glycerol (99.5%) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Lycopene powder (10%) from tomato was obtained from Galena Química e Farmacêutica Ltda (Campinas, SP, Brazil), and montmorillonite – Cloisite Na<sup>+</sup> (MMT) were supplied by Southern Clay International (Gonzales, TX, USA).

## **Experimental design and statistical analysis**

A full factorial design with the following factors was used: 0% and 2% of MMT, and 0%, 6% and 12% for lycopene (% in w/w) (Table 1). These levels were chosen based on data from literature and previous tests conducted, considering the maximum amount of the ingredients possible to be added without affecting film forming properties.

Statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences, v. 20.0 (SPSS, Chicago IL, USA). The analysis of variance (ANOVA) test was used to evaluate the significance of the differences between factors and levels and the difference of means was resolved via Tukey's test. The significance level was set at  $p \leq 0.05$ . Graphics were plotted using Origin software, version 9.0 (Origin Lab, Northampton, MA, USA). Film appearance and FTIR results were analyzed descriptively.

## **Film preparation**

Film-forming solutions without addition of MMT (formulation I) were prepared, according to method proposed by Azevedo et al. [13] slightly modified, by dissolving 10% (w/w) WPC powder and 30% (w/w) of glycerol, on a protein basis, in deionized water. The mixture were magnetically stirred for 60 min for complete homogenization.

Film-forming solutions containing MMT (formulation II) were prepared by dissolving 10% (w/w) WPC powder and 30% (w/w) of glycerol, on a protein basis, in deionized water containing 2% of MMT (w/w), on a protein basis, previously dispersed by magnetically stirring for 12 hours. The final mixture was magnetically stirred for 60 min for complete solubilization.

After stirring formulation I and II, were adjusted to pH 7.0 by adding 2M of NaOH. Subsequently, the solutions were homogenized ultrasonically for 10 min at 80W and heated in a water bath at 90°C for 30 min. This step is essential to the formation of intermolecular bondsestablishing a crosslinked polymeric network structure [14].

After colling to room temperature, formulations I and II were equally divided into three fractions, totaling 6 solutions samples (A, B and C without MMT and D, E and F with MMT). Lycopene powder was then added into the solutions at two proportions to obtain a final

concentration of 6% of lycopene (w/w), on a protein basis (formulations B and E), and 12% of lycopene (w/w) (Formulations C and F). The tested formulations are summarized in table 2. All solutions, including the control ones (A and D), were homogenized for 5 min and casted on glass plates (30 x 18 cm). To control film thickness, the amount of each film-forming solution poured was always the same (130 mL). The spread solutions were allowed to dry at room temperature for 36 h. All films were stored at a controlled temperature of  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  and relative humidity of  $50 \pm 5\%$  for, at least, 48 h before analysis [15].

## **Film characterization**

### **Color measurements**

Color measurements were carried out with a Minolta CM, CR-210 colorimeter (Minolta, Colombes, France) using the Hunter and CIE scale calibrated with a standard white plate provided by manufacturer. A CIELab color scale was employed to measure the degree of lightness ( $L^*$ ), redness ( $+a^*$ ) or greenness ( $-a^*$ ), and yellowness ( $+b^*$ ) or blueness ( $-b^*$ ) of the films, under D65 (daylight). Film specimens were measured on the surface of the white standard plate. Five replicates were used for each sample.

### **Light transmission and film transparency**

The ultraviolet (UV) and visible light barrier properties were measured on dried films at selected wavelengths (in the 200-800 nm range), using an UV-VIS Spectrophotometer (Bel Photonics, UV/Vis SP 2000, Osasco, SP, Brasil). The film samples were cut into strips (4x1 cm) and attached to one side of a colorimetric cup e while the empty colorimetric cup was used as control.

The transparency of the films was determined by measuring the percent transmittance (%T) at 600 nm using a spectrophotometer (Bel Photonics, UV/Vis SP 2000, Osasco, SP, Brasil) as reported by Sothornvit et al. [16]. The films were cut into a rectangle piece and directly placed in a spectrophotometer test cell. An empty test cell was used as the reference. The transparency was calculated from the following equation:

$$\text{Transparency} = \frac{\log \%T}{X}$$

where X is the film thickness (mm), measured by a 0–25 mm handheld digital micrometer (model IDC-112CB, Mitutoya Corp., Tokyo, Japan). According to this equation, the high values obtained, indicate lower transparency and higher degree of opacity [17].

### **Moisture Content**

Moisture content (MC) was determined by drying in an oven at 105 °C for 24 h. Small specimens of approximately 2 g of films were cut after adequate conditioning, and placed on Petri dishes which were weighed before and after oven drying, and the weights were recorded. MC was calculated as the percentage of weight loss based on the original weight, in accordance with ASTM D664-94 [18].

### **Solubility**

Solubility in water (S) was expressed as percentage of film dry matter solubilized after 24 h immersion in distilled water, according to method proposed by Gounga et al. [19], with modifications. Pieces of each film (about 2 g) were dried in an oven (105°C; 24 h) to obtain initial dry matter weight of the films. The dried films were weighted and then immersed into 50mL of distilled water for 24 h at 22°C. After 24 h, the unsolubilized films were taken out of the water and dried (105°C; 24 h) to determine the weights of the dry matter which were not dissolved in water. S was calculated as the percentage of weight loss based on the original weight.

### **Density**

Film density ( $\rho_s$ ) was calculated by dividing the film weight by the film volume. Dimensions (thickness, width and length) were measured by a 0–25 mm handheld digital micrometer (model IDC-112CB, Mitutoya Corp., Tokyo, Japan). Volume was calculated by multiplying the film area by the thickness.

### **Water vapor permeability (WVP)**

Water vapor permeability (WVP) tests were carried out according to method ASTM E398-03 [20] with some modifications. The film was sealed in a permeation cell containing anhydrous calcium chloride. The permeation cell was placed in a humidity chamber with a controlled temperature, at  $23 \pm 2^\circ \text{C}$ , and maintained at 75% relative humidity (RH). WVP was determined, based on the mass of water absorbed by the permeation cell, considering the RH difference between both environments (outside and inside the cell). The samples were weighed during 8 hours, and the weight gain values were plotted as a function of time. The slope of each line was calculated by performing a linear regression ( $R^2 > 0.9$ ), and the water vapour transmission rate (WVTR,  $\text{g/h/m}^2$ ) was calculated as the slope of the line divided by the area of exposed film ( $\text{m}^2$ ). The WVP ( $\text{g}/(\text{m s Pa})$ ) was calculated by the following equation:

$$WVP = \frac{WVTR}{\Delta P} \cdot X$$

where X is the film thickness and  $\Delta P$  is the saturation vapour pressure of water (Pa) between the faces of the film:  $\Delta P = S(R1 - R2)$ ; S is the saturation vapour pressure at the experimental temperature (2809 kPa); R1 is the RH outside of the capsule (75%); and R2 is the RH within the capsule containing calcium chloride (0%).

### **FT-IR Vibrational Spectroscopy**

FT-IR Vibrational Spectroscopy spectra were obtained with a spectrometer Spectrum 1000 (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) in the absorbance mode, in the regions of 400 e  $4000 \text{ cm}^{-1}$ . Film spectra were collected with a resolution of  $4 \text{ cm}^{-1}$  and averaging 64 scans.

### **Antioxidant activity**

The antioxidant activity of the film samples was evaluated using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging assay according to Siripatraw and Harte [17] slightly modified. Briefly, 3 mL of film extract solution were mixed with 1 ml of 1mM methanolic

solution of DPPH (Fluka Chemical Company, St. Louis, MO, USA). The mixture was vortexed using a vortex and incubated in the dark at room temperature (25°C) for 30 min. When the DPPH solution was mixed with the sample mixture acting as a hydrogen atom donor, a stable nonradical form of DPPH is obtained with simultaneous change of the violet color to pale yellow. The absorbance was then measured at 517nm. The percentage of DPPH free radical quenching activity was determined using the following equation:

$$DPPH \text{ scavenging effect (\%)} = \frac{Abs_{DPPH} - Abs_{extract}}{Abs_{DPPH}} \cdot 100$$

where  $Abs_{DPPH}$  is the absorbance value at 517 nm of the methanolic solution of DPPH and  $Abs_{extract}$  is the absorbance value at 517 nm for the sample extracts.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Film appearance

All resulting films were flexible, homogeneous and were easily separated from the casting plates. Their surfaces were smooth without visual pores and cracks. However, appearance of the two sides of the film was different. The film side facing the casting plate was indeed shiny, while the other was dull. According to Ramos et al. [14], this is likely an indication of some phase separation occurring in the solution during drying.

Films without addition of lycopene were transparent and slightly yellowish, probably because the presence of contaminants from the WPC (i.e., lactose, lipids and minerals). Incorporation of lycopene into WPC films modified their appearance in both color and transparency. The films containing 6% of lycopene were bright red colored and slightly transparent. Increasing the concentration of lycopene resulted in dark red films, as illustrated in Figure 1. No visible differences in the appearance were observed due to the incorporation of MMT.

### Color measurements



The color properties were significantly influenced ( $p < 0.05$ ) by presence of lycopene and MMT (Table 2). As shown in Table 3, the interaction between MMT and lycopene reduced lightness ( $L^*$  value) and increased ( $p < 0.05$ ) redness ( $a^*$  value).

Higher  $a^*$  values were noted when lycopene content were higher, representing its good coloring ability. MMT also contributed to increase  $a^*$  value. Yellowness/blueness ( $b^*$  value), was significantly influenced ( $p < 0.05$ ) both by lycopene and MMT, but the interaction between these factors were not significant ( $p > 0.05$ ) (Table 3). For this parameter, it is possible to note that films with the higher level of lycopene were more yellow. The same tendency were observed due the addition of MMT.

Similar results were observed by Akhtar et al. [21], by the addition of betacyanins in hydroxypropyl methylcellulose films and by Park and Zhao [22], by the addition of cranberry pomace extracts in low and high methoxyl pectin films.

### **Light transmission and film transparency**

Figure 2 shows light transmission of UV and visible light, at selected wavelength between 200 and 800 nm, through films. The transmittance (T) in visible spectra (400–800 nm) of films without addition of lycopene (WPC and WPC MMT) ranged from  $20.9 \pm 1.63\%$  to  $63.93 \pm 1.34\%$  and  $18.6 \pm 0.71 \%$  to  $64.93 \pm 5.11$ , respectively. Increasing lycopene content of WPC films showed a decrease in light transmission of films for both UV and visible regions.

In UV light range (200 – 400 nm), very low values of transmission were noted for all films, especially for those containing lycopene. This means that lycopene provides to films excellent barrier properties in UV light region. This is particularly interesting when it is necessary to protect food against foto oxidation. Thus these films can potentially retard lipid oxidation induced by UV light in food systems [19].

Beyond lycopene, the UVC block ability can also be attributed to the UV-absorption ability of the aromatic amino acid residues, tyrosine and tryptophan, in the protein structure [23]. This can also explain the fact that films A and D had better barrier properties in UV light region than synthetic films such as low-density polyethylene, oriented polypropylene, polyester and polyvinylidene chloride described by Shiku et al. [24].

Similar results were obtained by Akhtar et al. [21] studying HPMC films functionalized with natural red colour extract (betacyanins). According to these authors, the lowest transmission through films was noticed for the greatest concentration of the extract. The extract concentration was also the main factor reducing film transparency.

Comparing the effect of each mixture component on transparency, the interaction between lycopene and MMT contributed significantly ( $p > 0.05$ ) (Table 4) to reduce film transparency, as shown in Figure 3. Higher values were found for control films (WPC and WPC MMT) and gradual a decrease with increasing the amount of lycopene were noted. This can be explained by the coloring ability provided by lycopene to the films.

Film formation from proteins is believed to proceed through the formation of a three-dimensional network of protein molecules by ionic, hydrogen, hydrophobic, and disulfide bonds. At pH 5.2 proteins are mainly in the zwitterions form; i.e., a neutral molecule with a positive and a negative electrical charge at different locations within that molecule. At this state, near the pI, the solubility of a protein is negligible because its net charge is zero and any electrostatic repulsion disappears. This fact supports the idea that film transparency could decrease at acidic pH due to protein aggregation [25]. Thus, as the pH of the films was adjusted to 7 during processing, transparent WPC and WPC MMT films were obtained. However, results indicated that addition of MMT reduced transparency of the films, especially those containing lycopene.

Similar results were found by Sothornvit et al. [16], who noted that the transparency of WPI-based films decreased significantly when the film was blended with organically modified MMT. According to these authors, the decreased transparency was found to depend on the amount of clay added. This may be partly due to the opaque appearance caused by the interaction between sulfated ash contained in the WPI and the two ethoxy groups of MMT. The opaque appearance of the WPI/clay composite films hinders light transmission through the films resulting in the reduced film transparency. However, the main reason that the films lost transparency when adding the clay at higher contents might be due to the aggregation of nanoparticles which, in turn, obstruct the transmission of light.

### **Moisture content, solubility and density**

Table 5 presents p values obtained in analysis of variance of the parameters evaluated: moisture content (MC), solubility (S) and density ( $\rho_s$ ). According to this data, it is possible to note that just MC was significantly affected by one of the parameters.

Moisture content (MC) represents the amount of water present in films and provides an indication of the films hydrophilicity, being the more hydrophilic films those that present the highest values of moisture content [26]. In this study, just lycopene affected significantly MC as the addition of MMT did not affect the moisture content of the films. Control films WPC (A), and WPC/MMT (D) had the highest MC,  $21.35 \pm 0.99\%$  and this mean was significantly lower ( $p < 0.05$ ) in films incorporated of lycopene (Figure 4). This could be explained by the hydrophobic nature of lycopene and its consequent low capacity of absorbing water. Similar results for MC were obtained in other studies with pure whey protein films, which found values ranging from 16.48 to 26.13% [19] and 15.10 to 21.71% [14].

Solubility in water is defined as the maximum percentage (by weight) of a substance that will dissolve in a unit volume of water at certain (usually room) temperature. It is an important property, which governs potential applications of these materials to food preservation. Films with low water solubility are necessary for the protection of foodstuffs with high or intermediate water activity. On the other hand, edible films with high water solubility may be required, for example, to contain premeasured portions which will be dissolved in water or in hot food [27].

Results for solubility proved that all WPC films kept their integrity after 24 h of immersion in water and the addition of MMT or lycopene did not affect significantly this parameter ( $p > 0.05$ ). The partial insolubility of these films ( $19.44 \pm 0.32\%$ ) may be attributed to establishment of stronger intermolecular bonds between protein molecules in the matrix of WPC films, e.g. disulfide bonds, as a result of the heat treatment. According to Perez-Gago et al. [28], besides the native whey protein produces water-soluble films, the denatured solution of whey protein produces films whose protein is insoluble. No influence in solubility were observed by addition of lycopene and MMT.

Density ( $\rho_s$ ) could be related to established interactions such as hydrogen or covalent bonding with reactive groups of the polymeric matrix. Therefore, by increasing intermolecular interactions within the

polymer chain, density could be increase [17]. In our study, no significant difference were observed between the treatments, indicating that in the proportions studied, MMT and lycopene did not affect  $\rho_s$ . The mean value obtained for this parameter was  $1.26 \pm 0.04 \text{ g.cm}^{-3}$ . Similar results for  $\rho_s$  in WPC films were obtained for Ramos et al. [13].

Comparable to WPI films, however,  $\rho_s$  obtained are lower than values described in literature. This difference may be rationalized by the differences in the film-forming product, especially the presence of higher contents of contaminants (i.e. lactose, lipids and minerals) in WPC [13].

### **Water vapor permeability (WVP)**

Water vapor permeability (WVP) is an important parameter commonly considered in food packaging that comprises sorption, diffusion and adsorption. WVP should be as low as possible since one of the main objectives of the use of an edible film is to retard moisture transfer between the food and the environment [29].

WVP of edible films and coatings depend on several factors such as the integrity of the film, the ratio between crystalline and amorphous zones, the hydrophilic-hydrophobic ratio and the polymeric chain mobility and the interaction between the film-forming polymers. The presence of a plasticizer or other additives are also important factors in film permeability [30].

In this study, significant decrease on WVP ( $p < 0.05$ ) (Table 6) were observed when MMT was included in the film matrix. In films without MMT, WVP were  $8.46 \pm 0.27 \times 10^{-11} \text{ g/sm}^2\text{kPa}$  and in films with MMT were  $5.70 \pm 1.33 \times 10^{-11} \text{ g/sm}^2\text{kPa}$ .

The significant decrease on WVP due to MMT addition may be explained by the fact that the diffusion of water was reduced by the increase in the tortuosity of its route through the polymer matrix. It can be attributed to the large aspect ratio and surface area of the clay when it is dispersed sufficiently [29]. The inclusion of nanoparticles in films lengthens the permeant path through the polymeric matrix, thus reducing the diffusivity and making the film a stronger barrier to water vapour [31].

### **FT-IR Vibrational Spectroscopy**

FTIR analyses were used to evaluate possible chemical interactions between the polymeric film and the bioactive agents incorporated in it. Figure 5 shows the FTIR spectra of WPC films incorporated of MMT and lycopene.

For all films, the main absorption peaks observed were located in the spectral range:  $800 - 1150 \text{ cm}^{-1}$ , attributed to absorption bands of glycerol;  $1170 - 1350 \text{ cm}^{-1}$ , related to the C-N stretching and N-H bending (amide III);  $1400 - 1550 \text{ cm}^{-1}$ , associated to N-H bending (amide II);  $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ , related to C = O stretching at (amide I). The spectral range between  $2850 - 2900 \text{ cm}^{-1}$  is assigned to C-H stretching. The broad absorption band observed at  $3000 - 3600 \text{ cm}^{-1}$  is related to free and bound O-H and N-H groups [12, 14, 32, 33] that are able to form hydrogen bonding with the carbonyl group of the peptide linkage in the protein [34]. Peaks at lower frequencies, specifically at  $520$  and  $461 \text{ cm}^{-1}$  were observed in treatments incorporated of MMT. These peaks is mainly attributed to Si-O bonds [35].

For the spectral region  $3600-3000 \text{ cm}^{-1}$ , a strong band was observed at  $3273 \text{ cm}^{-1}$  essentially due to O-H and N-H stretching mode. Besides several studies on proteins concerning this spectral region showed that the band of N-H stretching mode is generally at  $3254 \text{ cm}^{-1}$ , the displacement of the band could be due to the presence of other components in the film formulation, especially glycerol (with a large amount of hydroxyl groups) [36]. The O-H and N-H groups in WPC and O-H in adsorbed water are certainly able to form inter- and intramolecular hydrogen bonding with the C=O moiety of the amino acids (peptide and carboxyl groups) in the protein structure [32].

No differences in spectra were observed due to the addition of lycopene into the films. Usually the functional group C=C present in lycopene shows weak bands between  $1675 - 1645 \text{ cm}^{-1}$ , but as lycopene is a symmetrical alkene, these bands are absent in spectra [37].

### **Antioxidant Activity – DPPH**

The radical scavenging efficiency of an antiradical substance depends on the rate of hydrogen atom abstraction from the phenyl group and also on the stability of the resulting radical. Although different methods exist to measure the radical scavenging activity of films, the antiradical activity of the WPC-lycopene films was tested in this study by

DPPH method, because it is readily available and largely used in literature [38].

DPPH method is based on the ability of the DPPH, a stable free radical, to be quenched and thereby decolorize in the presence of antioxidants resulting in a reduction in absorbance values. In the DPPH test, the antioxidants reduce the DPPH radical to a yellow-colored compound, diphenylpicrylhy-drazine, and the extent of the reaction depends on the hydrogen-donating ability of the antioxidants [17].

Figure 6 shows the DPPH scavenging activity (%) of lycopene extract and WPC films. The interaction between lycopene and MMT significantly affected ( $p < 0.05$ ) the antioxidant activity of the films (Table 7).

All samples containing lycopene displayed antioxidant activity as they were able to scavenge DPPH radical. However, the antioxidant activity did not increase with increasing concentration of lycopene extract. One possible explanation for this fact may be related to the extraction methodology used which could not be efficient in extracting all antioxidant molecules presented in the films, as constated in the moment of the analysis. It could be observed strong retention of the compound in the film matrix and the solvents used were unable to extract all lycopene molecules.

WPC films without lycopene extract also showed some scavenging activity on DPPH. The scavenging mechanism in this case is related to the fact that free radical can react with residual free amino ( $\text{NH}_2$ ) groups to form stable macromolecule radicals [17].

We can also note that antioxidant activity of the pure extract incorporated in the films were almost three times superior to the antioxidant activity of the films. This phenomenon indicated that lycopene was modified or degraded during film preparation. However, some antioxidant capacity were conserved.

Radicals originating from oxygen exist naturally in the atmosphere or can be created by thermal processing or irradiation of packaging and food. Those radicals act as initiators of the chain oxidation of lipids, causing undesirable changes in food [39]. Thus, it is interesting to eliminate these radicals from the food environment and active food packaging, incorporated of antioxidant agents, such as lycopene stands out as an innovative alternative. Besides, due to the edible nature of the films developed, these films could also contribute to human health since

this antioxidant have protective effects against non-transmissible chronic diseases.

## CONCLUSIONS

Lycopene and MMT nanoparticles were successfully included in WPC films using the casting/evaporation method. The films were flexible and homogeneous and inclusion of 2% w/w of MMT in the polymeric matrix significantly improved barrier property against water vapor. Lycopene, besides its good red coloring ability provided to the films antioxidant activity. These findings open a new perspective on the use of materials for bioactive packaging applications.

## Acknowledgments

The authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and all of the employees of Embrapa Instrumentation for helpful assistance in this work.

## REFERENCES

1. Giroux, H. J.; Grandpré, G.; Fustier, P.; et al. Production and characterization of Cheddar-type cheese enriched with green tea extract. *Dairy Science & Technology*, **2013**; **93**(3), pp. 241–254.
2. Lopez-Rubio, A.; Gavara, R.; Lagaron, J. M. Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends in Food Science & Technology*, **2006**; **17**(10), pp. 567–575, 2006.
3. Moreira, F. K. V.; Camargo, L. A. DE; Marconcini, J. M.; Mattoso, L. H. Nutraceutically Inspired Pectin – Mg(OH) 2 Nanocomposites for Bioactive Packaging Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2013**; **61**, pp. 7119–7119.
4. Rodrigues-Amaya, D. B.; Kimura, M.; Amaya-Farfan, J. Fontes Brasileiras de Carotenoides: Tabela Brasileira de Composição de Carotenoides. 1ª ed. Brasília, DF: Brasília: MMA/SBF, 2008.
5. Gajowik, A.; Dobrzyńska, M. M. Lycopene - Antioxidant activity with radioprotective and anticancer properties. A review. *Rocz Panstw Zakl Hig*, **2014**; **65**(4), pp. 263–271.

6. Li-Juan, F.; Yu-Bin, D.; Lan-Xiang, W.; et al. The Effects of Lycopene on the Methylation of the GSTP1 Promoter and Global Methylation in Prostatic Cancer Cell Lines PC3 and LNCaP. *International Journal of Endocrinology*, **2014**; **2014**, pp. 1–10.
7. Sahin, K.; Cross, B.; Sahin, N.; et al. Lycopene in the prevention of renal cell cancer in the TSC2 mutant Eker rat model. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2015**; **xxx (xxx)**, pp. xxx–xxx.
8. Stice, C. P.; Liu, C.; Aizawa, K.; et al. Dietary tomato powder inhibits alcohol-induced hepatic injury by suppressing cytochrome p450 2E1 induction in rodent models. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2015**; **xxx (xxx)**, pp. xxx–xxx.
9. Cinelli, P.; Schmid, M.; Bugnicourt, E.; et al. Whey protein layer applied on biodegradable packaging film to improve barrier properties while maintaining biodegradability. *Polymer Degradation and Stability*, **2014**; **108**, pp. 151–157.
10. Azevedo, V. M.; Dias, M. V.; Borges, S. V.; Costa, A. L. R.; Silva, E. K.; Medeiros, E. A. A.; Soares, N. de F. Development of whey protein isolate bio-nanocomposites: Effect of montmorillonite and citric acid on structural, thermal, morphological and mechanical properties. *Food Hydrocolloids*, **2015**; **48**, pp. 179–188.
11. Hong, S.-I.; Krochta, J. M. Oxygen barrier performance of whey-protein-coated plastic films as affected by temperature, relative humidity, base film and protein type. *Journal of Food Engineering*, **2006**; **77 (3)**, pp. 739–745.
12. Wakai, M.; Almenar, E. Effect of the presence of montmorillonite on the solubility of whey protein isolate films in food model systems with different compositions and pH. *Food Hydrocolloids*, **2015**; **43**, pp. 612–621.
13. Azevedo, V. M.; Costa, A. L. R.; Fukushima, K. L.; Borges, S. V. Propriedades de barreira, mecânicas e ópticas de filmes de concentrado proteico de soro de leite. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, **2014**; **69 (4)**, pp. 237–247.
14. Ramos, Ó. L.; Reinas, I.; Silva, S. I.; et al. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. *Food Hydrocolloids*, **2013**; **30 (1)**, pp. 110–122.
15. ASTM. Standard practice for conditioning plastics for testing, D618-00. In Standard practice for conditioning plastics for testing, (p. 4). Philadelphia, PA, 2000.
16. Sothornvit, R.; Hong, S.-I.; An, D. J.; Rhim, J.-W. Effect of clay content on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/organo-clay composite films. *LWT - Food Science and Technology*, **2010**; **43 (2)**, pp. 279–284.



17. ASTM. E398-03: Standard test method for water vapor transmission rate of sheet materials using dynamic relative humidity measurement. Philadelphia, 2003.
18. Siripatrawan, U.; Harte, B. R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, **2010**; **24** (8), pp. 770–775.
19. ASTM. Standard Test Methods for Moisture Content of Paper and Paperboard by Oven Drying. Designation D644-94. In Annual Book of ASTM Standards; ASTM: Philadelphia, PA, pp 1-2, 1994.
20. Gounga, M. E.; Xu, S.-Y.; Wang, Z. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. *Journal of Food Engineering*, **2007**; **83** (4), pp. 521–530.
21. Akhtar, M. J.; Jacquot, M.; Jasniewski, J.; et al. Antioxidant capacity and light-aging study of HPMC films functionalized with natural plant extract. *Carbohydrate Polymers*, **2012**; **89** (4), pp. 1150–1158.
22. Park, S.-I.; Zhao, Y. Incorporation of a High Concentration of Mineral or Vitamin into Chitosan-Based Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**; **52**, pp. 1933–1939.
23. Li, Y.; Jiang, Y.; Liu, F.; et al. Fabrication and characterization of TiO<sub>2</sub>/whey protein isolate nanocomposite film. *Food Hydrocolloids*, **2011**; **25** (5), pp. 1098–1104.
24. Shiku, Y.; Hamaguchi, P. Y.; Tanaka, M. Effect of pH on the preparation of edible films based on fish myofibrillar proteins. *Fisheries Science*, **2003**; **69**, pp. 1026 – 1032.
25. Pérez, L. M.; Soazo, M. D. V.; Balagué, C. E.; Rubiolo, A. C.; Verdini, R. A. Effect of pH on the effectiveness of whey protein/glycerol edible films containing potassium sorbate to control non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ready-to-eat foods. *Food Control*, **2014**; **37**, pp. 298–304.
26. Bourbon, A. I.; Pinheiro, A. C.; Cerqueira, M. A.; et al. Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. *Journal of Food Engineering*, **2011**; **106** (2), pp. 111–118.
27. Souza, B. W. S.; Cerqueira, M. A.; Casariego, A.; et al. Effect of moderate electric fields in the permeation properties of chitosan coatings. *Food Hydrocolloids*, **2009**; **23** (8), pp. 2110–2115.
28. Pérez-Gago, M. B.; Nadaud, P.; Krochta, J. M. Water Vapor Permeability, Solubility, and Tensile Properties of Heat-denatured. *Journal of Food Science*, **1999**; **64** (7326), pp. 1034–1037.
29. Gutiérrez, M. Q.; Echeverría, I.; Ihl, M.; Bifani, V.; Mauri, A. N. Carboxymethylcellulose–montmorillonite nanocomposite films activated

- with murta (*Ugni molinae* Turcz) leaves extract. *Carbohydrate Polymers*, **2012**; **87** (2), pp. 1495–1502.
30. Garcia, M. A., Martino, M. N., Zaritzky, N. E. Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. *Journal of food science*, **2000**; **65** (6), pp. 941–947.
31. Dias, M. V.; Azevedo, V. M.; Borges, S. V.; et al. Development of chitosan/montmorillonite nanocomposites with encapsulated  $\alpha$ -tocopherol. *Food Chemistry*, **2014**; **165**, pp. 323–329.
32. Schmidt, V.; Giacomelli, C.; Soldi, V. Thermal stability of films formed by soy protein isolate–sodium dodecyl sulfate. *Polymer Degradation and Stability*, **2005**; **87** (1), pp. 25–31, 2005.
33. Guerrero, P.; de la Caba, K. Thermal and mechanical properties of soy protein films processed at different pH by compression. *Journal of Food Engineering*, **2010**; **100** (2), pp. 261–269.
34. Karnnet, S.; Potiyaraj, P.; Pimpan, V. Preparation and properties of biodegradable stearic acid-modified gelatin films. *Polymer Degradation and Stability*, **2005**; **90** (1), pp. 106–110.
35. Majdzadeh-Ardakani, K.; Navarchian, A. H.; Sadeghi, F. Optimization of mechanical properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, **2010**; **79** (3), pp. 547–554.
36. Tien, C. le; Letendre, M.; Mateescu, M. A.; et al. Development of Biodegradable Films from Whey Proteins by Cross-Linking and Entrapment in Cellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**; **48**, pp. 5566–5575.
37. Lopes, W. A.; Fascio, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Química Nova*, **2004**; **27** (4), pp. 670–673.
38. Domenek, S.; Louaifi, A.; Guinault, A.; Baumberger, S. Potential of Lignins as Antioxidant Additive in Active Biodegradable Packaging Materials. *Journal of Polymers and the Environment*, **2013**; **21** (3), pp. 692–701.
39. López-de-Dicastillo, C.; Gómez-Estaca, J.; Catalá, R.; Gavara, R.; Hernández-Muñoz, P. Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. *Food Chemistry*, **2012**; **131**, pp. 1376–1384.

Table 1. Gel formulation compositions for film processing\*

Film	WPC** (% w/w)	MMT*** (% w/w)	Lycopene (% w/w)
A	10	0	0
B	10	0	6
C	10	0	12
D	10	2	0
E	10	2	6
F	10	2	12

\* all formulations contain 30% (w/w) of glycerol as plasticizer, \*\*whey proteins concentrate, \*\*\*montmorillonite.

Table 2 P values for colour parameters obtained in analysis of variance.

FV	P value		
	L*	a*	b*
MMT	0.0003	0.0110	0.0144
Lycopene	0.0000	0.0000	0.0001
MMT * lycopene	0.0224	0.0388	0.1367

Table 3 Color properties of WPC/MMT films incorporated of lycopene.\*

Film	L*	a*	Film	b*
<i>0% MMT</i>		<i>Lycopene</i>		
0% lycopene	83.96 ± 0.46 <sup>a</sup>	-0.07 ± 0.14 <sup>a</sup>	0%	18.16 ± 0.89 <sup>a</sup>
6% lycopene	33.45 ± 0.77 <sup>b</sup>	37.74 ± 0.99 <sup>b</sup>	6%	17.51 ± 2.72 <sup>a</sup>
12% lycopene	26.90 ± 0.61 <sup>c</sup>	52.65 ± 0.41 <sup>c</sup>	12%	30.26 ± 0.21 <sup>b</sup>
<i>2% MMT</i>		<i>MMT</i>		
0% lycopene	80.14 ± 0.35 <sup>d</sup>	0.58 ± 0.21 <sup>d</sup>	0%	19.58 ± 0.29
6% lycopene	31.22 ± 0.30 <sup>e</sup>	44.87 ± 1.73 <sup>e</sup>	2%	24.33 ± 3.41
12% lycopene	26.48 ± 0.65 <sup>f</sup>	53.86 ± 1.07 <sup>f</sup>		

\*Mean ± standard deviation for five replicates. Means within the same column, labeled with different letters, statistically differ from each other by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ )

Table 4 P values for transparency obtained in analysis of variance.

FV	P value
MMT	0.0003
Lycopene	0.0000
MMT * lycopene	0.0457

Table 5 P values for moisture content (MC), solubility (S) and density ( $\rho_s$ ) obtained in analysis of variance.

FV	P value		
	MC	S	$\rho_s$
MMT	0.3617	0.8981	0.2740
Lycopene	0.0000	0.7475	0.7210
MMT * lycopene	0.5633	0.6213	0.6692

Table 6 P values for water vapour permeability (WVP) obtained in analysis of variance.

FV	P value
MMT	0.0094
Lycopene	0.4056
MMT * lycopene	0.8151

Table 7 P values for antioxidant activity (DPPH) obtained in analysis of variance.

FV	P value
MMT	0.1525
Lycopene	0.0000
MMT * lycopene	0.0000

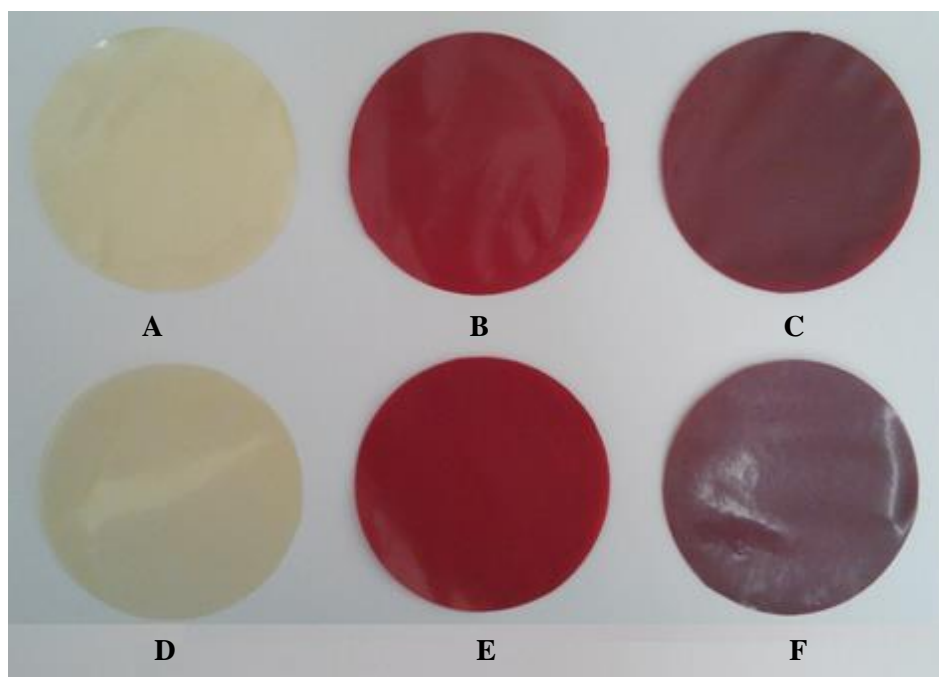


Figure 1 Photographs of WPC films: pure WPC (A); WPC and 6% of lycopene (B); WPC and 12% of lycopene (C); WPC and 2% of MMT (D); WPC, 2% of MMT and 6% of lycopene (E) and WPC, 2% of MMT and 12% of lycopene (F)

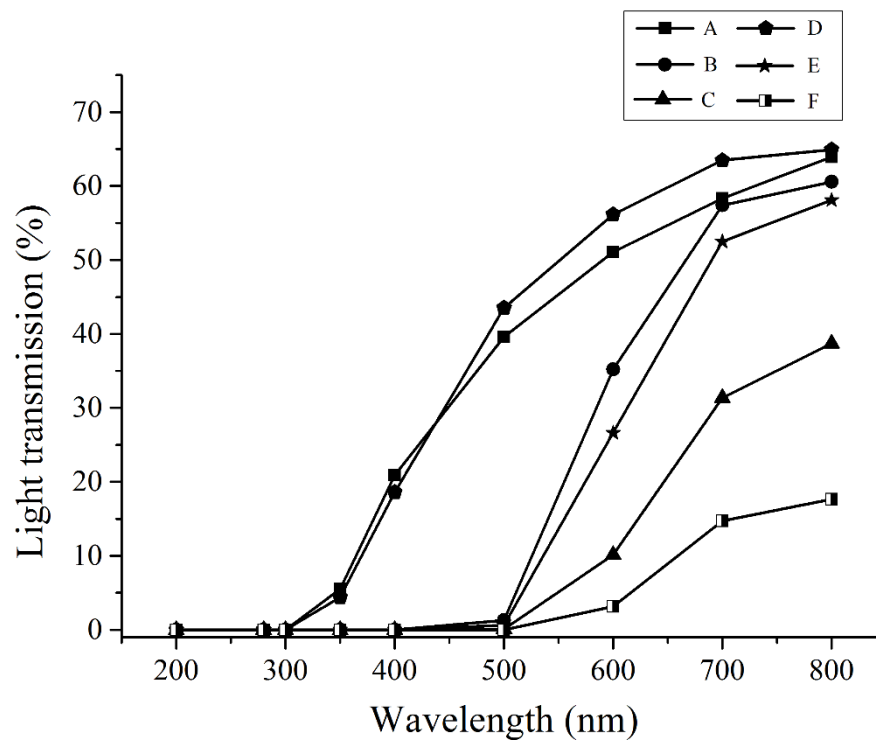


Figure 2 Light transmission (%) of WPC films: pure WPC (A); WPC and 6% of lycopene (B); WPC and 12% of lycopene (C); WPC and 2% of MMT (D); WPC, 2% of MMT and 6% of lycopene (E) and WPC, 2% of MMT and 12% of lycopene (F)

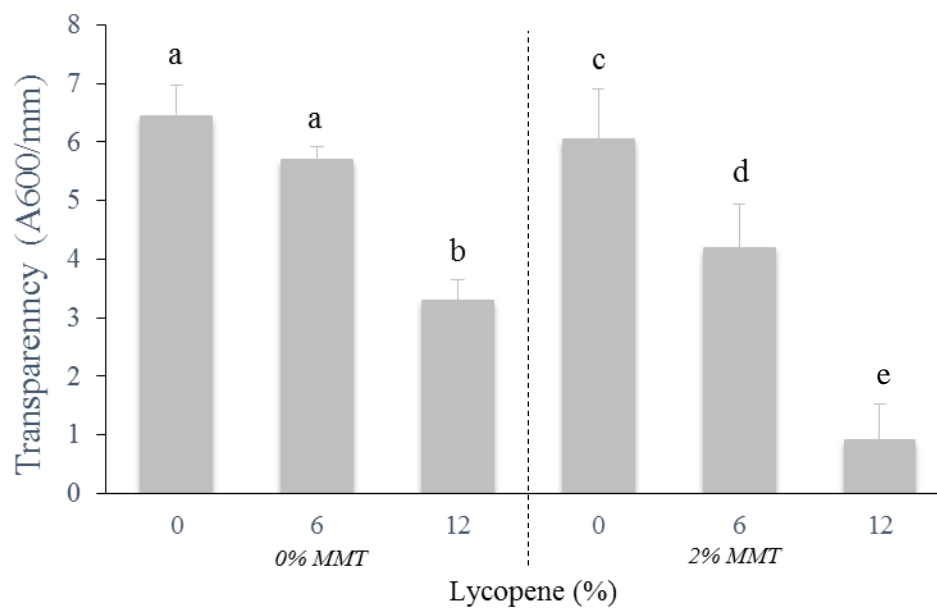


Figure 3 Transparency (A600/mm) of WPC films with or without addition of lycopene and MMT. Means within the same column, labeled with the same letter, do not statistically differ from each other by Tukey's test ( $p > 0.05$ )

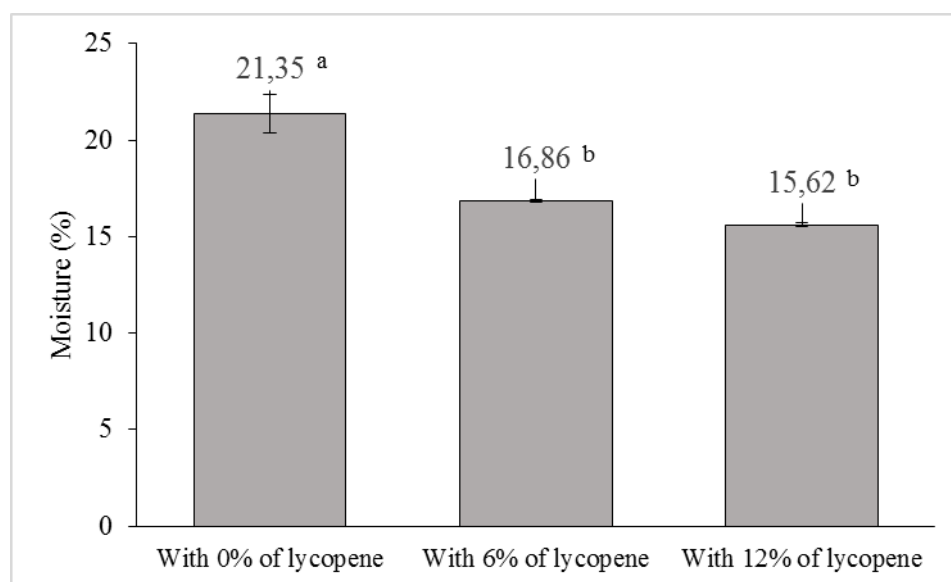


Figure 4 Moisture content (MC) of WPC/MMT films incorporated of lycopene. Mean  $\pm$  standard deviation for three replicates. Means labeled with the same letter, do not statistically differ from each other by Tukey's test ( $p > 0.05$ )



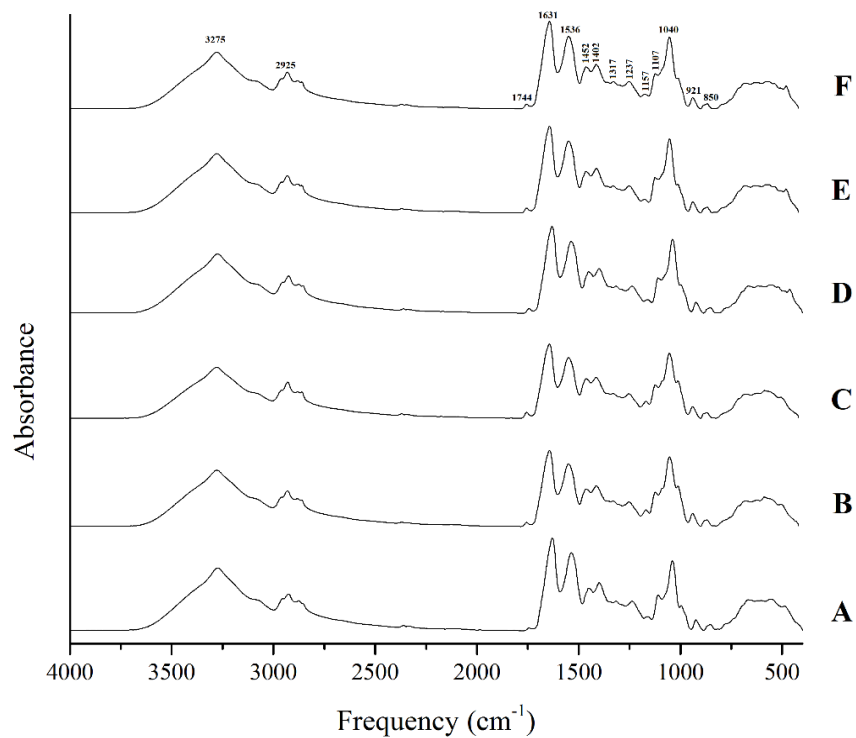


Figure 5 FTIR absorbance spectra of WPC films: pure WPC (A); WPC and 6% of lycopene (B); WPC and 12% of lycopene (C); WPC and 2% of MMT (D); WPC, 2% of MMT and 6% of lycopene (E) and WPC, 2% of MMT and 12% of lycopene (F)

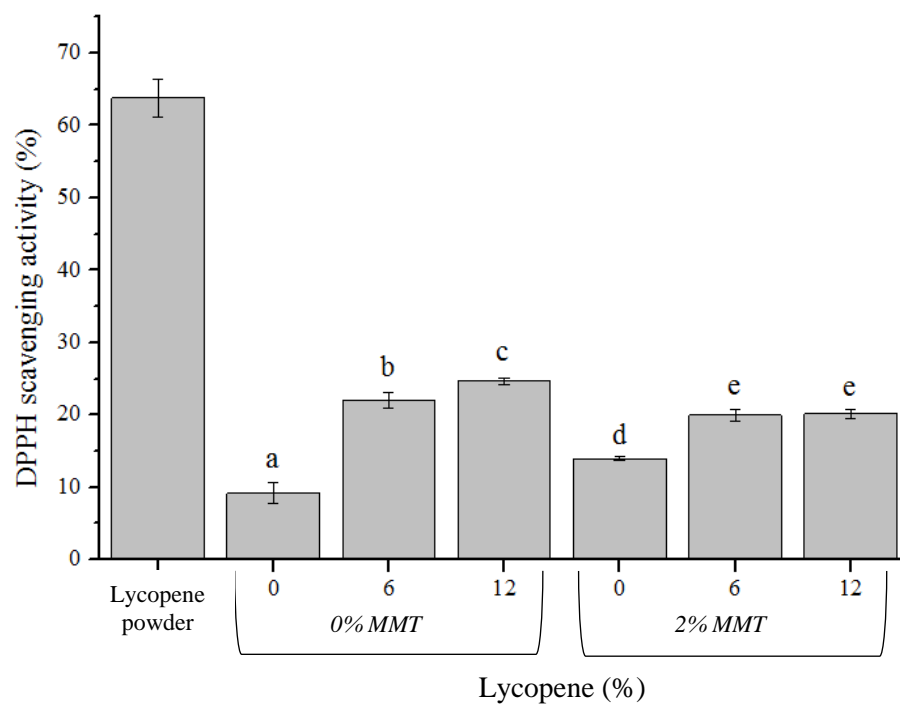


Figure 6 DPPH scavenging activity (%) of lycopene extract and WPC films with or without lycopene and MMT. Columns with the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ) by Tukey's test